

“El comportamiento de acicalamiento de *Apis mellifera* hacia el ácaro *Varroa destructor*: Bases fenotípicas y genéticas e implicancia sobre la resistencia a la varroosis”

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

Romina María Russo

Licenciada en Genética - Universidad de Morón - 2005

Lugar de trabajo: Instituto de Genética “E. A. Favret”, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Grupo vinculado al Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO-CONICET). Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.



FAUBA

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



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Alejandra C. Scannapieco

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Dra. Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

Alicia Basilio

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Dra. Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Silvia B. Lanzavecchia

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Dra. Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Karina Antúnez Claustre

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de la República Oriental del Uruguay)

Dra. Ciencias Biológicas (Universidad de la República Oriental del Uruguay)

Walter Marcelo Farina

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Dr. Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Sergio Roberto Ruffinengo

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Dr. en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Fecha de defensa de Tesis: 30 de agosto de 2023

AGRADECIMIENTOS

..A mi comité consejero, Ale, Alicia y Silvia por guiarme, por su sabiduría, experiencia y constante incentivo.

...A mi familia, amigos y pareja por acompañarme siempre.

...A mis compañeros de trabajo por su compañía y amistad, sobre todo a los pececitos.

...Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y al PROAPI por haber confiado en mí, dándome los medios que me permitieron realizar mis estudios de posgrado.

...A todas las personas que, de alguna manera u otra, participaron de este proyecto, especialmente a quienes colaboraron con el trabajo de campo y procesamiento de las muestras, en especial a Hernán Pietronave, Hernán Fain y Lucas Landi.

...A todas aquellas personas que colaboraron con mi formación antes de, y a lo largo de este proyecto.

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.

Msc. Romina M. Russo

ÍNDICE GENERAL

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xviii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xx
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.G.1. Generalidades de la <i>Apis mellifera</i>	2
I.G.1.1. Organización social	3
I.G.1.2. Ciclo de Vida	5
I.G.1.3. Taxonomía y origen	10
I.G.1.4. Introducción en América	12
I.G.1.5. Importancia económica	13
I.G. 1.6. Patógenos y su impacto	15
I.G. 2. Generalidades de <i>Varroa destructor</i>	16
I.G. 2.1. Ciclo de vida	16
I.G. 2.2. Detección y dispersión en Sudamérica	19
I.G. 2.3. Origen y distribución	19
I.G. 2.4. Impacto sobre <i>A. mellifera</i>	21
I.G. 2.5. Control de la varroosis	22
I.G. 2.6. Relación parásito-hospedador	23
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	26
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
Hipótesis	28
Nota del Tesista	29
CAPÍTULO 1.	30
Caracterización integral a campo de colmenas de <i>Apis mellifera</i> que sobreviven naturalmente a <i>Varroa destructor</i>	30
1.1. INTRODUCCIÓN	31
1.1.1. Caracterización genética de poblaciones de <i>A. mellifera</i>	31
1.1.1.1 Marcadores moleculares del ADN mitocondrial	31
1.1.1.2 Antecedentes de caracterización genética en Argentina	32

1.1.2. Dinámica de <i>V. destructor</i> en colonias de <i>A. mellifera</i>	34
1.1.3. Comportamientos de higiene de las colonias	36
1.1.4. Antecedentes de caracterización y selección de colonias resistentes a <i>V. destructor</i>	38
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
1.2.1. Materiales	39
1.2.1.1 Origen y selección de materiales	41
1.2.2.3.1. Dinámica temporal de las poblaciones de <i>V. destructor</i> en abejas adultas	46
1.2.2.3.2. Dinámica temporal de las poblaciones de <i>V. destructor</i> en celdas de cría	47
1.2.2.4. Medición del comportamiento higiénico de las colonias	47
1.2.2.5. Caracterización del comportamiento de <i>grooming</i> en las colonias	48
1.2.2.6. Supervivencia invernal de las colonias	49
1.2.2.7. Análisis estadístico	49
1.3. RESULTADOS	50
1.3.1. Caracterización genética de abejas	50
1.3.2. Parámetros poblacionales de <i>A. mellifera</i>	51
1.3.3. Parámetros poblacionales de <i>V. destructor</i>	53
1.3.4. Comportamiento higiénico	55
1.3.5. Comportamiento de <i>grooming</i>	55
1.3.6. Supervivencia invernal de las colonias	59
1.4. DISCUSIÓN	60
1.5. CONCLUSIÓN	64
CAPÍTULO 2.	65
Caracterización del comportamiento de <i>grooming</i> de <i>Apis mellifera</i> en arenas experimentales	65
2.1. INTRODUCCIÓN	66
2.1.1. Generalidades del comportamiento de <i>grooming</i>	66
2.1.2. Comportamiento de <i>grooming</i> en abejas melíferas	66
2.1.2.1. Diferencias entre <i>A. mellifera</i> y <i>A. cerana</i>	67
2.1.2.2. Especialización del comportamiento hacia el ácaro	68
2.1.2.3. Factores que influyen el <i>grooming</i>	69
2.1.2.4. Evaluación del comportamiento en el laboratorio	69
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	71
2.2.1. Materiales	71
2.2.1.1. Colonias de <i>A. mellifera</i>	71
2.2.1.2. Muestras de <i>V. destructor</i>	74
2.2.2. Métodos	74
2.2.2.1. Ensayos en cuadros experimentales	74
2.2.2.2. Análisis estadístico	76

2.3. RESULTADOS	77
2.3.1. Tiempo de inicio del comportamiento de <i>grooming</i>	77
2.3.2. Nivel de respuesta del comportamiento de <i>grooming</i>	78
2.3.3. Nivel de ansiedad	81
2.3.4. Comportamiento de rodar	82
2.3.5. Eficiencia del comportamiento de <i>grooming</i>	82
2.3.6. Análisis de componentes principales	83
2.4. DISCUSIÓN	85
2.5. CONCLUSIÓN	88
CAPÍTULO 3.	89
Análisis de expresión de genes candidatos asociados al comportamiento de <i>grooming</i> en <i>Apis mellifera</i>	89
3.1. INTRODUCCIÓN	90
3.1.1. El comportamiento y los genes	90
3.1.2. Bases genéticas del comportamiento de <i>grooming</i>	91
3.1.3. Genes candidatos para el comportamiento de <i>grooming</i> en <i>A. mellifera</i>	92
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	93
3.2.1. Materiales	93
3.2.3. Métodos	93
3.2.3.1. Extracción de ARN y obtención de ADNc	93
3.2.3.2. Análisis de la expresión génica	94
3.2.3.2.1 Selección de genes candidatos	94
3.2.3.2.2. Expresión diferencial de genes	94
3.3. RESULTADOS	97
3.3.1 Extracción de ARN de muestras de <i>A. mellifera</i>	97
3.3.1 Elección de cebadores para amplificación por qPCR	97
3.3.1 Análisis de expresión de genes	99
3.3.1.1 <i>Neurexin-1 (Nrx1)</i>	99
3.3.1.2. <i>Cytochrome P450 9e2 (CYP9Q3)</i>	101
3.3. 1. 3 <i>Octopamine receptor-1 (Oa1)</i>	103
3.3.2.4. <i>Poli (U)-binding-splicing factor half pint (pUf68)</i>	105
3.3.2.5. <i>Atlastin (atl1)</i>	106
3.4. DISCUSIÓN	107
3.5. CONCLUSIÓN	113
CAPÍTULO 4.	114
Discusión y conclusiones generales	114
4.1. DISCUSIÓN GENERAL	115

4.2. CONCLUSIONES	119
4.3. PERSPECTIVAS A FUTURO	120
BIBLIOGRAFÍA	121
APÉNDICE	150

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Capítulo 1

Russo, R. M., Liendo, M. C., Landi, L., Pietronave, H., Merke, J., Fain, H., Muntaabski, I., Palacio, M.A., Rodriguez, G.A., Lanzavecchia, S. B. y Scannapieco, A. C. (2020). Grooming behavior in naturally *Varroa*-resistant *Apis mellifera* colonies from north-central Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 590281. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.590281>

Capítulo 2

Russo, R. M., Landi, L., Muntaabski, I., Liendo, M. C., Pietronave, H., Merke, J., Rodriguez, G.A., Palacio, M.A., Basilio, A., Lanzavecchia, S. B. y Scannapieco, A. C. (2022). Age-performance and intensity of grooming behavior toward *Varroa destructor* in resistant and susceptible *Apis mellifera* colonies. *Apidologie*, 53(5), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00971-0>

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Duración (en días) de las etapas del ciclo de vida de <i>A. mellifera</i> en cada casta. Se indica el momento del ciclo en que las celdas de cría son operculadas, el tiempo de desarrollo (TD), la edad de la madurez sexual (MS) y la longevidad en cada casta; <u>a</u> : años; <u>d</u> : días.....	21
Cuadro 2. Cronograma de relevamientos realizados durante la temporada 2017-2018. Se detallan los parámetros registrados en cada uno de los meses.....	58
Cuadro 3. Porcentaje de comportamiento higiénico (\pm SE) medido en otoño temprano (Marzo) y primavera (Octubre) para las colonias de los stocks M y S.....	68
Cuadro 4. Porcentaje medio de los diferentes tipos de daños registrados en individuos de <i>V. destructor</i> colectados en los pisos de las colonias M y S.....	70
Cuadro 5. Porcentaje de ácaros dañados de las colonias M y S de acuerdo al número de patas dañadas.....	72
Cuadro 6. Número de intentos que realizaron las abejas marcadas durante el tiempo de observación en respuesta al tratamiento de <i>Varroa</i> (infestación con un ácaro) y al tratamiento control (toque de pincel). Los valores se muestran para las abejas de los stocks S y M, a diferentes edades. Letras diferentes indican diferencias significativas entre edades, stocks y tratamientos por Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).....	93
Cuadro 7. Cebadores específicos usados para la amplificación por qPCR de los genes candidatos asociados al comportamiento de <i>grooming</i> y los genes de referencia.....	110
Cuadro 8. Valor de la eficiencia del par de cebadores elegidos para cada gen, calculado en base al algoritmo del programa <i>LinRegPCR</i> . Se muestra el rango de amplificación en Ct (número de ciclos).....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografía de un cuadro de cría de una colonia de *A. mellifera* que muestra en la región central a la reina rodeada de abejas obreras (izquierda) y una celda real (derecha). Se observan las diferencias en tamaño y morfología externa entre la reina y las obreras.....17
- Figura 2.** Fotografía de zánganos de *A. mellifera* sobre el panal (izquierda) y sobre la entretapa de una colmena (centro) y de celdas de cría de zánganos (derecha). Se observan las diferencias en la morfología externa entre zánganos y obreras y entre las celdas de cría de ambas castas.....17
- Figura 3.** Fotografía abejas obreras de *A. mellifera* sobre un panal con celdas de cría abierta y cría operculada.....18
- Figura 4.** Determinación sexual en *A. mellifera*. Se indica sobre las gametas el número cromosómico. Figura realizada a partir de la información de Hasselmann *et al.* (2001).....19
- Figura 5.** Ciclo de vida de las tres castas de *A. mellifera*. Se indica la duración en días. Tomado de Winston (1987).....20
- Figura 6.** Relaciones filogenéticas entre las subespecies nativas de *A. mellifera* (*Neighbor-Joining*). Los asteriscos señalan los nodos que dan origen a los cuatro linajes principales (A, C, M y O). Modificado a partir de Wallberg *et al.* (2014).....23
- Figura 7.** Mapa de distribución de los linajes evolutivos de *A. mellifera* según su origen geográfico (izquierda). Reconstrucción filogenética obtenida a partir del análisis de SNPs en muestras de 18 subespecies de *A. mellifera* (derecha) (Dogantzis *et al.*, 2021).24
- Figura 8.** Factores de estrés asociados a la disminución de colmenas de *A. mellifera* en el mundo, que actúan generalmente de forma sinérgica. Basado en información revisada en Goulson *et al.* (2015).....27
- Figura 9.** Esquema del ciclo de vida de *V. destructor* sobre su hospedador, *A. mellifera*. Modificado a partir de Nazzi y Le Conte (2016).29

- Figura 10.** *V. destructor* en estado forético (arriba). Morfología externa de una hembra, un macho y un estadio inmaduro (deutoninfa) del ácaro (abajo, de izquierda a derecha). Fotografía tomada con un microscopio Olympus BX40 con un aumento de 40x.30
- Figura 11.** Esquema del ciclo reproductivo de *V. destructor* sobre su hospedador, *A. mellifera*. Modificado a partir de Evans y Cook (2018).31
- Figura 12.** Posible ruta de introducción y dispersión de *V. destructor* en Argentina, de acuerdo a lo descrito en De Jong *et al.* (1982) y Montiel y Piola (1976).32
- Figura 13.** Distribución global de *Varroa destructor* (se muestra en rojo el haplotipo K1, en azul el haplotipo J1 y en violeta la co-ocurrencia de ambos haplotipos) y de *V. jacobsoni* (indicado con puntos negros). Las fechas roja y azul indican el cambio de hospedador y la posterior dispersión desde el lugar de origen de los haplotipos J1 y K1, respectivamente. Modificado a partir de Traynor *et al.* (2020).....33
- Figura 14.** Gráfico representativo de distribución global de las poblaciones de *A. mellifera* naturalmente sobrevivientes al ácaro *Varroa destructor* (extraído de Locke 2016).....38
- Figura 15.** Esquema de los haplotipos mitocondriales de *A. mellifera* detectados en la Argentina de acuerdo a Agra *et al.* (2018). En el esquema se muestra la región intergénica *citocromo oxidasa I* y *citocromo oxidasa II (cox1-cox2)* comúnmente analizada para la determinación del linaje mitocondrial, y con líneas rojas se indican los sitios de restricción de la enzima *Hinf I*.....45
- Figura 16.** Distribución geográfica de los haplotipos mitocondriales detectados en poblaciones argentinas de *Apis mellifera* de acuerdo al estudio de Agra *et al.* (2018). Los puntos negros indican los sitios de muestreo (colonias silvestres y comerciales). El gráfico de torta en cada provincia representa la frecuencia de los seis haplotipos mitocondriales encontrados (C1, C2J, M4, A1, A4 y A30). La línea negra indica la isoterma anual de 16 °C. Se muestran en líneas de colores la distribución de la africanización en Argentina de acuerdo a los primeros resultados de Sheppard *et al.* (1991): la línea naranja indica el límite de saturación de abejas africanizadas (AA); la línea celeste señala el límite de la zona de colonización permanente de las AA; y la línea púrpura, el límite de colonización temporaria de las AA. Figura modificada a partir de Agra *et al.* (2018).....46

- Figura 17.** Crecimiento teórico de una colonia de *A. mellifera* sana sin tratamientos contra *V. destructor* y con un invierno de 3 meses. Extraído de Traynor *et al.* (2020).....48
- Figura 18.** Fotografía del Apiario Experimental de la Estación Experimental Agropecuaria Reconquista-INTA (Reconquista, provincia de Santa Fe, latitud-29.2587717, longitud-59.9095836) (arriba). Imagen satelital con la ubicación del apiario y los alrededores (abajo). Imagen de Argentina con la ubicación de la localidad de Reconquista.....53
- Figura 19.** Esquema representativo de la selección realizada para obtener el material de abejas melíferas sobrevivientes a *Varroa* (M) y el diseño experimental del presente estudio (temporada 2017-2018). S corresponde a colonias control susceptibles al ácaro.55
- Figura 20.** Fotografías de la toma de muestras (izquierda) y del conteo de ácaros (derecha) para la determinación de la parasitación en abejas adultas (%VF).59
- Figura 21.** Fotografías del manejo de cuadros de cría de abejas para la determinación de la parasitación por *V. destructor* en la cría de las abejas (%VC).60
- Figura 22.** (A) Fotografías del conteo de cría removida transcurridas las 24 hs del pinchado de las celdas. (B) Ecuación utilizada para el cálculo del comportamiento higiénico de las colonias de *A. mellifera*; C: celdas.61
- Figura 23.** Fotografías de pisos técnicos (izquierda) y conteo de ácaros caídos de *V. destructor* (derecha).62
- Figura 24.** Patrón de bandas de PCR-RFLP para la región *cox1-cox2* en muestras de abejas obreras de las colonias de *A. mellifera* analizadas. La fotografía corresponde a una corrida electroforética en gel de agarosa 3% p/v de los productos de PCR *cox1-cox2* digeridos con la enzima *Hinf* I. Calle 1: marcador de peso molecular *DNA Ladder Solis Biodyne 100 bp* (100 pb a 1500 pb); Calles 2-9: productos de restricción de muestras pertenecientes a colonias de haplotipo C1.....63
- Figura 25.** Número medio (\pm SE) de cuadros cubiertos por (A) abejas adultas y (B) cría en las poblaciones M y S. Letras diferentes indican diferencias significativas en las comparaciones *post-hoc* por LSD de Fisher ($\alpha = 005$).65

Figura 26. Porcentaje medio (\pm SE) de (A) *Varroa* forética y (B) cría infestada en las poblaciones M y S. Letras diferentes indican diferencias significativas entre poblaciones o meses de acuerdo a resultados de: (A) comparaciones *post-hoc* (LSD de Fisher; $\alpha = 005$) o (B) análisis por tablas de contingencia.....67

Figura 27. Porcentaje medio (\pm SE) de (A) ácaros caídos y (B) ácaros dañados en las colonias de los stocks M y S. Letras diferentes indican diferencias significativas en el GLMM entre las stocks o los meses, de acuerdo a LSD de Fisher ($\alpha = 0,05$). No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de ácaros dañados entre meses para el stock S.....69

Figura 28. Fotografías donde se observan los diferentes patrones de daño en los ácaros *V. destructor*. Las flechas indican las lesiones en el cuerpo, las patas y los quelíceros del ácaro. (A, B) Vista dorsal y ventral de ácaros no dañados, (C) escudo dorsal dañado + gnatosoma dañado y patas faltantes + quelíceros, (D, E) patas faltantes + quelíceros, (F) escudo dorsal dañado + gnatosoma dañado. La clasificación del daño a los ácaros fue descrita previamente por Corrêa-Marques *et al.* (2000). Todas las fotos se tomaron con un microscopio Olympus BX40 con un aumento de 40x.....71

Figura 29. Esquema del cuadro de observación montado para la evaluación del CG de acuerdo a Espinosa *et al.* (2004).....83

Figura 30. Esquema descriptivo de las etapas del bioensayo realizado para la evaluación del comportamiento de *grooming* en abejas individuales.....86

Figura 31. Fotografía del cuadro experimental diseñado para la medición del CG. Se observan las dos arenas experimentales donde se realizaron las observaciones en las abejas marcadas sometidas a los tratamientos control y de infestación con *V. destructor*.....88

Figura 32. Tiempo medio (segundos \pm SE) de la primera respuesta de *grooming* realizada por las abejas expuestas al tratamiento con *V. destructor* (infestación con un ácaro) y al tratamiento control (toque con pincel). Los valores se muestran para los stocks de *A. mellifera* susceptible (S) y resistente (M), en las tres edades analizadas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre edades, stocks y tratamientos por Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).91

Figura 33. Número medio de intentos (\pm SE) que realizaron las abejas en respuesta al tratamiento con *V. destructor* (infestación con un ácaro) o al tratamiento control (toque de pincel). Cada barra representa los valores para abejas de diferentes edades de los stocks de *A. mellifera* resistente (M) y susceptible (S). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las edades de las abejas, los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).....92

Figura 34. Proporción media (\pm SE) de abejas que expresaron ansiedad en respuesta al tratamiento con *V. destructor* (infestación con un ácaro) o al tratamiento control (toque de pincel). Se observan los datos obtenidos para abejas de diferentes edades de las colonias de *A. mellifera* resistentes (M) y susceptibles (S). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las edades de las abejas, los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).....94

Figura 35. Proporción media (\pm SE) de abejas que mostraron un comportamiento de rodar en respuesta al tratamiento con *V. destructor* y al tratamiento control. Los valores se muestran para las abejas de *A. mellifera* de origen S y M, a diferentes edades.....95

Figura 36. Análisis de componentes principales (CP) basados en las siguientes variables: tiempo de la primera respuesta, número de intentos, número de patas involucradas en el primer intento y nivel de ansiedad de las abejas frente a la infestación con el ácaro (tratamiento *V. destructor*). Estas variables se incluyeron en el análisis de CP en función de su significación estadística en los resultados de GLMM. Los datos se muestran para abejas de todas las edades de los stocks resistente de *A. mellifera* (M, puntos negros) y susceptible (S, puntos blancos).....97

Figura 37. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infestación artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *neurexin-1* en cabezas de abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).113

Figura 38. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *neurexin-1* en el cuerpo de la abeja. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).....114

Figura 39. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infestación artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *CYP9Q3* en cabezas de abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia.....115

Figura 40. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *CYP9Q3* en el cuerpo de las abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).....116

Figura 41. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infestación artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *Oa1* en cabezas de abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia.....117

Figura 42. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *Oa1* en el cuerpo de las abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).....118

Figura 43. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *pUf68* en el cuerpo de las abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).....119

Figura 44. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *at11* en el cuerpo de las abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).120

ABREVIATURAS

Abreviatura	Referencia
ABPV	Virus de la Parálisis Aguda (Inglés, <i>Acute Bee Paralysis Virus</i>)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Copia
ADNmt	Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial
AFB	Loque Americana (Inglés, <i>American Foulbrood</i>)
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
ARNt	Ácido Ribonucleico de Transferencia
<i>at11</i>	<i>Atlastin-1</i> (gen)
CBPV	Virus de la Parálisis Crónica (Inglés, <i>Chronic Bee Paralysis Virus</i>)
CG	Comportamiento de <i>Grooming</i>
CH	Comportamiento Higiénico
CP	Componente Principales
<i>CYP9Q3</i>	<i>cytochrome P450 9e2</i> (gen)
DWV	Virus de las Alas Deformadas (Inglés, <i>Deformed Wing Virus</i>).
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
<i>EF-1</i>	<i>Elongation Factor-1</i> (gen)
EFB	Loque Europea (Inglés, <i>European Foulbrood</i>)
<i>GAPD2</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase</i> (gen)
GLM	Modelos Lineales Generalizados (Inglés, <i>Generalized Linear Models</i>)
GLMM	Modelos Lineales Generalizados Mixtos (Inglés, <i>Generalized Linear Mixed Models</i>)
<i>GLS</i>	Modelos de Cuadrados Mínimos Generalizados (Inglés, <i>Generalized Least Squares</i>)
IAPV	Virus de la Parálisis Aguda Israelí (Inglés: <i>Israeli Acute Paralysis Virus</i>)
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
KBV	Virus de <i>Kashmir</i> (Inglés: <i>Kashmir Bee Virus</i>)
NRQ	Cuantificación Relativa Normalizada (Inglés, <i>Normalized Relative Quantification</i>)
<i>Nrx1</i>	<i>Neurexin-1</i> (gen)
<i>Oa1</i>	<i>Octopamine Receptor -1</i> (gen)
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
<i>pUf68</i>	<i>poly(U)-binding-splicing factor</i> (gen)
qPCR	PCR cuantitativa (Inglés, <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
QTL	Locus de Rasgo Cuantitativo (Inglés, <i>Quantitative Trait Locus</i>)
RFLP	Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (Inglés, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SNPs	Polimorfismo de Nucleótido Único (Inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSR	Microsatélites (Inglés, <i>Simple Sequence Repeats</i>)
VF	Varroa Forética
VSH	Comportamiento Higiénico Dirigido hacia <i>Varroa</i> (Inglés, <i>Varroa Sensitive Hygiene</i>)

RESUMEN

Apis mellifera es un insecto polinizador clave y constituye el mayor productor de miel para consumo humano. Uno de los principales patógenos de las abejas melíferas es el ácaro *Varroa destructor*. Este ectoparásito generalmente se controla mediante el uso de tratamientos químicos para evitar su impacto negativo sobre las colonias. En los últimos años se han identificado poblaciones de abejas que sobreviven a *V. destructor* en ausencia de tratamientos acaricidas y se han estudiado los comportamientos sociales asociados al control de esta parasitosis. Uno de ellos, el comportamiento de acicalamiento o *grooming*, consiste en la remoción de los ácaros ubicados sobre el cuerpo de las abejas obreras mediante el uso de patas y mandíbulas. El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue estudiar de forma integral el comportamiento de *grooming* (CG) de *A. mellifera* hacia *V. destructor* en un material apícola naturalmente sobreviviente a *Varroa*, analizando el impacto de este carácter de inmunidad sobre el desempeño sanitario y la supervivencia de las colmenas, y explorando sus bases genéticas. Los resultados de los ensayos a campo mostraron un alto porcentaje de ácaros dañados y una baja carga parasitaria en las colonias de la población de abejas sobrevivientes (stock M) respecto a la población de abejas susceptibles (stock S). Estos resultados sugieren que un alto CG aumenta la mortalidad de *Varroa* y permite regular la parasitosis dentro de la colonia. Por otro lado, los ensayos comportamentales realizados en arenas experimentales sobre abejas individuales mostraron que las obreras del stock M, y particularmente las más jóvenes, iniciaron el CG de forma más precoz e intensa frente a la infestación artificial con *V. destructor* en comparación con las abejas obreras del stock S. Por último, los análisis de expresión de genes candidatos por qPCR en respuesta a la presencia del ácaro mostraron que las abejas del stock M exhiben mayores niveles de expresión de los genes *neurexin-1*, *cytochrome P450 9e2*, *octopamine receptor-1* y *poli (U)-binding-splicing factor half pint* y menores niveles del gen *atlastin-1* respecto a las abejas S. Los resultados obtenidos en esta Tesis evidencian variabilidad fenotípica y genética en el comportamiento de *grooming* hacia *V. destructor* en los materiales evaluados, resaltan la importancia del carácter en la resistencia de las colonias de *A. mellifera* a la varroosis, y proveen información aplicable a la identificación y selección de poblaciones de abejas con características deseables para el desarrollo de la apicultura en clima subtropical.

Palabras clave: Comportamiento de acicalamiento, abeja melífera, ectoparásito, mejoramiento genético apícola, expresión de genes candidatos.

ABSTRACT

Apis mellifera is an essential pollinating insect and the honey's largest producer for human consumption. The ectoparasitic mite, *Varroa destructor*, is one of the main honey bee pathogens, which is mostly controlled by chemical treatments to avoid negative impact on colonies. In recent years, honey bee populations that survive *V. destructor* in the absence of acaricide treatments have been identified, and several social behaviors towards the mite have been reported. One of them, grooming behavior, consists in the removal of mites from the body by worker bees by using their legs and mandibles. The general objective of this PhD Thesis was to comprehensively study the grooming behavior of *A. mellifera* towards *V. destructor* at the individual and colony level, exploring its genetic basis and analyzing the impact of this trait on colony's survival. The results of the colony-level assays showed a high percentage of damaged mites and a low parasite load in the surviving honey bee population (stock M) compared to a population susceptible to *Varroa* (stock S), suggesting that a high grooming behavior increases *Varroa* mortality and may regulate the parasitosis within the colony. On the other hand, individual behavioral assays showed that bees from the stock M, and particularly the younger ones, initiated the grooming behavior response to the mite more rapidly and intensely compared to the bees from stock S. Finally, candidate gene expression analyses by qPCR revealed that bees from the stock M express higher levels of the *neurexin-1*, *cytochrome P450 9e2*, *octopamine receptor-1* and *poli(U)-binding-splicing factor half pint* genes and lower levels of the *atlastin-1* gene compared to S bees when they are exposed to the mite. The results obtained in this Thesis show phenotypic and genetic variability in the grooming behavior towards *V. destructor* in the evaluated materials, highlight the importance of this trait in the resistance of *A. mellifera* colonies to varroosis, and provide information applicable to the identification and selection of honey bee populations exhibiting desirable traits for the development of beekeeping in a subtropical climate.

Keywords: *Ectoparasitic mite, honey bee, selective breeding, grooming behavior, gene expression analysis*

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.G.1. Generalidades de la *Apis mellifera*

Apis mellifera Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) es un insecto eusocial, es decir, que presenta el más alto nivel de organización social que se da en animales. Vive en colonias y exhibe una organización compleja, con división del trabajo, cooperación en el cuidado de la cría y solapamiento de generaciones capaces de contribuir en la labor social (Wilson, 1971). El éxito en las tareas realizadas en estas sociedades animales depende no sólo de la eficacia individual sino también de la tarea coordinada de todos los individuos involucrados (Wilson, 1971; Núñez, 1982). Para lograr esta coordinación, es imprescindible que haya una transferencia precisa de información entre individuos. En este sentido, las abejas melíferas cuentan con sofisticados sistemas de comunicación con la transmisión simultánea de señales acústico-vibratorias y olfativas, como es el caso de la comunicación de posicionamiento comúnmente conocida como “Danza de las Abejas” (von Frisch, 1967; Seeley, 1995; Thom *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2023). Dentro del nido, estos insectos establecen una enorme cantidad de interacciones interindividuales como ser contactos corporales, antenales y boca a boca (trofalaxia), los cuales les permiten intercambiar información relacionada con los recursos obtenidos en el exterior (von Frisch, 1967; Grüter y Farina, 2009; Ramirez *et al.*, 2023). Además, este tipo de interacciones, su dinámica temporal y organizacional, manifestada entre individuos o grupos de individuos, y su adaptación a distintos contextos poblacionales y epidemiológicos de la colonia, son claves para la gestión y mantenimiento de la salud en estas sociedades (Naug, 2008). Por ejemplo, las interacciones estructuradas entre los miembros de la colonia (definida como “inmunidad organizacional”: Naug y Camazine, 2002; Naug, 2008), y los comportamientos de “inmunidad social” (Cremer *et al.*, 2007; Stroeymeyt *et al.*, 2014; Simone-Finstrom 2017; Cremer y Pull, 2018; Cotter *et al.*, 2019), tales como la separación espacial de las abejas de alto riesgo de las abejas de bajo riesgo (Naug y Camazine 2002; Baracchi y Cini, 2014), la disminución de los contactos con abejas infectadas (Lecocq *et al.*, 2016), y la eliminación de compañeras de nido infectadas (Baracchi *et al.*, 2012; Biganski *et al.*, 2018), entre otros, minimizan la transmisión de enfermedades dentro de la colonia (Laomettachit *et al.*, 2021).

A. mellifera presenta una alta capacidad para explotar diversos ambientes, lo que la convierte en uno de los principales polinizadores manejados por el hombre a nivel mundial. Se estima que un 35% de la producción de alimentos de consumo humano depende de la polinización mediada por insectos y una gran variedad de cultivos dependen especialmente de la polinización realizada por las abejas melíferas (Klein *et al.*, 2007). Por ejemplo, el rendimiento de algunos cultivos de frutas, semillas y frutos secos disminuye en más de un 90% sin estos polinizadores (Southwick y Southwick, 1992; Magrach *et al.*, 2022). Así, el valor de los servicios ecosistémicos que brindan las abejas y su rol en la conservación de la biodiversidad vegetal es inmensurable (Biesmeijer *et al.*, 2006; Potts *et al.*, 2010).

A. mellifera es asimismo considerada el principal productor de miel del mundo, constituyéndose como uno de los insectos benéficos de más alta importancia agronómica (Burgett *et al.*, 2004). Además, esta especie ha sido considerada como organismo modelo para investigación sobre fisiología y comportamiento animal (revisado en Elekonich y Roberts, 2005), y su estudio ha permitido explorar y entender aspectos fisiológicos, ecológicos, evolutivos y genéticos de los insectos sociales en particular (Savard *et al.*, 2006; Munoz-Torres *et al.*, 2010).

I.G.1.1. Organización social

El comportamiento eusocial de *A. mellifera* se manifiesta en su estructura comunal de castas y la división reproductiva del trabajo. Es decir, dentro de la colonia existen castas reproductivas (la reina y los zánganos) e individuos adultos de la casta no reproductiva (las obreras). Los individuos de las diferentes castas son fisiológica y morfológicamente diferentes (Figuras 1, 2 y 3). Una típica colonia de abejas melíferas está constituida por 10 a 40 mil abejas obreras, todas ellas hembras; desde ninguno a varios cientos de machos (zánganos) dependiendo la época del año; y una única reina, o hembra fértil (Winston, 1987). La reina (Figura 1) es el único individuo de la colonia capaz de poner huevos fecundados y es la principal responsable de mantener la cohesión de la estructura colectiva a través de sus feromonas (Winston, 1987). Los zánganos (Figura 2) representan al otro grupo reproductivo, cuyo rol consiste en aparearse con reinas vírgenes de otras colonias en las llamadas "Áreas de Congregación de Zánganos" (Galindo Cardona *et al.*, 2012; Withrow y Tarpy, 2018), después de lo cual mueren. El tercer grupo, la casta de hembras estériles, está representado por las obreras (Figura 3). Esta casta muestra un alto grado de coordinación y, a su vez, de descentralización en la realización de tareas dentro y fuera del nido (Lindauer, 1952; Winston, 1987; Seeley, 1995). En relación a este sistema de organización complejo y coordinado, la colmena ha sido definida por muchos autores como un súper organismo, dentro de la cual, cada individuo se encuentra altamente especializado y cumple una función específica, en estricta coordinación con las actividades desarrolladas por el resto de sus compañeros de nido.



Figura 1. Fotografía de un cuadro de cría de una colonia de *A. mellifera* que muestra en la región central a la reina rodeada de abejas obreras (izquierda) y una celda real (derecha). Se observan las diferencias en tamaño y morfología externa entre la reina y las obreras.



Figura 2. Fotografía de zánganos de *A. mellifera* sobre el panal (izquierda) y sobre la entretapa de una colmena (centro) y de celdas de cría de zánganos (derecha). Se observan las diferencias en la morfología externa entre zánganos y obreras y entre las celdas de cría de ambas castas.



Figura 3. Fotografía abejas obreras de *A. mellifera* sobre un panal con celdas de cría abierta y cría operculada.

I.G.1.2. Ciclo de Vida

Como la mayoría de los himenópteros, *A. mellifera* presenta un ciclo de vida haplo-diploide y un sistema de determinación del sexo de locus único y alelos complementarios, mediante el cual los huevos que han sido fertilizados se desarrollan en hembras y los que permanecen sin fertilizar se desarrollan en machos (Figura 4) (Woyke, 1962; Hoshiba y Kusanagi, 1978). Cuando la reina se aparea, tiene la capacidad de almacenar el esperma en un órgano especializado del aparato reproductor denominado espermateca. Una vez fecundada, la reina puede determinar el sexo de cada huevo liberando o no las células del esperma almacenado en el momento en que éste pasa a través del oviducto, dando lugar a huevos de obreras (diploides, $2n=32$) o de zánganos (haploides, $n=16$), respectivamente (Hoshiba y Kusanagi, 1978). Existen antecedentes de machos diploides previamente descritos en *A. mellifera*, aunque los mismos son eliminados de la colmena por las obreras (Woyke, 1962).

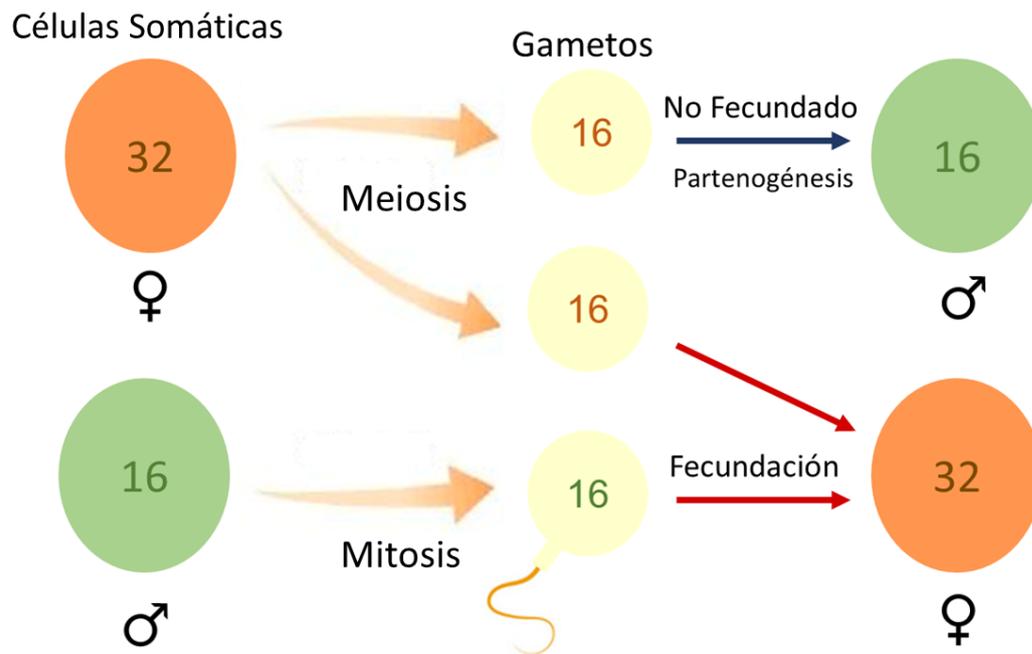
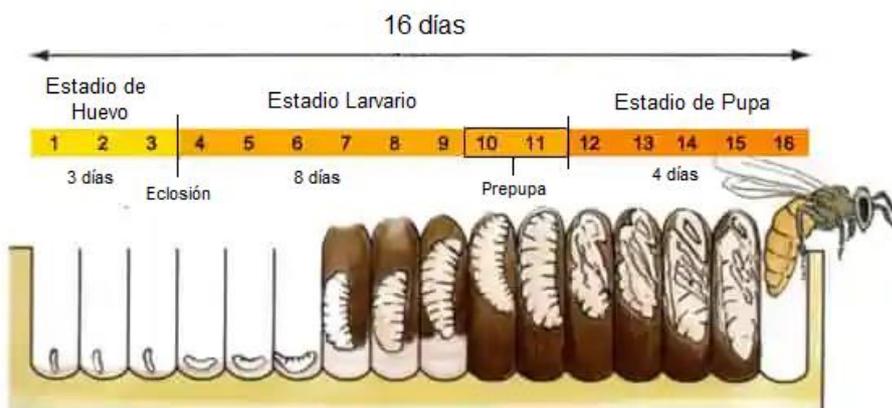


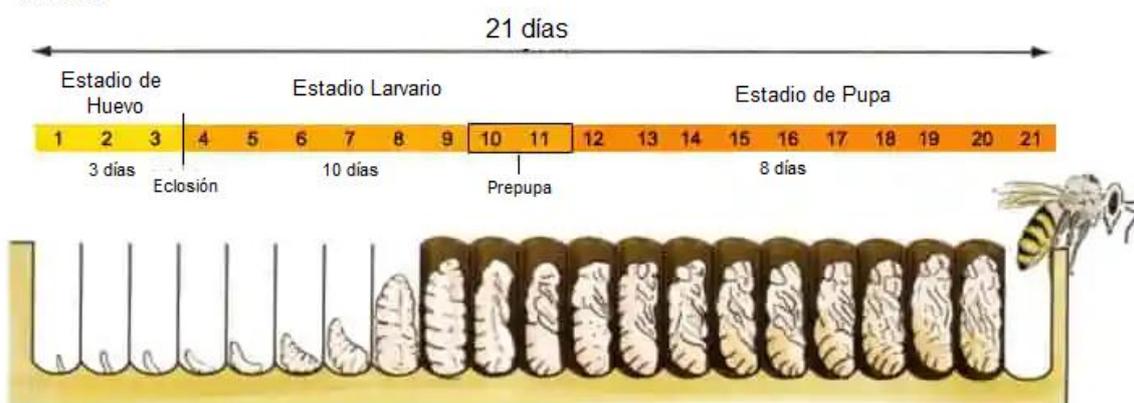
Figura 4. Determinación sexual en *A. mellifera*. Se indica sobre las gametas el número cromosómico. Figura realizada a partir de la información de Hasselmann *et al.* (2001).

A. mellifera es un insecto holometábolo, es decir, que durante su desarrollo atraviesa una metamorfosis completa. El ciclo de vida de esta especie comprende cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 5). Los huevos son alargados, de color blanquecino con un corion membranoso y son depositados por la reina en las celdas de cría dentro de la colonia (Figura 5). Las larvas eclosionadas son blanquecinas y mudan cinco veces durante su desarrollo (Wirtz, 1973; Rozen, 1991; Jean-Prost y Médori, 1994). Durante la pupación se produce una reorganización masiva de los tejidos y órganos, y luego de 8 a 14 días de empupado emerge el adulto que dará origen a una reina, un macho o una obrera (Cuadro 1; Figura 5).

Desarrollo de una Reina



Obrera



Zangano

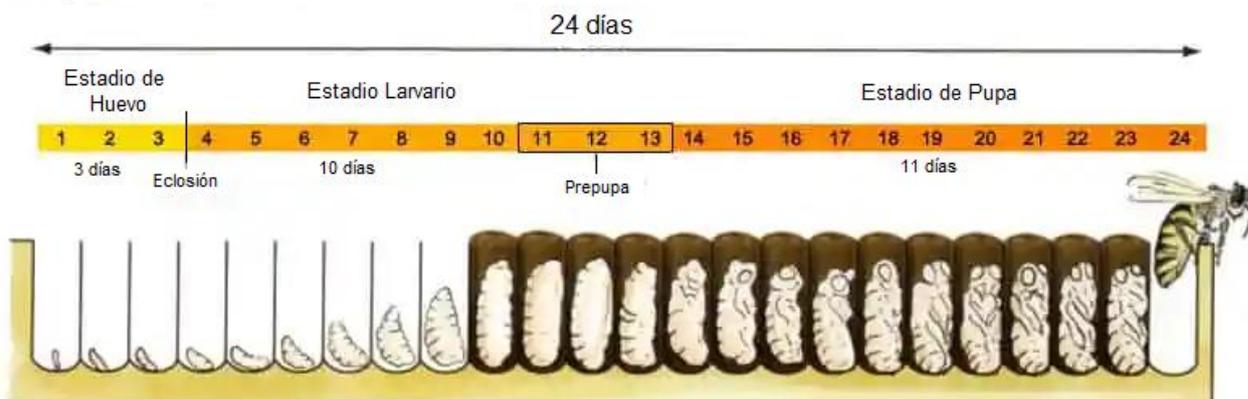


Figura 5. Ciclo de vida de las tres castas de *A. mellifera*. Se indica la duración en días. Tomado de Winston (1987).

La celda que dará origen a una reina es denominada celda real y tiene aproximadamente 2 a 2,5 centímetros de largo (Figura 1). Dichas celdas son de mayor tamaño que las celdas de cría de obreras y se ubican en posición vertical respecto al panal (Figura 1). Las abejas obreras nodrizas llenan esta celda con jalea real hasta el momento de su operculado (cerrado de la celda) en el día 8 del ciclo (Ulrich y Rembold, 1983; Evans y Wheeler, 1999) (Cuadro 1). Esta alimentación propicia la fertilidad de la abeja reina y su mayor tamaño. Una vez que emerge, pasado dos días la reina virgen comienza a hacer vuelos cortos para comenzar a reconocer el área y entre el séptimo y décimo día realiza los vuelos de fecundación (Brutscher *et al.*, 2019). Estos eventos tienen como finalidad el apareamiento de la reina con al menos 10 zánganos (Winston *et al.*, 1991). La reina se aparea con los zánganos en las denominadas Áreas de Congregación de Zánganos (Galindo-cardona *et al.*, 2012; Withrow y Tarpy, 2018) y a su regreso, deposita los huevos en forma individual y selectiva de acuerdo al tamaño de las celdas de cría. En celdas de mayor tamaño, pone huevos no fertilizados que darán lugar a los zánganos. En las demás celdas deposita huevos fecundados que, en función de la alimentación que reciban durante su etapa larval, podrán dar lugar a abejas obreras o a una futura nueva reina en el caso de orfandad o enjambrazón. Para mantener la cohesión de la colmena, la abeja reina emite una serie de feromonas que inhibe la producción de nuevas reinas. La esperanza de vida media de una abeja reina es de dos o tres años, aunque pueden llegar a vivir hasta cinco años (Winston *et al.*, 1991; Keeling *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Duración (en días) de las etapas del ciclo de vida de *A. mellifera* en cada casta. Se indica el momento del ciclo en que las celdas de cría son operculadas, el tiempo de desarrollo (TD), la edad de la madurez sexual (MS) y la longevidad en cada casta; a: años; d: días.

Casta	Huevo	Larva	Operculado	Pupa	TD	MS	Longevidad
Reina	3 d	5 d	7 ½ d	8 d	16 d	23 d	4 a
Obrera	3 d	6 d	9 d	12 d	21 d	-	65-120 d
Zángano	3 d	6 ½ d	10 d	14½ d	24 d	38 d	120 d

Las obreras constituyen la casta más numerosa dentro de la colonia (Hillyer, 2016; Jean-Prost, 1987). Desde la puesta del huevo fecundado, una obrera se desarrolla en 21 días (Cuadro 1, Figura 5). La eclosión del huevo da lugar a una larva que es alimentada con jalea real por obreras nodrizas durante tres días consecutivos. A partir del tercer día, las larvas son alimentadas con una mezcla de polen y miel hasta que la celda de cría es operculada (Cuadro 1, Figura 5). Las obreras, desde que emergen de

la celda de cría van pasando por distintas etapas de desarrollo fisiológico, cognitivo y cambios comportamentales dentro de la colmena. Durante su fase adulta, las obreras cumplen diversas funciones dentro y fuera de la colonia que varían con la edad, característica conocida como polietismo temporal (Winston, 1979). A edad temprana, las abejas se encargan de la construcción y mantenimiento de panales; luego se convierten en alimentadoras de la abeja reina y las larvas; posteriormente, se transforman en guardianas y se encargan de proteger la colonia de depredadores y evitar la entrada de abejas de colonias ajenas. Otra función de las abejas obreras es la de higiene y ventilación dentro de la colonia mediante la generación de corrientes de aire que mantienen estable la temperatura del nido. La conjunción de complejos procesos hormonales, nutricionales y de la regulación de la distribución de tareas dentro la población habilita la etapa final de la vida de una abeja obrera. A partir de los 20 días de edad, las abejas obreras se especializan en el pecoreo de polen, néctar, propóleo (Calderone y Page, 1988). Una abeja obrera puede llegar a volar hasta tres kilómetros de distancia durante estas tareas. Cuando encuentra una zona de pecoreo adecuada, regresa a la colonia y comunica mediante danzas la posición exacta de la zona con recursos. Las abejas obreras adultas tienen una menor longevidad que las reinas (Cuadro 1), su ciclo de vida puede limitarse a una determinada época del año (generalmente primavera y verano) y extenderse a 90-120 días en invierno (Wirtz, 1973; Evans y Wheeler, 1999). La mayor esperanza de vida que se observa en las abejas de invierno se debe a que, durante esta época, la postura de la reina decae significativamente, por lo que se debe garantizar la supervivencia de la colonia. Un estado de salud adecuado para enfrentar esta fase es clave para la supervivencia de la colonia.

Los zánganos se desarrollan en celdas más grandes que la de las obreras, a partir de huevos sin fecundar (Figura 2). Tienen un tiempo de desarrollo y una longevidad mayor que el de las abejas obreras (Cuadro 1; Figura 5). Dado que cumplen principalmente una función reproductiva (Winston, 1987), la producción de zánganos de una colonia se da principalmente en primavera, momento del año en que éstos copulan con reinas vírgenes de otras colonias para perpetuar su genética (Galindo-Cardona *et al.*, 2020). Con la llegada del otoño, disminuye la cantidad de alimento disponible y con ello la atención alimenticia de las obreras hacia los zánganos que, al no alimentarse, perecen. Esta casta se distingue visualmente de las obreras, dado que presentan mayor tamaño, un abdomen cuadrado y los ojos grandes y contiguos (Figura 2).

I.G.1.3. Taxonomía y origen

Las abejas melíferas se encuentran dentro del Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Hymenoptera, Familia Apidae y género *Apis*. Dicho género está conformado por otras 8 especies: *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. florea*, *A. nigrocincta*, *A. koschevnikovi*, *A. nuluensis*, *A. andreniformis* y *A. laboriosa* (Garnery *et al.*, 1991; Koeniger y Koeniger, 2000; Franck *et al.*, 2000; Le Conte y Navajas, 2008). Junto con *A. mellifera*, la otra especie explotada a nivel comercial, principalmente en China, es *A. cerana*, conocida comúnmente como abeja oriental. El resto de las especies del género, que no son explotadas comercialmente, se encuentran restringidas a su lugar de origen, ocupando distintas áreas boscosas del extremo oriente (Franck *et al.*, 2000).

A. mellifera fue clasificada por Carolus Linnaeus en el año 1758, y a partir de entonces, numerosos taxónomos describieron varias subespecies (Engel, 1999). Tradicionalmente, la taxonomía intraespecífica de *A. mellifera* se ha basado en la morfología externa (Cornuet *et al.*, 1975; Ruttner, 1988). Las subespecies también se describen como "razas geográficas" porque sus distribuciones corresponden a zonas geográficas distintas que incluyen regiones de clima tropical, subtropical y templado de África, Oriente Medio y Europa (Ruttner, 1988). Según Ruttner (1992), 26 subespecies de *A. mellifera* pueden ser reconocidas en base a caracteres morfológicos, biogeográficos, comportamentales y evidencias genéticas.

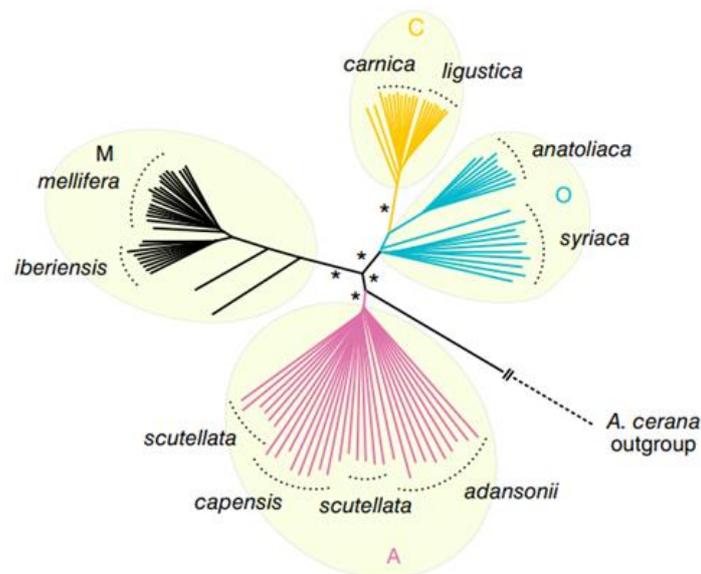


Figura 6. Relaciones filogenéticas entre las subespecies nativas de *A. mellifera* (*Neighbor-Joining*). Los asteriscos señalan los nodos que dan origen a los cuatro linajes principales (A, C, M y O). Modificado a partir de Wallberg *et al.* (2014).

Aunque el origen geográfico de *A. mellifera* aún está en discusión (Han *et al.*, 2012; Al-Ghamdi *et al.*, 2013; Cridland *et al.*, 2017), existe consenso sobre la existencia de cuatro linajes o líneas evolutivas principales: A (África), M (oeste y norte de Europa), C (este de Europa) y O (Medio Oriente) (Le Conte y Navajas, 2008), donde se agrupan las subespecies descritas (Figura 6). Más recientemente, se identificó un quinto linaje (Y) en el noreste de África y Oriente Medio (Franck *et al.*, 2001), y se informó de un posible sexto linaje adicional en Siria (Alburaki *et al.*, 2011; 2013). Las relaciones entre estos linajes, y las trayectorias evolutivas que dieron lugar a su diversificación en poblaciones geográficamente distintas, siguen sin estar totalmente claras. En particular, la región geográfica formada por Oriente Medio y el noreste de África contiene varias zonas de contacto entre los linajes A, O, Y y, potencialmente, otros linajes. Un estudio reciente, que incluyó el análisis genómico de 18 subespecies de *A. mellifera* nativas y dos en particular cuyos genomas fueron recientemente secuenciados, evidenció que éstas últimas constituyen grupos genéticos que justifican su clasificación como linajes distintos: *A. m. lamarckii* de Egipto (linaje L) y *A. m. unicolor* de Madagascar (linaje U) (Dogantzis *et al.*, 2021) (Figura 7). Estos autores presentaron también una propuesta sobre las relaciones filogenéticas entre estos 7 linajes (Figura 7).

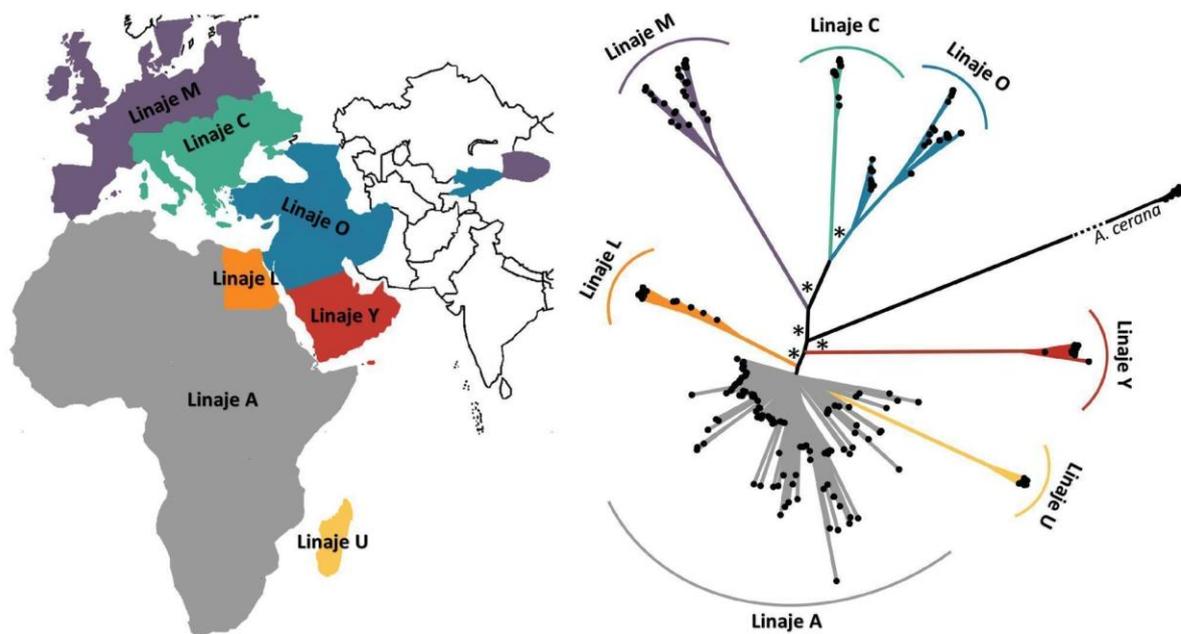


Figura 7. Mapa de distribución de los linajes evolutivos de *A. mellifera* según su origen geográfico (izquierda). Reconstrucción filogenética obtenida a partir del análisis de SNPs en muestras de 18 subespecies de *A. mellifera* (derecha) (Dogantzis *et al.* 2021).

I.G.1.4. Introducción en América

La abeja melífera fue introducida al continente americano, más precisamente en la isla de Santo Domingo, en los siglos XIV-XV durante la colonización española (De Jaime Lorén, 2003). Sin embargo, otras fuentes aseguran que fueron los Padres Dominicos los responsables de su introducción en el continente americano en el año 1536. Las abejas introducidas pertenecían al linaje M (*A. m. mellifera*). Posteriormente, se registraron introducciones de la especie *A. m. ligustica* (linaje C), aunque se desconoce la fecha exacta (Bierzzychudek, 1979).

Los primeros registros hacen mención de *A. mellifera* en Sudamérica hacia el año 1830, cuando arribaron a Colonia del Sacramento (Uruguay) las primeras colmenas de *A. m. mellifera* (linaje M) provenientes de Francia (Bierzzychudek, 1979). De forma simultánea, la subespecie *A. m. carnica* (linaje C) fue introducida en Río Grande do Sul (Brasil) por colonos alemanes. Posteriormente, en el año 1839, en ese mismo lugar, el padre Antonio Carneiro introdujo colonias de la subespecie *A. m. iberiensis* (linaje M) desde Porto (Portugal).

En Argentina, se produjeron sucesivas introducciones desde diferentes países y hacia distintas provincias. Por ejemplo, en el año 1855, se introdujeron desde Chile colonias de la especie *A. m. ligustica* en la provincia de Mendoza; en 1857 se enviaron a Gualeguaychú (Entre Ríos) 4 colmenas de *A. m. mellifera* provenientes de Montevideo (Uruguay) dando inicio a la multiplicación de este material en la zona (Bierzzychudek, 1979). La introducción de nuevos materiales vivos (reinas fecundadas y celdas reales) continuó durante el siglo XX, principalmente de *A. m. ligustica* o abeja italiana, preferida por su mansedumbre y productividad (Palacio y Bedascarrasbure, 1998), como así también las subespecies *A. m. carnica* y *A. m. caucasica* (Salizzi, 2014).

Las abejas africanas (linaje A), particularmente *A. m. scutellata*, fueron introducidas en Brasil en el año 1956 con fines de investigación, particularmente con el objetivo de desarrollar un programa de mejora genética generando híbridos con abejas de origen europeo que estuvieran mejor adaptados al clima tropical-subtropical (Kerr *et al.*, 1970, 1982; Bierzzychudek, 1979; Agra, 2018). Una liberación accidental de estas abejas africanas condujo al origen y establecimiento de poblaciones de origen híbrido (abejas de origen europeo y africano) expandiéndose por todo el continente, dando lugar al proceso conocido como “africanización”, que continúa hasta la actualidad (Winston, 1979; Agra *et al.*, 2018; Porrini *et al.*, 2020; Calfee *et al.*, 2020). Las abejas africanizadas se expandieron hacia el norte (América Central y Estados Unidos) y hacia el sur (norte de Argentina) (Winston, 1992; Schneider *et al.*, 2004), y fueron detectadas por primera vez en nuestro país en el año 1965 en la provincia de Misiones (Santis y Cornejo, 1968). Estas abejas se caracterizan por tener un alto comportamiento defensivo y una alta tasa de enjambrazón y abandono de la colmena, características no deseables en

la apicultura comercial (Taylor, 1977; Kerr *et al.*, 1982; Lobo Segura, 2000; Clarke *et al.*, 2002; Spivak *et al.*, 2019).

I.G.1.5. Importancia económica

Como se mencionó anteriormente, *A. mellifera* está considerado como un polinizador clave a nivel mundial, siendo esencial para la multiplicación de una gran cantidad de especies vegetales de interés agronómico (Burgett *et al.*, 2004). En efecto, muchos cultivos de frutas, semillas y frutos secos sufren una disminución del 90% del rendimiento sin los servicios de polinización efectuados por las abejas melíferas (Southwick y Southwick, 1992; Delaplane *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2007). Entre 1961 y 2006, la dependencia de la agricultura por los polinizadores se ha incrementado en un 50 y 62% en países desarrollados y países en desarrollo, respectivamente (Aizen y Harder, 2009), siendo *A. mellifera* el polinizador más ampliamente usado en monocultivos en todo el mundo (Watanabe, 1994).

La abeja melífera es también el principal productor de miel del mundo. La producción global de este alimento se estimó en 1,07 millones de toneladas métricas en el año 2007, representando un importante producto de consumo humano (Klein *et al.*, 2007). En la actualidad, Argentina juega un rol preponderante en el mercado mundial como país productor y exportador de miel con altos estándares de calidad, dado que el destino principal de la producción es la exportación (FAO 2018; Sánchez *et al.*, 2018; MAGyP, 2021). En términos productivos, el sector apícola aporta a la economía de nuestro país un ingreso anual superior a los 200 millones de dólares, con una producción media anual de 60.000 toneladas de miel natural (Fuente: FAO, MinAgro; <https://inta.gob.ar/>). Nuestro país presenta una amplia gama de condiciones para la producción de miel, lo que permite definir cuatro zonas principales de producción (zona de Buenos Aires, zona central, zona litoral y zona patagónica) (Salina *et al.*, 2021). En todo el país se cuenta con alrededor de 4.5 millones de colonias de abejas registradas y gestionadas por aproximadamente 26.000 apicultores. La actividad apícola estuvo históricamente concentrada en la pampa húmeda; en 1995, el 90% de la miel se producía en esa región (Bedascarrasbure, 1995). De acuerdo con los datos del RENAPA de 2020 la situación se mantiene en la actualidad y solo algunas de las provincias extrapampeanas han evidenciado un desarrollo sostenido. Lo anterior se debe en parte a que es necesario ajustar la tecnología a los ambientes subtropicales y que el cambio climático impacta fuertemente en ese tipo de ambientes.

Mientras que en el período 2000-2009 se produjeron en promedio 84.000 toneladas anuales de miel, en el período 2010-2013 la producción se redujo a un promedio de 68.000 toneladas anuales, evidenciando una disminución del 20% en el rendimiento de miel en las principales zonas productoras del país (Haberle, 2014; Sánchez, 2018; FAO 2018). La mortandad de colonias ha jugado un rol importante en la disminución del rendimiento en Argentina (Maggi *et al.*, 2016; Salina *et al.*, 2021),

como lo fue también en el contexto internacional (Brutscher *et al.*, 2016). Entre las hipótesis propuestas para explicar el aumento de la mortandad de las colonias de *A. mellifera*, se encuentran la interacción entre varios factores de estrés biótico y abiótico, como el impacto de pesticidas usados en la producción agrícola (contaminación indirecta), el uso de acaricidas en la producción apícola (contaminación directa), la subnutrición (causada por la reducción de la oferta floral), el cambio climático, y la mayor incidencia de enfermedades como virosis y parasitosis (Biesmeijer *et al.*, 2006; Goulson *et al.*, 2008; van Engelsdorp *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2009; Ellis *et al.*, 2010; Stanimirović *et al.*, 2019; revisado en Goulson *et al.*, 2015) (Figura 8). La disminución de colmenas de *A. mellifera* representa un riesgo serio para la estabilidad y rendimiento de los cultivos, y para el mantenimiento de la biodiversidad (Biesmeijer *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007; Aizen y Harder, 2009).



Figura 8. Factores de estrés asociados a la disminución de colmenas de *A. mellifera* en el mundo, que actúan generalmente de forma sinérgica. Basado en información revisada en Goulson *et al.* (2015).

IG. 1.6. Patógenos y su impacto

A pesar de la multiplicidad de factores involucrados en las pérdidas de las colmenas de *A. mellifera* a nivel mundial, la comunidad científica coincide en que ciertos patógenos (agentes infecciosos o parasitarios que ocasionan enfermedades) son una de las principales causas de mortalidad de las colonias de abejas (Genersch, 2010a; Stanimirović *et al.*, 2019). En particular, el ácaro ectoparásito *Varroa destructor*, es considerado la principal amenaza sanitaria para las abejas melíferas en todo el mundo (Genersch, 2010b; Le Conte *et al.*, 2010). La parasitosis producida por este ácaro tiene impacto directo sobre la inmunidad y nutrición de las abejas y la supervivencia de las colonias, e indirecto, ya que actúa como vector mecánico y biológico de varios virus. En particular, dos virus altamente asociados con las infestaciones de *V. destructor* son el virus de la parálisis aguda de las abejas (en inglés, *Acute bee paralysis virus*, ABPV) y el virus de las alas deformadas (en inglés, *Deformed wing virus*, DWV). Los síntomas de la infección por ABPV son parálisis, temblores, incapacidad para volar, oscurecimiento gradual y pérdida de pelo en el tórax y el abdomen, y la muerte prematura de las abejas asociada a una fuerte disminución de adultos en la colonia (de Miranda *et al.*, 2010). El DWV causa principalmente infecciones benignas sin signos de enfermedad cuando se transmite verticalmente (a través de zánganos y reinas) u horizontalmente (a través del alimento de las larvas). Sin embargo, cuando los ácaros se alimentan y reproducen en las celdas de cría de las abejas, transmiten el virus a la cría (transmisión vectorial), lo que provoca la deformación de las alas, decoloración, abdomen corto e hinchado y la muerte como pupas o poco después de emerger (de Miranda y Genersch, 2010).

Dos enfermedades bacterianas importantes desde el punto de vista económico, son la loque americana (AFB) y la loque europea (EFB). La AFB está causada por la bacteria *Paenibacillus larvae* y no sólo es letal para las larvas individuales, sino para colonias enteras de abejas melíferas (Genersch, 2010a). Las larvas de las abejas se infectan por ingestión de esporas de *P. larvae*, y/o restos de larvas infectadas (Forsgren *et al.*, 2008; Genersch, 2010a). La EFB, causada por la bacteria *Melissococcus plutonius*, es potencialmente letal para las colonias de abejas melíferas. Al igual que en el caso de la AFB, las larvas de las abejas se infectan al ingerir alimentos contaminados y suelen morir después de cuatro o cinco días (Forsgren, 2010; Genersch, 2010b).

La nosemosis es también una enfermedad que afecta el tracto digestivo de todos los adultos de la colonia (reina, obreras y zánganos) (Fries, 2010; revisado por Galajda *et al.*, 2021). Afecta la productividad y la supervivencia de las colonias, principalmente en climas templados (Higes *et al.*, 2008; Botías *et al.*, 2013; revisado por Marín-García *et al.*, 2022). Dicha enfermedad, causada por los parásitos intracelulares *Nosema apis* y *Nosema cerana*, reduce la longevidad de las obreras entre un 22% y un 44% (Aydin *et al.*, 2006; Lotfi *et al.*, 2009). Las esporas son las formas infecciosas de estos

parásitos, las cuales son ingeridas por las abejas durante la alimentación de miel, polen o agua contaminada. Se ha demostrado que la presencia de *N. ceranae* en asociación con otros patógenos como virus (Hartmann *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015) o *Varroa destructor* (Mariani *et al.*, 2012) incrementa la pérdida de colmenas de *A. mellifera*, impactando significativamente en la producción de miel y la polinización de los cultivos (Fries *et al.*, 2003).

I.G. 2. Generalidades de *Varroa destructor*

I.G. 2.1. Ciclo de vida

El ácaro *Varroa destructor* Anderson y Trueman (Acari: Varroidae) es un ectoparásito obligado de las abejas melíferas. El ciclo de vida de *V. destructor* está estrechamente relacionado con el de su hospedador (Sammataro *et al.*, 2000; revisado en Rosenkranz *et al.*, 2010; Nazzi y Le Conte, 2016 y Traynor *et al.*, 2020). Las hembras de *V. destructor* presentan dos fases en su ciclo de vida, una fase forética o dispersiva, que transcurre sobre las abejas adultas, y una fase reproductiva, que ocurre dentro de las celdas de cría de obreras y zánganos (Figura 9). Los machos y los estados inmaduros (deutoninfas y protoninfas) de *V. destructor* (Figura 10) tienen una vida corta y solo son encontrados dentro de las celdas de cría operculada (no presentan fase forética).

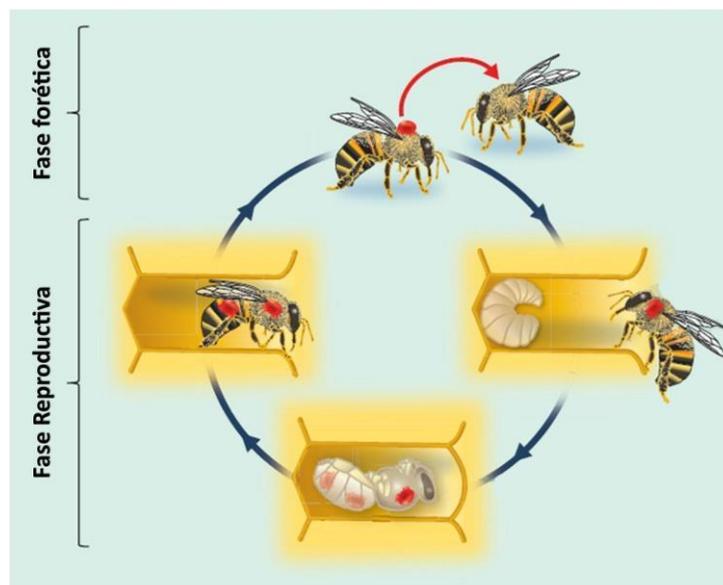


Figura 9. Esquema del ciclo de vida de *V. destructor* sobre su hospedador, *A. mellifera*. Modificado a partir de Nazzi y Le Conte (2016).



Figura 10. *V. destructor* en estado forético (arriba). Morfología externa de una hembra, un macho y un estadio inmaduro (deutoninfa) del ácaro (abajo, de izquierda a derecha). Fotografía tomada con un microscopio Olympus BX40 con un aumento de 40x.

La entrada de *V. destructor* (hembra fundadora) a las celdas de cría ocurre justo antes de que éstas sean operculadas en el día 8-9 del desarrollo de la abeja (larva de quinto estadio o L5) (Figura 11).

Después de invadir una celda de cría, la hembra fundadora se moviliza entre la larva y la pared de la celda y llega al fondo de ésta, donde se queda inmóvil en el alimento (Figura 11) (revisado en Rosenkranz *et al.*, 2010). Este comportamiento del ácaro sería una adaptación para minimizar la remoción de la cría parasitada por parte de las abejas nodrizas, ya que, antes y durante el operculado, éstas inspeccionan con frecuencia las celdas de cría.

Luego del operculado de la celda, la hembra fundadora perfora un agujero (100 μm) en la cutícula del quinto segmento de la abeja (prepupa) para crear un sitio de alimentación para ella y la futura descendencia (Donzé y Guerin, 1994; Kanbar y Engels, 2003; Li *et al.*, 2019) (Figura 11). Este sitio de alimentación permanece abierto debido a los anticoagulantes presentes en la saliva de los ácaros y la supresión de la cicatrización de la herida del huésped (Richards *et al.*, 2011).

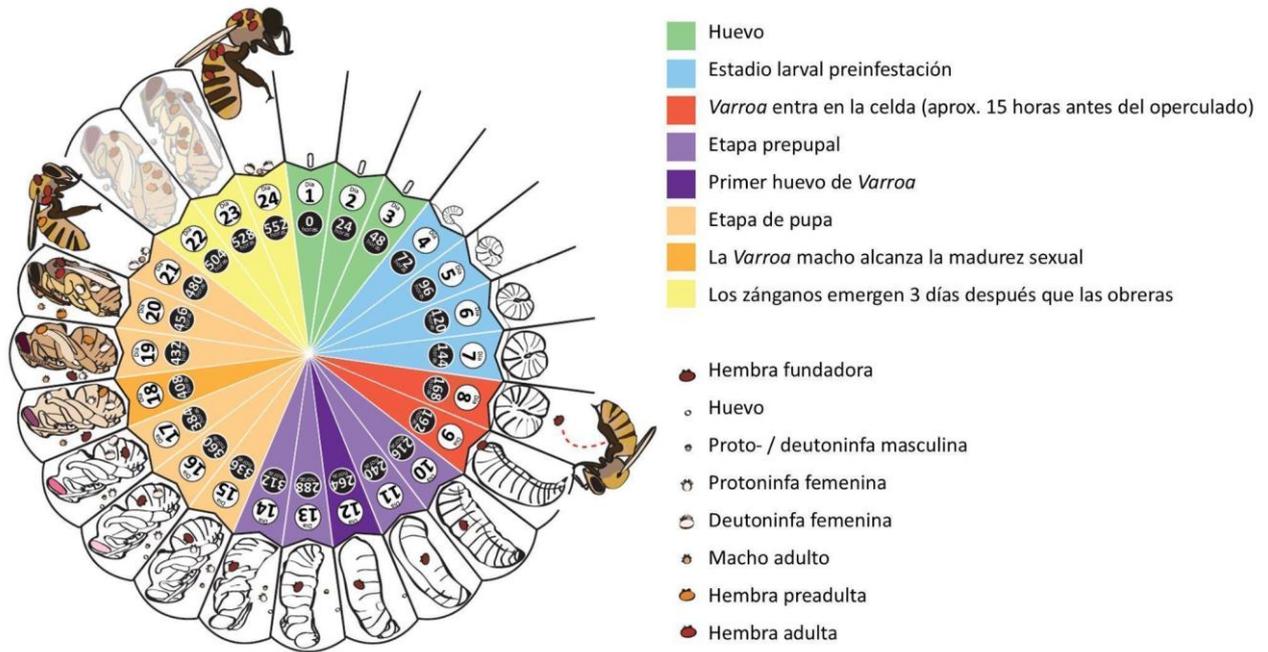


Figura 11. Esquema del ciclo reproductivo de *V. destructor* sobre su hospedador, *A. mellifera*. Modificado a partir de Evans y Cook (2018).

La hembra fundadora deposita el primer huevo haploide, que dará origen a un macho, aproximadamente 60-70 horas después del ingreso a la celda de cría (Donzé y Guerin, 1994). A partir de ese momento, la hembra fundadora pone un huevo diploide cada 30 horas, que dará origen a hembras hijas (Rehm y Ritter, 1989; Ifantidis, 1990; Martin, 1994). Desde la eclosión del huevo hasta que el adulto muda, la descendencia del ácaro pasa por las etapas de proto y deutoninfa (Figuras 10 y 11), siendo el tiempo de desarrollo de aproximadamente 5.8 y 6.6 días para los ácaros hembra y macho, respectivamente (Rehm y Ritter, 1989; Ifantidis, 1990; Martin, 1994; Donzé y Guerin, 1994). La progenie de *V. destructor* alcanza la madurez sexual inmediatamente después de la última muda, una vez alcanzada esta etapa el macho copulará con sus hermanas. Las hembras hijas maduras se acoplan a la abeja cuando emerge de la celda e inician su fase forética hasta el momento de invadir una nueva celda para reproducirse (Figura 11). En condiciones de campo, cada hembra tiene un promedio de 1.5 a 3 ciclos reproductivos (revisado en Rosenkranz *et al.*, 2010 y Traynor *et al.*, 2020). Si el macho muere, las hembras hijas emergen sin aparearse. Durante su primer ciclo reproductivo, estas hembras vírgenes pueden poner huevos haploides y luego aparearse con su hijo (Häußermann *et al.*, 2020).

IG. 2.2. Detección y dispersión en Sudamérica

El ácaro *V. destructor* fue detectado por primera vez en América del Sur (Paraguay) cuando apicultores de la zona adquirieron reinas de *A. mellifera* provenientes de Japón (De Jong *et al.* 1982), lo que condujo a una posterior invasión del ácaro en el territorio argentino (Montiel y Piola, 1976). El ácaro fue detectado por primera vez en Argentina en 1976, en la provincia de Formosa (Figura 12), limitando con la frontera con Paraguay (Maggi *et al.*, 2012). Desde su introducción, *V. destructor* se ha dispersado por todo el territorio, infestando actualmente con alta prevalencia las colonias de *A. mellifera* de nuestro país (Eguaras y Ruffinengo, 2006; Vandame y Palacio, 2010; revisado por Maggi *et al.*, 2016; SENASA, 2020).

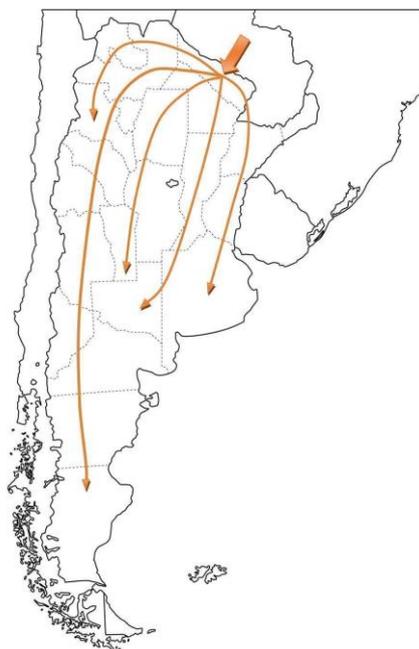


Figura 12. Posible ruta de introducción y dispersión de *V. destructor* en Argentina, de acuerdo a lo descrito en De Jong *et al.* (1982) y Montiel y Piola (1976).

I.G. 2.3. Origen y distribución

El ácaro *V. destructor*, que originalmente parasitaba a la abeja oriental, *A. cerana*, sufrió un cambio de hospedador hacia *A. mellifera* alrededor de la década de 1950 y a partir de allí se expandió rápidamente por Europa, África, América y la región asiática del Pacífico (Oldroyd, 1999). En el año 1957, *A. mellifera* ya se había convertido en hospedador de *V. destructor* en Japón, y en 1963 en Hong Kong. Su rango se expandió rápidamente a través del comercio mundial de abejas melíferas, tanto legal como ilegal, y probablemente a través de enjambres que viajaron en los barcos. En menos de medio siglo, *V. destructor* se extendió a todas las regiones donde los humanos manejan colonias de *A. mellifera*, a excepción de algunos territorios extremos del norte e islas remotas como los archipiélagos de Seychelles y Comoras (Figura 13) (revisado en Traynor *et al.*, 2020).

Aún luego del cambio de hospedador, *V. destructor* era conocido bajo el nombre específico de *V. jacobsoni*, una especie morfológicamente similar que parasita *A. cerana* en Indonesia (Oudemans, 1904). No fue hasta el año 2000 que, mediante un exhaustivo estudio morfológico y molecular, se detectó que se trataba de dos especies diferentes (Anderson y Trueman, 2000). De los ocho haplotipos mitocondriales que se han descrito para *V. destructor*, solo dos parasitan con éxito colonias de *A. mellifera*: los haplotipos K y J. Se cree que el haplotipo K cambió por primera vez de *A. cerana* a *A. mellifera* cerca de la ciudad de Vladivostok (al norte de la península de Corea), mientras que el haplotipo J dio un salto similar a finales de la década de 1950 tras la introducción de *A. mellifera* en Japón (De Guzmán y Rinderer, 1999; revisado en Navajas *et al.*, 2010).

En la actualidad el haplotipo K alcanza una distribución prácticamente cosmopolita (Figura 13) y es considerado el más virulento en relación al efecto negativo que tiene sobre las colonias que parasita (Delfinado-Baker, 1988; Navajas *et al.*, 2010). El haplotipo J, en cambio, se encuentra restringido a ciertas regiones de Japón, Tailandia y Sudamérica (Anderson y Trueman, 2000; De Guzman *et al.*, 1998; Garrido *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2008) (Figura 13).

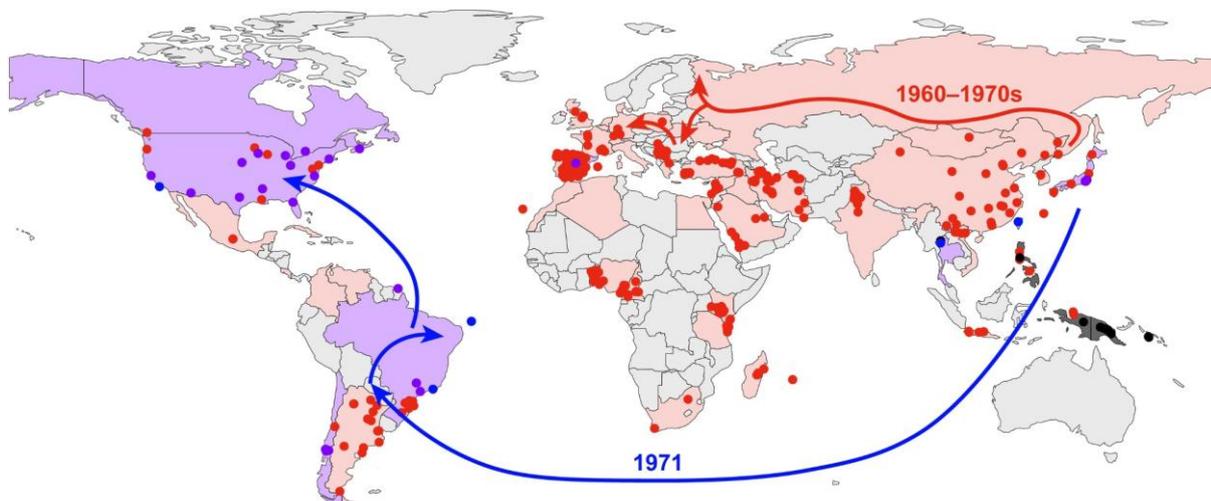


Figura 13. Distribución global de *Varroa destructor* (se muestra en rojo el haplotipo K1, en azul el haplotipo J1 y en violeta la co-ocurrencia de ambos haplotipos) y de *V. jacobsoni* (indicado con puntos negros). Las fechas roja y azul indican el cambio de hospedador y la posterior dispersión desde el lugar de origen de los haplotipos J1 y K1, respectivamente. Modificado a partir de Traynor *et al.* (2020).

I.G. 2.4. Impacto sobre *A. mellifera*

La enfermedad causada por *V. destructor* se conoce como varroosis y representa la mayor amenaza biológica para las colonias manejadas de *A. mellifera* en todo el mundo (Currie *et al.*, 2010; Dahle, 2010; Genersch *et al.*, 2010; Guzmán-Novoa *et al.*, 2010; Le Conte *et al.*, 2010; Nazzi y Le Conte, 2016; revisado por Flores *et al.*, 2021). Los síntomas más notables de la varroosis son debilidad de las colonias, la distribución irregular de la cría operculada y la presencia de celdas de zánganos y obreras con opérculos perforados. Además, las abejas parasitadas tienen menor peso corporal (Duay *et al.*, 2003) y longevidad en el estadio adulto (Amdam *et al.*, 2004), lo que ocasiona que la producción de cría y de miel se vea disminuida en las colmenas (Delfinado-Baker, 1988; Murilhas, 2002).

V. destructor no sólo produce efectos directos sobre el estatus nutricional de las abejas, sino que también actúa como vector biológico de patógenos virales y bacterianos (Sumpter y Martin, 2004; Antúnez *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2012; Brasesco *et al.*, 2021a; b; Yañez *et al.*, 2020; Salina *et al.*, 2021). De esta forma, la parasitación por *V. destructor* constituye un factor de estrés que afecta el sistema inmune de las abejas permitiendo que otros agentes patógenos se multipliquen sin control en las colonias (Le Conte *et al.*, 2010). La presencia de altos niveles de parasitación puede inducir la inmunosupresión en las pupas y los adultos parasitados y activar infecciones virales (Yang y Cox-Foster, 2007; Cournoyer *et al.*, 2022).

Hasta la fecha se han aislado más de 24 virus diferentes en abejas melíferas (Yañez *et al.*, 2020; Salina *et al.*, 2021). Existe evidencia de que *V. destructor* se comporta como vector mecánico y biológico del virus de las Alas Deformadas tipo B (DWV-B, del inglés: *Deformed Wing Virus*) y del virus de la Parálisis Aguda Israelí (IAPV, del inglés: *Israeli Acute Paralysis Virus*), y como vector mecánico del virus de la Parálisis Aguda (ABPV, del inglés: *Acute Bee Paralysis Virus*), del virus de las Alas Deformadas-A (DWV-A), del virus de Kashmir (KBV, del inglés: *Kashmir Bee Virus*) y del virus de la Parálisis Crónica (CBPV, del inglés: *Chronic Bee Paralysis Virus*) (revisado en Yañez *et al.*, 2020 y Salina *et al.*, 2021). Además, aunque todavía no hay resultados concluyentes, el ácaro también actuaría como vector de otros virus (Santillán-Galicia *et al.*, 2010; Daughenbaugh *et al.*, 2015; de Miranda *et al.*, 2015; Cornman, 2017; Levin *et al.*, 2017; Remnant *et al.*, 2017; Posada-Florez *et al.*, 2019; Dubois *et al.*, 2020). La combinación de *Varroa* y virus como KBV, ABPV o IAPV puede desencadenar graves pérdidas de colonias (Genersch y Aubert, 2010). Además, la sinergia entre el ácaro y DWV puede neutralizar las barreras inmunitarias de las abejas (Di Prisco *et al.*, 2016) y se considera una de las principales causas de pérdida de colonias en todo el mundo (Zhao *et al.*, 2019). La transmisión de *Varroa* es horizontal (entre individuos de una misma generación) y vertical (entre parentales y descendencia). Además, puede ser intra o intercolonial. Principalmente, la diseminación de este ácaro depende de un grupo de factores relacionados al comportamiento de la abeja como el pecoreo, pillaje, y la tendencia a enjambrar, que

a su vez están influenciados por factores genéticos y ambientales. Se podría decir que las prácticas apícolas son en parte responsables de mantener las formas más virulentas de los patógenos, especialmente porque contribuyen a su transmisión horizontal (Fries y Camazine, 2001). También, ciertas prácticas de manejo apícola, tales como tener colmenas trashumantes, no rotar los acaricidas o no realizar recambio de reinas constituyen factores de riesgo asociados a la varroosis (Giacobino *et al.*, 2016; 2017; discutido en Noël *et al.*, 2020 y Vilarem *et al.*, 2021).

I.G. 2.5. Control de la varroosis

Las medidas de control para mantener las poblaciones de *Varroa* por debajo del umbral de daño económico requieren de la implementación de diferentes estrategias. El umbral de daño es un parámetro de naturaleza económica y no biológica, y por lo tanto se aplica en las decisiones de manejo de colmenas con fines exclusivamente de producción y rentabilidad (Delaplane y Hood, 1999). El umbral de infestación, y con esto el impacto de *V. destructor* en las colonias, varía en función de factores ambientales (como los promedios de precipitaciones, la temperatura, la región geográfica y la disponibilidad de alimento), genéticos (como diferencias entre abejas africanizadas y europeas, y la presencia de comportamiento higiénico), y la interacción entre éstos (Wegener *et al.*, 2016; Dechatre *et al.*, 2021).

Uno de los principales métodos de control es la aplicación de acaricidas de síntesis (revisado en Noël *et al.*, 2020), los más difundidos son los productos a base de cumafós, flumetrina, fluvalinato y amitraz (organofosforados, piretroides y formamidina). Estos principios activos son aplicados tanto como productos comerciales aprobados y registrados, como productos caseros o artesanales (Eguaras y Ruffinengo, 2006). Su uso tiene ventajas, como su fácil aplicación y bajo costo. No obstante, son persistentes en el ambiente, se acumulan en propóleos, miel y ceras (Tremolada *et al.*, 2004; Premrov Bajuk *et al.*, 2017), constituyendo un riesgo para la salud humana y muchas veces el uso inadecuado de estos compuestos, al no rotarse o aplicarse de manera inapropiada, aceleran el desarrollo de poblaciones de ácaros resistentes (Wallner y Fries, 2003; Maggi *et al.*, 2009; 2010; revisado en Mitton *et al.* 2022). En Italia, Francia, Israel y Estados Unidos se han detectado casos de resistencia por parte del ácaro al fluvalinato y al cumafos (Lodesani *et al.*, 1995; Elzen *et al.*, 1999; Pettis, 2004; Panini *et al.*, 2019). En Estados Unidos también se hallaron ácaros resistentes a amitraz, cumafos y fluvalinato (Sammataro *et al.*, 2000; 2005; Elzen y Westervelt 2002; Pettis, 2004; Rinkevich, 2020). Puntualmente, en Argentina, se detectaron poblaciones de ácaros resistentes al cumafos y al amitraz (Maggi *et al.*, 2009; 2010) y se hallaron residuos de estos acaricidas en la cera estampada que se utiliza en colmenas comerciales (Medici *et al.*, 2015). Así, es cada vez más frecuente detectar una disminución de la eficacia de dichos productos, con la aparición de focos de resistencia tanto a nivel local (Ruffinengo,

2010; Medici *et al.*, 2015; Conlon *et al.*, 2019) como mundial (Rosenkranz *et al.*, 2010; Rinkevich, 2020; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2021), disminuyendo la disponibilidad de acaricidas efectivos para el control de esta parasitosis. Esto ha promovido la búsqueda de nuevas moléculas que minimicen estas desventajas. Ácidos orgánicos, aceites esenciales y sus componentes se han convertido en una valiosa alternativa (Ruffinengo *et al.*, 2014; Maggi *et al.*, 2016b; Iglesias *et al.*, 2020; Giménez-Martínez *et al.*, 2022; Iglesias *et al.*, 2022; revisado en Vilarem *et al.*, 2021). En nuestro país, se han evaluado acaricidas orgánicos que reducen significativamente las poblaciones del ácaro (Eguaras *et al.*, 2001; 2004; Bulacio Cagnolo *et al.*, 2010; Ruffinengo *et al.*, 2014; Martínez Fhurer y Lopez, 2018), y que minimizan la aplicación de acaricidas de síntesis. Estos acaricidas orgánicos tienen bajo riesgo de persistencia y acumulación, no contaminan la miel (Bogdanov, 2006) y presentan baja probabilidad de desarrollar resistencia en el parásito (Rosenkranz *et al.*, 2010). Sin embargo, su utilización no alcanza para mantener bajos niveles de varroosis en colmenas comerciales durante todo el año y por lo tanto, no se ha podido aún prescindir del uso de acaricidas de síntesis para el control de *V. destructor* en nuestro país, particularmente en climas templados.

I.G. 2.6. Relación parásito-hospedador

El equilibrio en la relación parásito-hospedador puede ser crucial para el bienestar del hospedador tanto a nivel individual (inmunidad) como a nivel poblacional (diversidad genética) (Daszak *et al.*, 2000). Las adaptaciones que llevan a la coexistencia entre ambas especies pueden ocurrir tanto en las abejas como en las poblaciones de ácaros (Fries y Bommarco, 2007; Oddie *et al.*, 2018). En este sistema huésped-parásito, el huésped u hospedador puede emplear dos estrategias diferentes para defenderse de los parásitos: resistencia y tolerancia (Råberg *et al.*, 2007). La tolerancia se define como la capacidad de reducir el efecto causado por una carga parasitaria determinada, mientras que la resistencia es la capacidad de reducir o limitar la carga parasitaria. En la mayoría de los casos la resistencia y la tolerancia están correlacionadas (Lipsitch *et al.*, 1996, Råberg *et al.*, 2007; Schmid Hempel, 2011). En las abejas, la tolerancia implica la capacidad de reacción frente a *V. destructor* y la habilidad de coexistir con los ácaros sin que éstos influyan en forma negativa en la supervivencia, tamaño poblacional, estado sanitario y productividad de la colmena en un ambiente y sistema de manejo determinados (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2001; Büchler *et al.*, 2010). Por otro lado, las colonias de abejas pueden presentar mecanismos de defensa activos que les permite mantener la población del ácaro dentro de los límites aceptables para no producir daño dentro de la colonia, tal como ocurre en *A. cerana*, donde la relación huésped - parásito se encuentra en equilibrio (Ruttner y Hänel, 1992; Boecking y Ritter, 1994) y las colonias presentan resistencia a *V. destructor* (Le Conte *et al.*, 2020; Grindrod y Martin, 2021). Como contraparte de esta interacción, el parásito despliega un

conjunto de estrategias que le permite evadir el ataque del hospedador, sobrevivir y multiplicarse. En particular, las estrategias de los microparásitos se basan fundamentalmente en un tamaño corporal menor, la alimentación sin eliminación del hospedador, y un ajuste en su ciclo de vida para reproducirse y lograr evadir las defensas del hospedador (Poulin, 2007). Dentro de esta categoría y para nuestro sistema de estudio, *V. destructor* presenta adaptaciones al parasitismo entre las que se destacan la selección de hospedadores de acuerdo con la edad y/o función de las abejas (Calderone *et al.*, 2002; Pernal *et al.*, 2005) y sofisticadas estrategias de mimetismo químico, que le otorgan a este parásito la capacidad para infiltrarse en un hospedador con una compleja estructura social como *A. mellifera* (Uboni *et al.*, 2012; Le Conte *et al.*, 2015; Nazi y Le Conte, 2016; Reams y Rangel, 2022).

La coevolución huésped-parásito puede conducir a una relación relativamente estable y dinámica entre los organismos participantes de la interacción, principalmente dada por la selección natural actuando en términos de cientos y miles de años, modelando no solamente los principales rasgos de los organismos por separado, sino también las propiedades de sus poblaciones (Poulin, 2007; Schmid Hempel, 2011). En la relación entre *V. destructor* y *A. mellifera*, los efectos de la selección natural sobre el aumento de la resistencia de las colonias frente a los ácaros se han visto limitados por las prácticas de manejo modernas asociadas a la aplicación de tratamientos sanitarios frecuentes con acaricidas de síntesis que reducen la presión selectiva natural necesaria para que tal proceso ocurra (Buchler *et al.*, 2010; Locke, 2011; 2016). Además, tal como se mencionó anteriormente, prácticas de manejo inadecuadas pueden llevar a una presión de selección que favorezca el desarrollo de nuevos mecanismos de evasión o resistencia por parte del parásito. Sin embargo, desde hace varios años y en diversas partes del mundo, se ha avanzado en la identificación y caracterización de poblaciones de abejas melíferas que logran sobrevivir en ausencia de acaricidas mediante la expresión de rasgos de resistencia o tolerancia a *V. destructor* (Figura 14) (Locke, 2016). La resistencia y/o tolerancia son características típicas de las abejas africanizadas de América del Sur y Central (Martín y Medina, 2004; Mondragón *et al.*, 2005; Rivera-Marchand *et al.*, 2012), aunque también hay registros de colmenas tolerantes y resistentes a *Varroa* en poblaciones de *A. mellifera* de América del Norte, Europa y otras partes del mundo (Fries *et al.*, 2006; Le Conte *et al.*, 2007; Seeley, 2007; Pritchard, 2016; Le Conte *et al.*, 2020).



Figura 14. Gráfico representativo de distribución global de las poblaciones de *A. mellifera* naturalmente sobrevivientes al ácaro *Varroa destructor* (extraído de Locke, 2016).

En este marco, numerosos programas de mejoramiento se han iniciado a nivel global para mejorar mediante selección natural o artificial la resistencia al ácaro en stocks específicos de abejas melíferas (revisado por Guichard *et al.*, 2020). Tales desarrollos se han basado en la identificación de los rasgos que caracterizan a estas poblaciones y además, han permitido entender más acerca de la coevolución parásito-hospedador.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Estudiar de una forma integral el comportamiento de acicalamiento (*grooming*) de *A. mellifera* hacia *V. destructor* tanto a nivel individual como de colmena, explorando sus bases genéticas y los factores que influyen en su expresión. Con la información obtenida se propone analizar el impacto de este carácter sobre la supervivencia de las colonias al ácaro y su posible uso como marcador fenotípico y blanco de selección en programas de mejoramiento genético apícola, en soporte a la identificación, caracterización y conservación de stocks de abejas que presenten resistencia a *Varroa*, característica deseable para la apicultura en nuestra región.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar a nivel comportamental y genético colmenas de *A. mellifera* adaptadas a clima subtropical que sobreviven naturalmente a la parasitosis causada por *V. destructor*.
- 2) Estudiar el comportamiento de *grooming* (CG) de abejas individuales pertenecientes a las colmenas de *A. mellifera* analizadas en el objetivo 1, que resulten contrastantes para dicho carácter.
- 3) Explorar las bases genéticas del CG mediante el análisis de la expresión de genes candidatos asociados a este carácter en las abejas que mostraron resultados contrastantes en el estudio de expresión fenotípica individual.

Hipótesis

1. Existe variabilidad fenotípica para el comportamiento de *grooming* en colmenas argentinas adaptadas a clima subtropical y es posible evaluar este rasgo a campo y en el laboratorio.
2. El CG está asociado a la resistencia de *A. mellifera* a *V. destructor* y existe una correlación positiva entre el grado de dicho comportamiento y la supervivencia de las colonias.
3. Las abejas de colmenas sobrevivientes despliegan una respuesta de limpieza frente al ácaro más intensa respecto a las abejas de colmenas susceptibles.
4. Existen diferencias en la respuesta de acicalamiento frente a *V. destructor* entre abejas de distintas edades.
5. Es posible identificar genes de *A. mellifera* cuya expresión diferencial esté asociada a diferencias en el comportamiento de *grooming* entre las abejas de colmenas sobrevivientes vs. susceptibles al ácaro.
6. La expresión de ciertos genes involucrados en el desarrollo neuronal y las actividades motoras, así como aquellos involucrados en la sensibilidad olfativa, modulan la expresión del comportamiento de *grooming* y difiere entre abejas de colmenas sobrevivientes vs. susceptibles al ácaro.

Nota del Tesista

La motivación de la presente Tesis Doctoral resulta de la búsqueda de alternativas de manejo y control del ácaro *V. destructor* en colonias de *A. mellifera*, que resulten amigables con el ambiente y con las abejas. En función de esta motivación, diseñé bioensayos y apliqué diferentes aproximaciones conceptuales y metodológicas para la realización de los experimentos. Obtuve y analicé descriptiva y estadísticamente los datos a campo y de laboratorio, y abordé la discusión integral de los mismos. Considerando esto, en los capítulos que se desarrollan a continuación, y en función de cada uno de los objetivos específicos propuestos, organicé la presente Tesis en una Introducción General, que contiene los antecedentes sobre el modelo de estudio y el análisis del problema a abordar, tres capítulos y una Discusión General, donde se presentan las perspectivas y potencial aplicación de los resultados obtenidos. En cada capítulo, presento los antecedentes, explico las aproximaciones utilizadas y metodologías aplicadas, y analizo los principales resultados obtenidos. En el primer capítulo, se presenta el análisis y discusión de los resultados de la caracterización poblacional, comportamental y genética de un material apícola, establecido en clima subtropical, que presenta alta tasa de sobrevivencia invernal y caída natural de *V. destructor*, y es considerado promisorio en su desempeño frente a la varroosis. Estas colonias son el insumo biológico que analizo en los capítulos siguientes de la Tesis. En el capítulo dos, presento la descripción y análisis del comportamiento de *grooming* a nivel individual en abejas de las colonias sobrevivientes y susceptibles, consideradas como control. Las abejas ensayadas son insumo para los experimentos presentados en el último capítulo (3), donde analizo el nivel de expresión de genes candidatos asociados al comportamiento de *grooming* y discuto su potencial aplicabilidad como marcadores moleculares para asistir a la selección de colonias resistentes a *V. destructor*.

Hacia el final de la Tesis, presento una Discusión General para integrar los conocimientos generados de forma holística y discutir su relevancia en el desarrollo de técnicas integradas de control de la varroosis. La información aquí generada contribuye a aumentar nuestro conocimiento sobre este complejo sistema de estudio y en un futuro, a minimizar el impacto de la enfermedad en las colonias de *A. mellifera* en clima subtropical y a promover el desarrollo apícola en nuestro país.

Quiero destacar que si bien yo misma he plasmado todas las ideas que he tenido (buenas y malas), y ejecutado todos los ensayos, nunca lo hice sola. He tenido personas incondicionales a mi lado que han seguido mis locuras siempre y, que sin ellas, este trabajo no hubiera sido posible. Por esta razón, me parece muy importante incluirlas, aunque no sea con sus nombres, pero sí en el espíritu de la redacción.

CAPÍTULO 1.

**Caracterización integral a campo de
colmenas de *Apis mellifera* que
sobreviven naturalmente a
*Varroa destructor***

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Caracterización genética de poblaciones de *A. mellifera*

Los marcadores de ADN mitocondrial han sido una de las primeras herramientas moleculares empleadas para estudios filogenéticos en *A. mellifera* (Smith, 1991; Garnery, 1992; Garnery y Cornuet, 1994) y han permitido confirmar la presencia de distintos linajes evolutivos (Arias y Sheppard, 1996; Franck *et al.*, 2000). Resultados similares se obtuvieron mediante el análisis con marcadores SSR (del inglés, *Simple Sequence Repeats*) o microsatélites (Estoup *et al.*, 1995; Franck *et al.*, 2001). Estas herramientas han sido igualmente útiles para estudiar la diversidad genética y la estructura poblacional de las colonias de *A. mellifera* en América. Si bien originalmente las abejas que ingresaron al continente americano eran europeas (Hall y Smith, 1991; Sheppard *et al.*, 1991), la introducción de la abeja africana *A. m. scutellata* en Brasil (Kerr, 1957) y la subsecuente hibridización (africanización) ha provocado un cambio profundo en la estructura genética de las razas o ecotipos de abejas en América (Schiff y Sheppard, 1993; Sheppard *et al.*, 1999; Agra, 2018; Agra *et al.*, 2018; Porrini *et al.*, 2020; Calfee *et al.*, 2020), evidenciado mediante la aplicación de estas herramientas.

1.1.1.1 Marcadores moleculares del ADN mitocondrial

La técnica de PCR-RFLP (del inglés, *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) es la principal herramienta utilizada para el análisis de variaciones en el ADNmt en abejas. La aplicación de esta técnica permite analizar la variabilidad genética mediante la amplificación de una región específica del ADNmt y su digestión con enzimas de restricción. Uno de los marcadores mitocondriales más utilizados para el análisis de la variabilidad genética de las poblaciones de *A. mellifera* es la región intergénica entre los genes *citocromo oxidasa I* y *citocromo oxidasa II* (*cox1-cox2*). Este marcador presenta al menos siete variantes en su longitud que pueden ser explicadas por la combinación de tres secuencias relacionadas: la secuencia Po con una longitud de 67 pb, la secuencia P (de 54 pb) y la secuencia Q (de 192-196 pb) (Figura 15). Esta última se encuentra presente en todas las subespecies y se divide en tres regiones según su similitud de secuencias nucleotídica con las zonas genómicas adyacentes: Q1 es similar al extremo 3' del gen *cox1*, Q2 es similar al gen del ARN de transferencia del aminoácido leucina (ARNt leu) y Q3, a la secuencia P (Cornuet *et al.*, 1991). Las diferentes combinaciones de estas secuencias generan las siguientes variantes: PoQ, PoQQ y PoQQQ, que son características del brazo evolutivo A; las secuencias PQ, PQQ y PQQQ, representativas del brazo M; y las secuencias que incluyen solo Q y corresponden al brazo evolutivo C (Garnery *et al.*, 1993) (Figura 15).

Estas secuencias acumulan gran cantidad de mutaciones, deleciones e inserciones que generan polimorfismos evidenciados en forma rápida y sencilla por medio de enzimas de restricción, entre

ellas, la más utilizada es *Dra* I, pero también *Hinf* I (Agra *et al.* 2018) y *Eco*R1 (Arias y Sheppard, 1996) que sirven para la determinación de diferentes haplotipos.

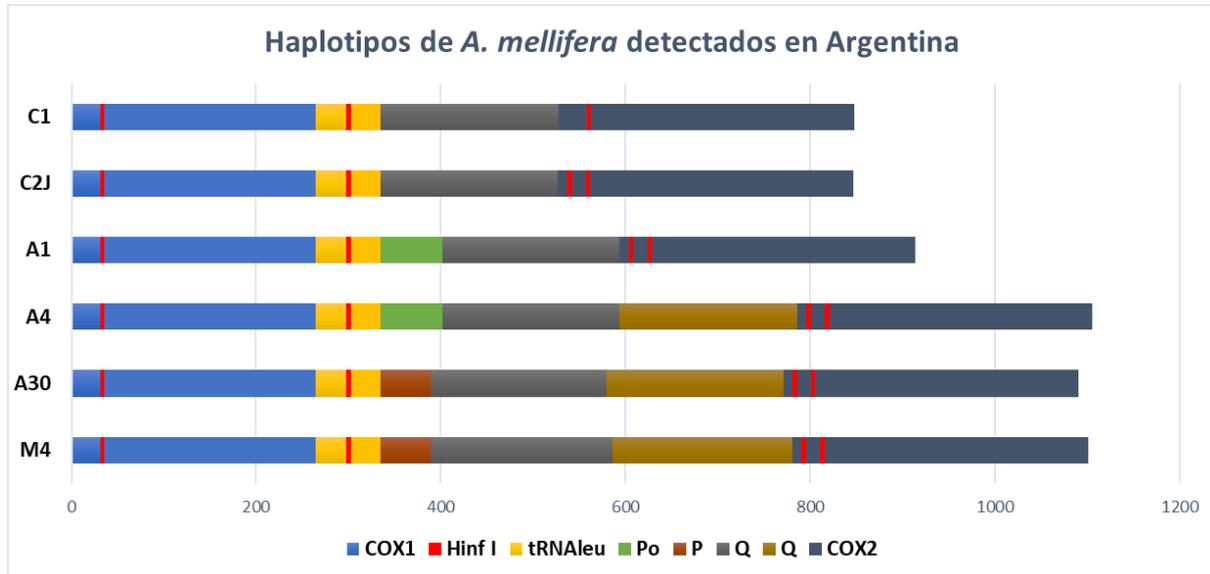


Figura 15. Esquema de los haplotipos mitocondriales de *A. mellifera* detectados en la Argentina de acuerdo a Agra *et al.* (2018). En el esquema se muestra la región intergénica *citocromo oxidasa I* y *citocromo oxidasa II* (*cox1-cox2*) comúnmente analizada para la determinación del linaje mitocondrial y con líneas rojas se indican los sitios de restricción de la enzima *Hinf* I.

1.1.1.2 Antecedentes de caracterización genética en Argentina

En el año 1991, Sheppard y colaboradores realizaron los primeros trabajos de caracterización molecular con el análisis del ADN mitocondrial de abejas provenientes de distintas regiones, mediante la técnica de PCR-RFLP. Los autores registraron una zona de saturación donde solo detectaron abejas africanizadas, una zona de colonización permanente o zona de transición, caracterizada por una compleja hibridación entre abejas de origen europeo y africano, y una zona de colonización temporaria donde las abejas africanizadas solo se encontraban en los meses de primavera y verano (Figura 16), patrón que confirmó posteriormente Abrahamovich *et al.* (2007) en poblaciones de la provincia de Buenos Aires.

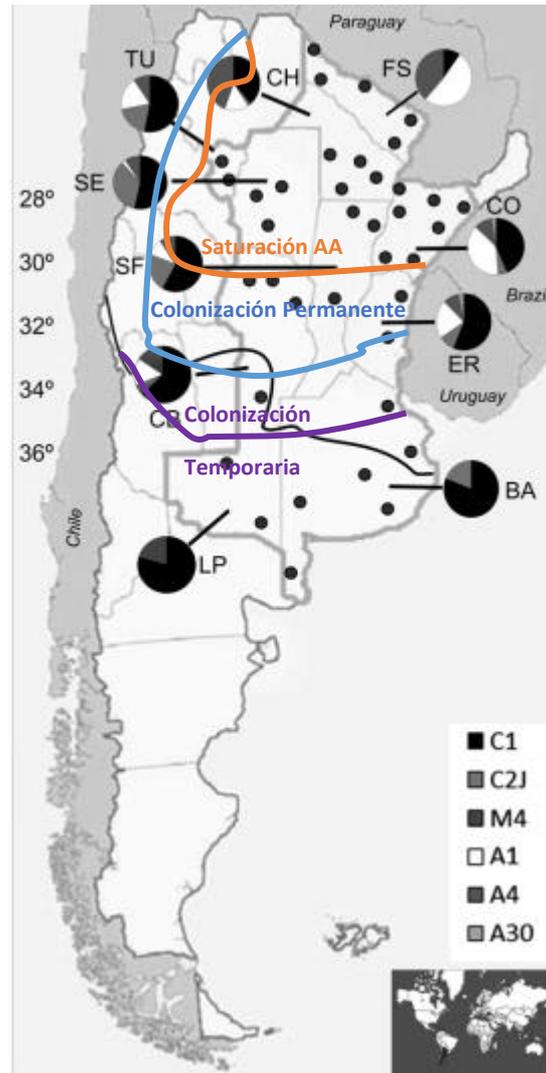


Figura 16. Distribución geográfica de los haplotipos mitocondriales detectados en poblaciones argentinas de *Apis mellifera* según Agra et al. (2018). Los puntos negros indican los sitios de muestreo (colonias silvestres y comerciales). El gráfico de torta en cada provincia representa la frecuencia de los seis haplotipos mitocondriales encontrados (C1, C2J, M4, A1, A4 y A30). La línea negra indica la isoterma anual de 16 °C. Se muestran en líneas de colores la distribución de la africanización en Argentina de acuerdo a los primeros resultados de Sheppard et al. (1991): la línea naranja indica el límite de saturación de abejas africanizadas (AA); la línea celeste señala el límite de la zona de colonización permanente de las AA; y la línea púrpura, el límite de colonización temporal de las AA. Figura modificada a partir de Agra et al. (2018)

Recientemente se realizó un estudio extensivo y actualizado sobre la variabilidad genética de colonias de abejas establecidas en las principales regiones del país, mediante la utilización tanto de marcadores mitocondriales como nucleares (Agra *et al.*, 2018). Estos autores detectaron un total de 6 haplotipos mitocondriales, dos pertenecientes al brazo evolutivo C (C1 y C2j), uno perteneciente al brazo M (haplotipo M4) y tres pertenecientes al brazo evolutivo A (A1, A4 y A30) (Figura 16). Además, de forma consistente a los primeros resultados obtenidos, los autores detectaron una clina latitudinal de norte a sur para el nivel de africanización, identificándose una distribución preponderante de haplotipos africanizados en el norte de Argentina y europeos hacia el centro/sur del territorio (Agra *et al.*, 2018).

1.1.2. Dinámica de *V. destructor* en colonias de *A. mellifera*

El conocimiento de la dinámica de las poblaciones de *V. destructor* es fundamental para lograr un adecuado control de la parasitosis y determinar los puntos críticos en los cuales se deben tomar decisiones de manejo para evitar el colapso de las colonias de *A. mellifera*. Debido a esto, el estudio de la dinámica poblacional de *Varroa* ha sido el objetivo de numerosas investigaciones alrededor del mundo (Vandame *et al.*, 1994; Fries *et al.*, 1994; Mayagoitia Penagos y Otero Colina, 1995; Fries y Rosenkranz, 1996; Wilkinson y Smith, 2002; Vizintini *et al.*, 2021). Este parásito sólo puede completar su ciclo de vida dentro de la colonia por lo que está íntimamente ligado al desarrollo biológico de su hospedador (Orantes Bermejo y García Fernández, 1994; Rosenkranz *et al.*, 2010; Traynor *et al.*, 2020), así es como las variaciones en el microambiente de la colonia pueden influir en su reproducción y en el crecimiento de sus poblaciones (Eguaras y Ruffinengo, 2006). Por ejemplo, la cantidad y la disponibilidad de celdas de cría, la proporción de zánganos y obreras, y la cantidad de abejas adultas dentro de la colonia en diferentes momentos condicionan el crecimiento de las poblaciones de *V. destructor* (Fries *et al.*, 1994; Boot *et al.*, 1995; Calis *et al.*, 1999; Wilkinson y Smith, 2002). La totalidad de ácaros presentes dentro de la colmena, la deriva, el pillaje y otros factores propios de las colonias, como la tendencia a enjambrar, constituyen aspectos importantes que también influyen en la dinámica poblacional del parásito (Rosenkranz *et al.*, 2010). En general, la población de *Varroa* tiende a crecer exponencialmente hasta alcanzar una fase, a partir de la cual, comienza a descender rápidamente al igual que la población del huésped (Eguaras, 1993; Branco *et al.*, 1999; revisado en Traynor *et al.*, 2020) (Figura 17). Sin embargo, esta tendencia, puede cambiar de acuerdo con las características genotípicas y fenotípicas de las abejas y a la ubicación geográfica de las colonias huésped.

El ecotipo (población adaptada a una determinada ecorregión) de las abejas melíferas y el clima son factores importantes que afectan el desarrollo de *V. destructor* (De Jong *et al.*, 1984; Moretto *et al.*, 1991, De Jong y Soares, 1997). Es así como, las abejas africanizadas, bajo condiciones de clima tropical

en América mantienen una relación estable con el parásito, y la apicultura en estas zonas generalmente no requiere de tratamientos de control contra la varroosis (Moretto *et al.*, 1993; Rosenkranz y Engels, 1994; Guzman-Novoa *et al.*, 1999; Mondragón *et al.*, 2005). En efecto, bajo condiciones de clima tropical, el crecimiento de las poblaciones del parásito es más lento que en condiciones de clima templado (Eguaras *et al.*, 1994, García Fernández *et al.*, 1995, Moretto *et al.*, 1991; Rosenkranz *et al.*, 2006).

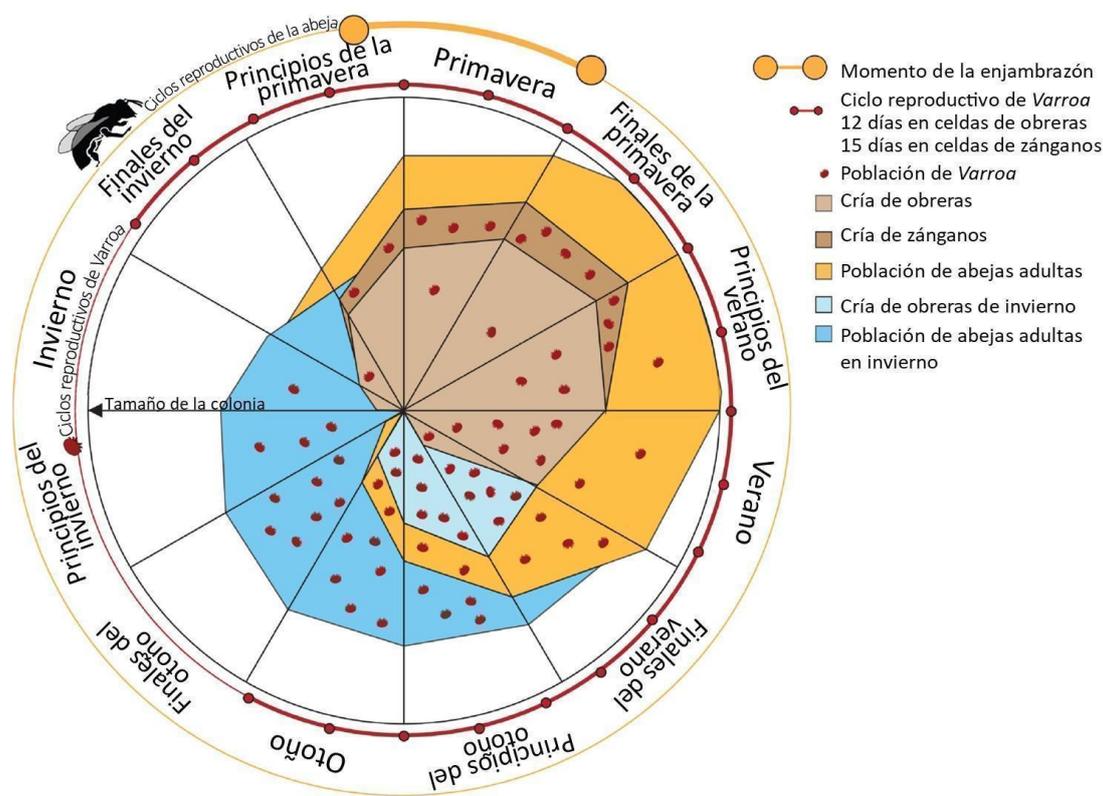


Figura 17. Crecimiento teórico de una colonia de *A. mellifera* sana sin tratamientos contra *V. destructor* y con un invierno de 3 meses. En invierno, las colonias suelen estar formadas por abejas adultas de invierno (en azul oscuro) con muy poca cría de obreras (en marrón claro) y bajas poblaciones de *Varroa*. A medida que emergen nuevas abejas, la población de abejas adultas (en amarillo) aumenta rápidamente. A principios de la primavera, la colonia comienza a criar zánganos (en marrón oscuro), que son preferidos por *V. destructor* (graficados como ácaros rojos). Después de la temporada de enjambrazón, las colonias dejan de criar zánganos, lo que obliga al ácaro a reproducirse en las celdas de cría de obreras. A finales del verano, tanto la población de abejas como de cría se reducen, y la infestación de *Varroa* aumenta en la población de abejas adultas por encima de los umbrales de daño. Las colonias producen simultáneamente crías de invierno (en azul claro) que se convierten en las abejas de invierno de alta longevidad (en azul), de la que se alimentan los ácaros. Cuando la colonia deja de producir cría, *Varroa* no tiene lugar donde reproducirse y su población decrece. Extraído de Traynor *et al.* (2020).

En colonias de *A. mellifera* ubicadas en ambientes de clima templado, la disponibilidad de celdas de cría varía a lo largo del año, desde muy abundante en verano hasta mínima o nula en invierno, lo que interrumpe la reproducción del parásito durante esta época (Figura 17). Sin embargo, en este tipo de clima la apicultura depende en gran medida del uso de acaricidas. En general, las colonias no tratadas no logran sobrevivir más de dos años (Boecking y Genersch, 2008; Neumann *et al.*, 2012; Van Dooremalen *et al.*, 2012). El impacto negativo se profundiza si la presencia del parásito en las colonias es elevada hacia el final del otoño, afectando en última instancia a las poblaciones de abejas invierno y de la primavera siguiente (Guzmán Novoa *et al.*, 2010; van Dooremalen *et al.*, 2012), y comprometiendo la supervivencia de la colonia.

En regiones de clima frío, los períodos reproductivos del ácaro son más cortos, la duración del ciclo de postura de la reina decrece y esto determina que el parásito tenga menos oportunidades para reproducirse, menor cantidad de cría disponible para cumplir con su ciclo, y esto lo hace menos perjudicial para las colonias de abejas (Es`kov *et al.*, 2004). En este sentido, conocer la dinámica poblacional del parásito y su huésped en cada ambiente, así como los comportamientos de higiene de las abejas hacia el ácaro, son requisitos fundamentales a la hora de evaluar estrategias de manejo para reducir la población de *V. destructor*, ya que la probabilidad de colapso de las colonias se incrementa a medida que la población de ácaros aumenta (Calderone, 1999).

1.1.3. Comportamientos de higiene de las colonias

A lo largo de la evolución de las abejas melíferas han surgido novedosas adaptaciones fisiológicas, comportamentales y de organización social para minimizar el riesgo de transmisión de enfermedades que conlleva la vida en sociedad (Evans y Spivak, 2010; Cremer *et al.*, 2007; revisado en Wilson-Rich *et al.*, 2009). Se han descrito varios mecanismos de defensa que presentan las colonias, los cuales permiten reducir el impacto de ciertas enfermedades. El factor común entre estos mecanismos de defensa es que están basados en acciones colectivas o en comportamientos altruistas de individuos que benefician a la colonia y que resultan en la evitación, control o eliminación de infecciones y parasitosis. Algunos ejemplos de adaptaciones comportamentales que han evolucionado como mecanismos de “inmunidad social” son el comportamiento higiénico, el comportamiento de *grooming*, la fiebre social, la recolección y uso de las resinas con capacidad antimicrobiana dentro la colmena (Cremer *et al.*, 2007; Evans y Spivak, 2010; Simone *et al.*, 2009; Wilson -Rich *et al.*, 2009; de Roode y Lefèvre, 2012).

El **comportamiento higiénico (CH)** se refiere a la capacidad de las abejas obreras para detectar y eliminar la cría enferma o muerta de la colmena, limitando de esta manera la transmisión de la enfermedad (Rothenbuhler, 1964; Spivak, 1996; Spivak y Gilliam, 1998 a, b; Boecking y Spivak, 1999).

Este carácter de inmunidad social ha sido estudiado y considerado como un mecanismo primario de resistencia ante enfermedades de la cría, como cría yesificada (Spivak y Gilliam, 1998a, b; Invernizzi, 2001), loque americana (Rothenbuhler, 1964; Spivak y Gilliam, 1998a, b; Spivak y Reuter, 2001a) y varroosis (Rath y Drescher, 1990; Spivak, 1996; Spivak y Gilliam, 1998). En efecto, representa el principal carácter utilizado para la cría selectiva de abejas europeas resistentes a *Varroa* (Spivak y Reuter, 1998; Ibrahim y Spivak, 2006; Harris, 2007), aunque la asociación directa de ambos caracteres está en discusión (revisado en Mondet *et al.*, 2020).

Existen dos métodos usados para estimar el CH en las colonias a campo, ambos consisten en la inducción de la muerte de la cría operculada y el posterior registro del porcentaje de remoción de la misma por parte de las abejas adultas después de 24 o 48 horas (revisado en Leclercq *et al.*, 2018). Mediante el método de pinchado (en inglés *pin-killed test*) se sacrifica la cría operculada con un alfiler entomológico con el que se perfora tanto el opérculo como la pupa en desarrollo (Newton y Ostasiewski, 1986; Palacio *et al.*, 2000). Mediante el método de congelamiento (en inglés *freeze-killed test*) se induce la muerte de la cría aplicando nitrógeno líquido directo sobre un área del panal con cría operculada produciendo su muerte de forma instantánea (Espinosa-Montaña *et al.*, 2008).

El **comportamiento higiénico dirigido hacia *Varroa* (VSH)**, del inglés *Varroa Sensitive Hygiene*), es una variación del CH que implica la habilidad de las abejas obreras para identificar las celdas infestadas por *V. destructor* en estado reproductivo y remover esas crías, interrumpiendo el ciclo reproductivo del ácaro y limitando así sus cargas dentro de la colonia (Harbo y Harris, 2005; Danka *et al.*, 2011; Kirrane *et al.*, 2018; Sprau *et al.*, 2023).

Para el registro de VSH a campo, se usan dos metodologías alternativas. Una, implica la infestación artificial de celdas de cría recientemente operculadas, y la posterior evaluación de la tasa de remoción a los 7 días (Panziera *et al.*, 2017). La otra, involucra la determinación de la tasa de remoción de celdas de cría en cuadros provenientes de colmenas altamente parasitadas y la observación del estatus reproductivo de dichas celdas (Villa *et al.*, 2009)

El **comportamiento de acicalamiento** (*grooming* en inglés, CG) involucra acciones de morder, lamer con las piezas bucales (haciendo uso de patas pro y/o mesotorácicas), y eliminar polvo, polen o ectoparásitos que realizan las abejas para limpiarse (*auto-grooming*) o limpiar a sus compañeras de nido (*allo-grooming*) (Winston, 1987; Boecking y Spivak, 1999; revisado en Pritchard, 2016). Este comportamiento puede desempeñar un rol fundamental en la defensa de la colonia contra el ácaro *V. destructor*. En efecto, el comportamiento de *grooming* es uno de los principales mecanismos de resistencia al ácaro en *A. cerana* (Peng *et al.*, 1987). Si bien también se observa en *A. mellifera*, estudios previos indicaron que este carácter se expresaría en menor frecuencia en esta especie y de forma variable entre subespecies o poblaciones de abejas europeas respecto a africanizadas (Boecking

y Ritter, 1993; Fries *et al.*, 1996; Boecking *et al.*, 1993; Buchler *et al.*, 1992; Fries *et al.*, 1996; Guzman-Novoa *et al.*, 2012; Hamiduzzaman *et al.*, 2017).

La forma de estimar el comportamiento de *grooming* a campo consiste en la evaluación de la caída natural de ácaros en pisos (medida indirecta) y la proporción de ácaros dañados (medida directa) (Ruttner y Hanel, 1992; Rosenkranz *et al.*, 1997; 1999; Mondragón *et al.*, 2005). En particular, si bien esta última medida resulta más laboriosa, es la más ampliamente utilizada para evaluar la intensidad del *grooming* en las colonias de *A. mellifera* en condiciones de campo (Zefferino, 2012; Pritchard, 2016). Sin embargo, es posible que parte de los ácaros colectados en los pisos de las colmenas hayan sido dañados durante la limpieza de las celdas de cría como consecuencia del comportamiento higiénico, o de hormigas que suelen visitar la colmena. Para evitar estos posibles errores es importante, por un lado, contabilizar sólo las hembras adultas ya que los ácaros inmaduros podrían ser lesionados durante la eliminación de crías infestadas (Rosenkranz *et al.* 1997; Aumeier, 2001), y por otro lado, mantener los pisos por períodos de tiempo cortos (24-48 horas) para evitar la acción de las hormigas (Rosenkranz *et al.* 1997; Aumeier, 2001).

1.1.4. Antecedentes de caracterización y selección de colonias resistentes a *V. destructor*

En el mundo están actualmente en desarrollo programas de mejoramiento genético que promueven la selección de ciertos rasgos de inmunidad social de las colonias y obtienen de esta manera stocks resistentes a *V. destructor* (revisado por Guichard *et al.*, 2020; Mondet *et al.*, 2020). Asimismo, se realizan esfuerzos para la obtención de poblaciones naturalmente sobrevivientes al ácaro, sobre las que se estudian los mecanismos comportamentales subyacentes que dan cuenta de tal supervivencia. Este es un punto crítico ya que algunas de estas características que confieren resistencia al ácaro en ciertas poblaciones de abejas pueden no tener una gran influencia en otras (Locke, 2016; ver Grindrod y Martin, 2021).

En Argentina, se han hecho esfuerzos para identificar y seleccionar poblaciones locales que logran sobrevivir sin tratamiento acaricida y para caracterizar los mecanismos subyacentes. Uno de los criterios utilizados por los programas locales de mejoramiento ha sido la selección del comportamiento higiénico (Palacio *et al.*, 2000, 2010), que confiere resistencia general a las enfermedades de la cría. Estas poblaciones de abejas seleccionadas por su alto comportamiento higiénico se evaluaron posteriormente en relación con la resistencia a *Varroa* en regiones de clima templado, donde el ácaro se ha convertido en un problema significativo (Merke, 2016; Visintini, 2018; Visintini *et al.*, 2021). Sin embargo, no se ha abordado hasta el momento la caracterización de otras poblaciones de *A. mellifera* establecidas en clima subtropical y que logran sobrevivir en ausencia de tratamientos acaricidas. Las mismas, presentan rasgos promisorios de resistencia y evidencian una

alta caída de ácaros en pisos técnicos (Russo *et al.*, 2018), una medida indirecta del comportamiento de acicalamiento (*grooming*) mediante el cual la colonia puede limitar la carga forética del parásito. La caracterización de estas poblaciones naturalmente supervivientes al ácaro proporcionaría una mejor comprensión de las formas adaptativas en que las colonias de abejas melíferas pueden responder a la presión selectiva de los ácaros y generaría herramientas para la mejora sanitaria de nuestras poblaciones locales.

En este primer capítulo abordaré la caracterización integral a campo de colonias de *A. mellifera* establecidas en clima subtropical que sobreviven a la presencia de *V. destructor* sin la aplicación de tratamiento acaricida. Presentaré los principales resultados del desempeño poblacional, comportamental y sanitario de dicho material en comparación con un stock comercial adaptado a la zona que se muestra susceptible a *V. destructor*. Discutiré de forma holística los resultados obtenidos, comparando la dinámica de la parasitación en cada material a través de la temporada apícola y, analizando su potencial asociación con el comportamiento de *grooming* y la sobrevivencia de las colonias.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Materiales

Se realizó la evaluación de parámetros poblacionales de *A. mellifera* y *V. destructor*, y la caracterización genética y comportamental en colonias de dos poblaciones: 1. una población de abejas melíferas sobrevivientes a *Varroa* (M, 22 colonias), y 2. una población comercial de abejas melíferas susceptibles al ácaro (considerada control para nuestros ensayos, S, 11 colonias). Ambas poblaciones están ubicadas en el apiario de la Estación Experimental Agropecuaria Reconquista (EEA Reconquista, 29°15'31,8 "S 59°44'36,0 "O) (Figura 18) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Esta región se define como Chaco de Transición y se caracteriza por un clima subtropical con estación seca, con una temperatura media anual de 19,98 °C (max: 25,98 °C y min: 14,58 °C) y una precipitación media anual de 1408 mm. Las principales fuentes de néctar de la zona incluyen *Senegalia praecox*, *Neltuma nigra*, *Neltuma alba* y *Geofroea decortinas* como flora natural, y *Helianthus annuus*, como cultivo principal (Zabala *et al.*, 2021). Las colonias control (S) se establecieron a partir de reinas comerciales de origen europeo que requieren tratamiento acaricida sintético al menos dos veces al año contra *V. destructor* (uno a principios de otoño y otro a principios de primavera) para evitar pérdidas invernales. Un estudio preliminar (Russo *et al.*, 2018) evidenció un 60% de mortalidad de las colonias durante el invierno para esta población en ausencia de tratamiento acaricida. Las colonias de ambas poblaciones (M, S) recibieron las mismas prácticas apícolas y no fueron sometidas a tratamiento acaricida durante toda la caracterización a campo, realizada durante la temporada 2017-2018.



Figura 18. Fotografía del Apiario Experimental de la Estación Experimental Agropecuaria Reconquista-INTA (Reconquista, provincia de Santa Fe, latitud-29.2587717, longitud-59.9095836) (arriba). Imagen satelital con la ubicación del apiario y los alrededores (abajo). Imagen de Argentina con la ubicación de la localidad de Reconquista.

1.2.1.1 Origen y selección de materiales

En nuestro país, se lleva adelante desde el año 1995 un programa de mejoramiento genético de abejas (MeGA, INTA-PROAPI, 2017) con el principal objetivo de obtener materiales resistentes a enfermedades de la cría. En particular, utilizando el comportamiento higiénico como criterio de selección se obtuvieron líneas de abejas con alto CH que han permitido eliminar el uso de antibióticos (Palacio *et al.*, 2000) y que se comercializan en la actualidad como material vivo certificado (MAGYP, 2018). Dentro del mismo programa funcionan centros de evaluación, selección y preservación de colmenas con rasgos de tolerancia o resistencia a *V. destructor*, y juntos conforman la red de tolerancia a Varroosis (Merke *et al.*, 2014). En esta Red se evalúan diferentes materiales que incluyen colonias de genética comercial, silvestres y/o locales, siguiendo un protocolo consensuado y teniendo en cuenta las características del ambiente, la adaptación de las abejas a las condiciones locales y la presencia e interacciones con otras enfermedades. Es así como en el año 2011, se informó a la red sobre una colonia de un apiario desatendido que sobrevivía sin tratamiento acaricida y que presentaba alta caída natural de ácaros registrada en el piso de la colmena. Esta colonia se trasladó a la estación experimental de INTA-Reconquista en el norte de la provincia de Santa Fe, para su multiplicación y para dar inicio al proceso de caracterización (Figura 19).

Cada primavera, se seleccionaron las colonias hijas que sobrevivían al invierno sin tratamiento acaricida y que mostraban vitalidad en términos de crecimiento poblacional al inicio de la temporada apícola. A principios de la primavera de 2014, se seleccionaron cuatro colonias de la población M (denominadas M1, M2, M3 y M4; Figura 19) como madres de la siguiente generación y cada una se dividió en cuatro nuevas colonias. Las dieciséis colonias hijas resultantes fueron monitoreadas por primera vez durante la temporada 2015-2016 (Figura 19) y presentaron mayor supervivencia durante el invierno y una mayor proporción de ácaros caídos respecto a las colonias del stock control (Russo *et al.*, 2018). Para la siguiente generación, se seleccionaron dos colonias del stock M como madres y cada una se multiplicó en 11 colonias hijas para realizar el presente estudio. Durante el proceso de selección, todas las reinas se aparearon de forma natural.

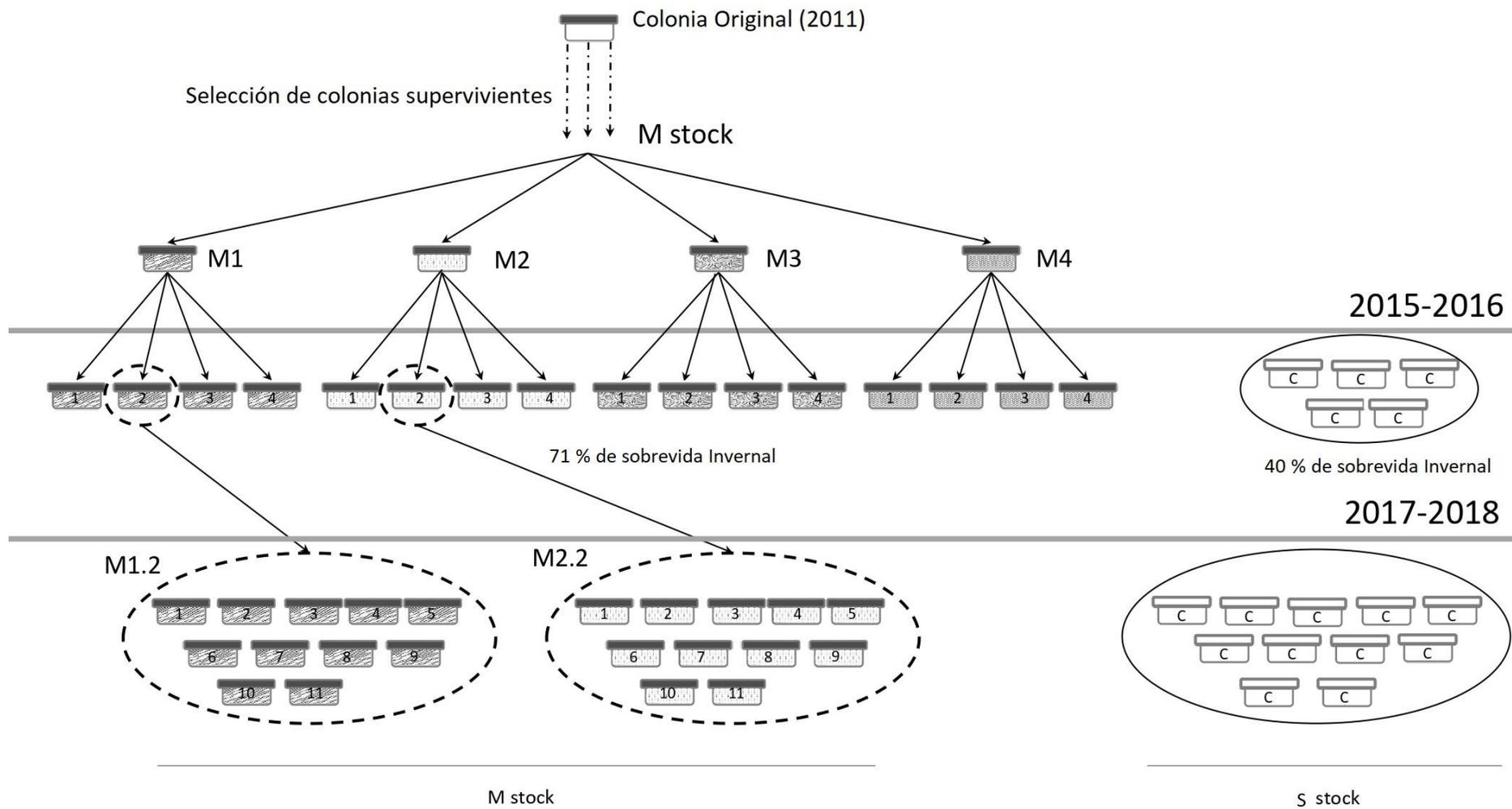


Figura 19. Esquema representativo de la selección realizada para obtener el material de abejas melíferas sobrevivientes a *Varroa* (M) y el diseño experimental del presente estudio (temporada 2017-2018). S corresponde a colonias control susceptibles al ácaro.

1.2.2. Métodos

1.2.2.1. Caracterización genética de las colonias de *A. mellifera*

Mediante la aplicación de técnicas moleculares se estudió una región del ADN mitocondrial (denominada *cox1-cox2*) para realizar la caracterización genética de las colonias estudiadas en este trabajo de Tesis. Se muestrearon dos abejas obreras del interior de cada colonia M y S durante la primavera de 2017. Las muestras fueron colocadas en tubos de 1,5 ml con etanol al 96% y conservadas a -20 °C. Posteriormente, se procedió al procesamiento de las mismas mediante extracción de ADN total del tórax según el protocolo descrito por Baruffi *et al.* (1995) y posterior amplificación por la técnica de PCR-RFLP. Los productos de la PCR se digirieron con la enzima *HinfI* (Promega, Madison, MN, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos de restricción se separaron en geles de agarosa al 3% (p/v), se tiñeron con Gel Red y se fotografiaron bajo luz UV. Los haplotipos mitocondriales detectados en el análisis de restricción usando *HinfI* fueron asignados como describieron previamente Agra *et al.* (2018).

1.2.2.1.1 Extracción individual de ADN total

Se separó el tórax del resto del cuerpo de cada abeja obrera utilizando una pinza y se secó en estufa a 37 °C. Cada tórax se colocó en un microtubo de 1,5 ml, y se mantuvo en hielo. A cada tubo se le agregó 200 µl de buffer de extracción (NaCl 100 mM; Sacarosa 200 mM; Tris-HCl pH 9,1 100 mM; EDTA 50 mM; SDS 0.5% y agua bidestilada), junto con 2 µl de proteinasa K (10mg/ml). Se realizó la homogeneización de los tejidos y se adicionó a cada tubo 200 µl más de buffer de extracción. Los tubos se incubaron a 65 °C durante 30 minutos mediante el uso de un *heat block*. Posteriormente, se añadió a cada tubo 50 µl de KAc 8M. Los tubos se mezclaron por inversión y se mantuvieron en hielo durante 40 minutos (incubación en frío). Posteriormente, fueron centrifugados durante 20 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante de cada tubo a otro limpio y se realizó una nueva centrifugación durante 20 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. Se agregó 10 µl RNasa 1 mg/ml a cada tubo y se los incubó 30 minutos a 37 °C (incubación en calor). Luego se adicionaron 50 µl de NaAc 3M y 800 µl de etanol absoluto (frío) a cada tubo, y se los centrifugó durante 20 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante por inversión. Se repitió el lavado con 500 µl de etanol 70%. Finalmente, los tubos se secaron a 37 °C hasta la evaporación total del etanol, se resuspendió el ADN en 20 µl de agua bidestilada estéril y se los conservó en freezer a -20 °C.

Para analizar la calidad del material genético obtenido se realizaron electroforesis en gel de agarosa 0,8% p/v en *buffer* TBE 0.5X (Tris Base 10,8 gr/lit; Ácido Bórico 5,5 gr/lit; EDTA 0,7 gr/lit) y 1 mg/ml de Gel Red (Sambrook *et al.*, 1989). Las corridas electroforéticas se realizaron a intensidad de corriente

constante (30 mA) durante una hora. Las imágenes de los geles fueron capturadas con un fotodocumentador de luz UV (Syngene) y analizadas con Photoshop (Adobe Microsoft).

1.2.2.1.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez extraído el ADN, se realizó mediante PCR la amplificación de la región intergénica *citocromo oxidasa I - citocromo oxidasa II (cox1-cox2)* del ADN mitocondrial de *A. mellifera* según la metodología descrita por Lobo-Segura (2000) y Hall y Smith (1991) puesta a punto en nuestro laboratorio (Conte *et al.*, 2008; Agra *et al.*, 2018). Se utilizaron los siguientes cebadores específicos: *forward MTHSF*: 5'-TCTATACCACGACGTTATTC-3' y *reverse MT2*: 5'-GATCAATATCATTGATGACC-3.

Para cada muestra, se colocó en una placa de 96 pocillos 1 µl de ADN, 4 µl de H₂O y 15µl de mezcla de PCR. La mezcla de PCR consistió en *buffer Idaho 1X* (500 mM tris-HCl pH 8,3; 20% Sacarosa; 30 mM MgCl₂; 2,5 mg/ml BSA); dNTPs 200 µM; cebador *forward: MTHSF* 0,5 µM; cebador *reverse: MT2* 0,5 µM; *taq* polimerasa (Inbio Highway) 0,04 U/µl y H₂O bidestilada hasta completar el volumen final (20 µl). El orden de agregado de reactivos se realizó desde los de mayor volumen hasta la polimerasa, que es el reactivo de menor volumen. La placa fue colocada en un ciclador *Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler*. El ciclado se llevó a cabo según el siguiente programa: 94 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 60 segundos y una extensión final a 72 °C durante 2 minutos.

Para verificar la amplificación se realizaron corridas electroforéticas de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5% durante 30 minutos a intensidad de corriente constante (30 mA). Una vez finalizada la corrida, fueron capturadas las imágenes con un fotodocumentador de luz UV (Syngene) y analizadas con Photoshop (Adobe Microsoft).

1.2.2.1.3. Análisis de patrones de restricción (PCR-RFLP)

Se realizó la digestión de los productos de PCR obtenidos utilizando la enzima *Hinfi* (Promega) durante 3 horas a 37 °C. Para ello se utilizaron 8 µl de templado; 2 µl *Buffer B 10X*; 0,2 µl BSA 10 ng/ml; 0,2 µl enzima *Hinfi* (10U/µl) y 9,6 µl agua bidestilada estéril. Para analizar el patrón de restricción obtenido se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 3%, durante tres horas a 30mA. Una vez finalizada la corrida electroforética fueron capturadas las imágenes con un fotodocumentador de luz UV (Syngene) y analizadas con Photoshop (Adobe Microsoft). Se analizó el patrón de restricción obtenido mediante la comparación con estándares de referencia de los diferentes linajes de *A. mellifera* descritos en bibliografía (Conte *et al.*, 2008; Agra *et al.*, 2018).

1.2.2.2. Evaluación de parámetros poblacionales de *A. mellifera*

Se evaluó la dinámica poblacional de 33 colonias (22 M y 11 S) de *A. mellifera* durante la temporada 2017-2018. Se visitó el apiario por primera vez en marzo de 2017 (principios de otoño) y mensualmente durante la temporada productiva, desde septiembre de 2017 (inicio de la primavera) hasta febrero de 2018. La población de abejas se evaluó mensualmente en cada colonia estimando el área total de los cuadros cubierta por abejas adultas y por cría de acuerdo con Degrandi-Hoffman *et al.* (2008). Brevemente, una vez abierta la colmena, se sacó uno a uno cada cuadro secuencialmente y se registró el porcentaje de la superficie del panal (ambos lados) cubierta por abejas adultas y cría. Luego, se estimó el número total de cuadros totalmente ocupados por ambos tipos (abejas adultas y cría) para cada colonia de acuerdo con Delaplane *et al.* (2013).

Cuadro 2. Cronograma de relevamientos realizados durante la temporada 2017-2018. Se detallan los parámetros registrados en cada uno de los meses.

Variables	Otoño temprano	Primavera			Verano	
	2017				2018	
	Marzo	Septiembre	Octubre	Diciembre	Enero	Febrero
Población de abejas adultas y cría (Fortaleza)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Población de ácaros (Nivel de infestación)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Varroa en Cría	✓		✓			
Número de ácaros caídos y dañados (Medidas de <i>grooming</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Comportamiento Higiénico	✓		✓			
Sobrevida invernal		✓				
Haplotipos mitocondriales	✓					

1.2.2.3. Evaluación de parámetros poblacionales de *V. destructor*

De forma simultánea a la estimación de la población de abejas adultas se estimó la carga forética de *V. destructor* en las 33 colmenas de *A. mellifera* mencionadas. Dichas estimaciones se realizaron a partir de marzo de 2017 (principios de otoño) y durante la temporada productiva, desde septiembre de 2017 (principios de primavera) hasta febrero de 2018 (Cuadro 2). La carga parasitaria en celdas de cría, se evaluó una vez en otoño (marzo) y otra en primavera (octubre) de 2017 (Cuadro 2).

1.2.2.3.1. Dinámica temporal de las poblaciones de *V. destructor* en abejas adultas

De cada colmena se tomó muestras de entre 150 y 300 abejas obtenidas de tres cuadros de cría (separados entre sí y con predominio de cría abierta) en frascos que contenían una solución de agua y detergente (Figura 20). El uso de detergente facilita el desprendimiento de los ácaros del cuerpo de las abejas y de esta manera, el conteo efectivo de los mismos. Para la realización del conteo las muestras (frascos) de todas las colmenas fueron llevadas al laboratorio. Los frascos se agitaron vigorosamente durante unos minutos, se vació su contenido sobre un tamiz que retiene las abejas, pero deja pasar los ácaros que fueron colectados en un paño blanco colocado debajo del tamiz (Figura 20). Las abejas fueron lavadas con agua al menos tres veces para asegurar la correcta recolección de los ácaros. Finalmente se contabilizaron las abejas y los ácaros presentes en cada muestra. Para obtener el porcentaje de *V. destructor* en estado forético (%VF) se utilizó la siguiente fórmula (De Jong *et al.*, 1982 modificada por Marcangeli, 2000; Dietemann *et al.*, 2013):

$$\% VF = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de ácaros desprendidos}}{N^{\circ} \text{ de abejas de la muestra}} \right) \times 100$$



Figura 20. Fotografías de la toma de muestras (izquierda) y del conteo de ácaros (derecha) para la determinación de la parasitación en abejas adultas (%VF).

1.2.2.3.2. Dinámica temporal de las poblaciones de *V. destructor* en celdas de cría

El porcentaje de infestación de ácaros en la cría se evaluó en otoño temprano (marzo 2017) y en primavera (octubre 2017). De cada colonia se tomaron cuadros que contenían planchas homogéneas de cría operculada recientemente. Se abrieron, mediante el uso de una pinza de punta fina, 50 celdas de cría en forma diagonal de cada lado del cuadro (total 100 celdas) y se retiró el contenido de cada una de las celdas cuidadosamente para el registro de la presencia de *V. destructor* sobre la cría de abejas (Branco *et al.*, 2006) (Figura 21). También se revisaron las paredes y el fondo de cada una de las celdas abiertas para detectar la presencia del ácaro. Se contabilizó el número de celdas infestadas con *V. destructor* y se determinó el porcentaje de infestación de *Varroa* en Cría (%VC) según Dietemann *et al.* (2013).

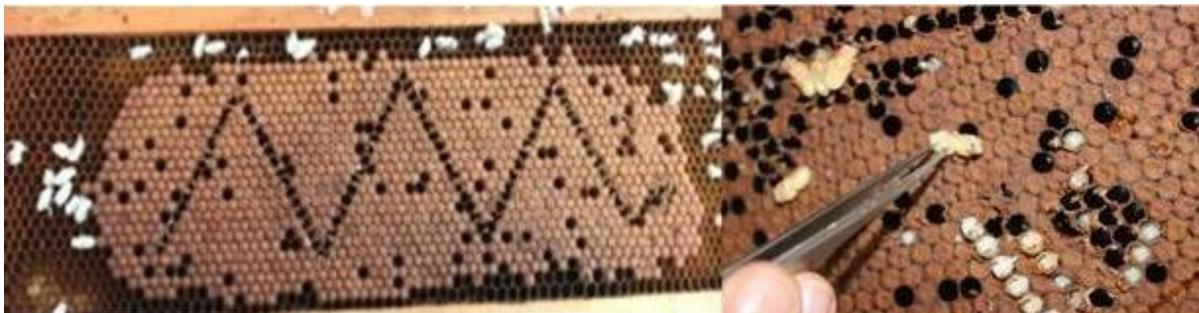


Figura 21. Fotografías del manejo de cuadros de cría de abejas para la determinación de la parasitación por *V. destructor* en la cría de las abejas (%VC).

1.2.2.4. Medición del comportamiento higiénico de las colonias

El comportamiento higiénico se estimó mediante la técnica de cría muerta por pinchado con alfileres y se realizó en dos momentos, en marzo de 2017 y septiembre de 2017 (Cuadro 2) de acuerdo a Newton y Ostasiewski (1986) y Palacio *et al.* (2000). Brevemente se seleccionó un cuadro de cada colonia que contenía cría operculada distribuida de manera uniforme. En cada cuadro se seleccionó un área de 10 x 5 cm donde se perforaron las celdas una a una con un alfiler entomológico (nº 1) para matar la cría. Los cuadros se reintrodujeron en la colonia de origen y pasadas las 24 hs se inspeccionaron para contar el número de celdas que habían sido limpiadas por las abejas (Figura 22A). El porcentaje de comportamiento higiénico de la colonia se determinó mediante la siguiente ecuación mostrada en la Figura 22B.



Figura 22. (A) Fotografías del conteo de cría removida transcurridas las 24 hs del pinchado de las celdas. **(B)** Ecuación utilizada para el cálculo del comportamiento higiénico de la colonia de *A. mellifera*; C: celdas.

1.2.2.5. Caracterización del comportamiento de *grooming* en las colonias

El comportamiento de *grooming* se estimó registrando el número de ácaros caídos y la proporción de ácaros dañados (Boecking y Spivak, 1999). Para ello se utilizaron pisos técnicos previamente descritos por Pettis y Shimanuki (1999) (Figura 23). El piso estándar de cada colonia se sustituyó por un piso que tenía en su parte superior una malla de alambre que permite sólo el pasaje (caída) de ácaros y por debajo de ésta, una bandeja colectora deslizable. Antes de cada medición, se retiró la bandeja de cada colonia, se limpió y se la volvió a colocar por debajo de la malla. Cuarenta y ocho horas más tarde se retiraron las bandejas y se colectaron los ácaros caídos con un cepillo de pelo fino. Se contaron todos los ácaros caídos en los pisos de cada colonia y posteriormente se examinaron bajo una lupa estereoscópica. Cada ácaro recibió una valoración binaria de "no dañado" o "dañado" (Figura 23). En estos últimos casos, los daños en el escudo dorsal, el gnatosoma y las patas se identificaron según Rosenkranz *et al.* (1997) y Corrêa-Marques *et al.* (2000). La proporción de ácaros dañados en cada colonia se obtuvo dividiendo el número de ácaros dañados por el número total de ácaros caídos. La proporción de ácaros caídos se obtuvo dividiendo el número de ácaros caídos por la población total estimada de *Varroa* en cada colonia, que representa la porción de ácaros que fueron eliminados por las abejas melíferas de su cuerpo en relación con el total de la población de ácaros presente en las colonias.



Figura 23. Fotografías de pisos técnicos (izquierda) y conteo de ácaros caídos de *V. destructor* (derecha).

1.2.2.6. Supervivencia invernal de las colonias

En primavera (octubre de 2017) se registró el número de colonias que sobrevivieron al invierno para ambas poblaciones para la estimación de los porcentajes de sobrevivencia.

1.2.2.7. Análisis estadístico

Se comparó la supervivencia invernal de las colonias entre poblaciones mediante análisis de tablas de contingencia. Para determinar si la población de abejas adultas (número de cuadros cubiertos por abejas), la población de crías (número de cuadros con cría operculada y abierta) y el porcentaje de *Varroa* forética, diferían entre poblaciones y meses a lo largo de la temporada, se realizaron modelos lineales generalizados (GLM) por separado, incluyendo las poblaciones (M, S) y considerando los meses de la temporada activa (marzo, septiembre, octubre, diciembre, enero y febrero) como factores fijos y las colonias como factores aleatorios. Se aplicó la transformación logarítmica (\ln) a los datos de *Varroa* forética. Asimismo, se comparó el porcentaje de comportamiento higiénico entre poblaciones (M, S) y estaciones (principios de otoño, principios de primavera) mediante GLM. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante LSD de Fisher ($\alpha = 0,05$) en todos los casos.

Los ácaros caídos y los dañados se analizaron por separado utilizando un modelo lineal mixto general (GLMM) con una distribución binomial (ácaros caídos vs. no caídos y ácaros dañados vs. no dañados, respectivamente) y con función de enlace logit considerando las poblaciones y los meses, como factores fijos y las colonias como factor aleatorio. En el caso de los ácaros dañados, las comparaciones entre meses se realizaron por separado para cada población con el fin de obtener un mejor ajuste al modelo. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante LSD de Fisher ($\alpha = 0,05$). En todos los casos (GLMs y GLMMs) se analizaron las pruebas de Shapiro-Wilks, Levene y la normalidad de los residuos. Para obtener la estructura de varianza más adecuada se utilizó el criterio de información

Akaike. Además, para explorar la relación entre las mediciones del comportamiento de *grooming* y la infestación en estado forético de los adultos, los porcentajes de ácaros caídos, ácaros dañados y ácaros foréticos se sometieron a análisis de correlación de Spearman para cada población. Las posibles diferencias entre los tipos de daños en los ácaros caídos de las colonias M y S se analizaron con tablas de contingencia. Se estimó la frecuencia de las diferentes categorías de daño descritas anteriormente (patas, escudo dorsal, gnatosoma) y se compararon las frecuencias de daños múltiples (patas + cuerpo) frente a los simples (patas o cuerpo). La frecuencia de infestación de ácaros en la cría se comparó entre poblaciones mediante el análisis de tablas de contingencia. Todos los análisis estadísticos se realizaron con InfoStat (Di Rienzo y Montiglio, 2016).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Caracterización genética de abejas

La caracterización genética de las colonias de abejas melíferas analizadas en el presente estudio mostró la presencia del 100% de haplotipos europeos (C1) tanto en las colonias M como en las S. En la Figura 24, se puede visualizar que los patrones de bandas obtenidos luego de la digestión resultan consistentes con los tamaños de fragmentos esperados para el haplotipo C1 (288 y 267-260 pares de bases; Conte *et al.*, 2008; Agra *et al.*, 2018).

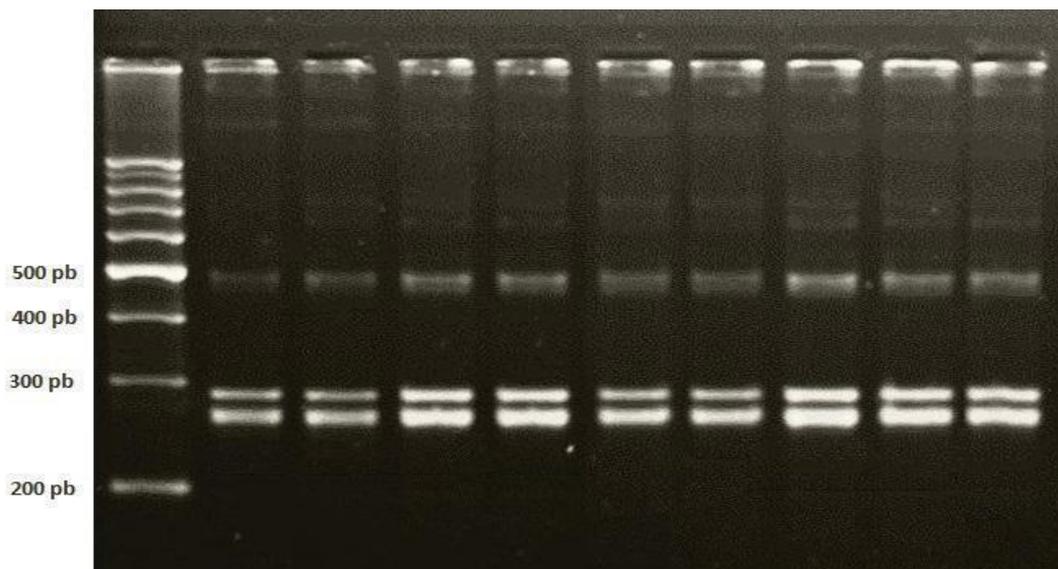


Figura 24. Patrón de bandas de PCR-RFLP para la región *cox1-cox2* en muestras de abejas obreras de las colonias de *A. mellifera* analizadas. La fotografía corresponde a una corrida electroforética en gel de agarosa 3% p/v de los productos de PCR *cox1-cox2* digeridos con la enzima *Hinf* I. Calle 1: marcador de peso molecular *DNA Ladder Solis Biodyne 100 bp* (100 pb a 1500 pb); Calles 2-9: productos de restricción de muestras pertenecientes a colonias de haplotipo C1.

1.3.2. Parámetros poblacionales de *A. mellifera*

La población de abejas adultas a lo largo de la temporada activa fue similar entre las colonias M y S, con una diferencia significativa sólo a principios de la primavera. Concretamente en septiembre, el número medio de cuadros completamente cubiertos por abejas fue mayor en las colmenas M ($6,76 \pm 0,55$) que en las S ($5,05 \pm 0,98$) (Figura 25A). Dentro de las colonias S, la población de abejas adultas fue significativamente menor en primavera (septiembre: $5,5 \pm 0,9$, y octubre: $5,8 \pm 0,9$) respecto a los demás meses evaluados (valor medio: $8,6 \pm 0,3$), mientras que no se detectaron diferencias significativas en esta variable a lo largo de la temporada para las colonias M (valor medio: $7,4 \pm 0,4$) (Figura 25A).

En cuanto a la estimación de la población de cría, se detectó una variación en el número de cuadros cubiertos con cría a lo largo de la temporada para ambas poblaciones. Si bien se observaron patrones de cría similar entre las poblaciones en la mayoría de los meses monitoreados, se detectó una diferencia significativa entre las colonias M y S para el número medio de cuadros con cría a principios de la primavera (septiembre: M = $4,35 \pm 0,23$; S = $3,20 \pm 0,45$; Figura 25B).

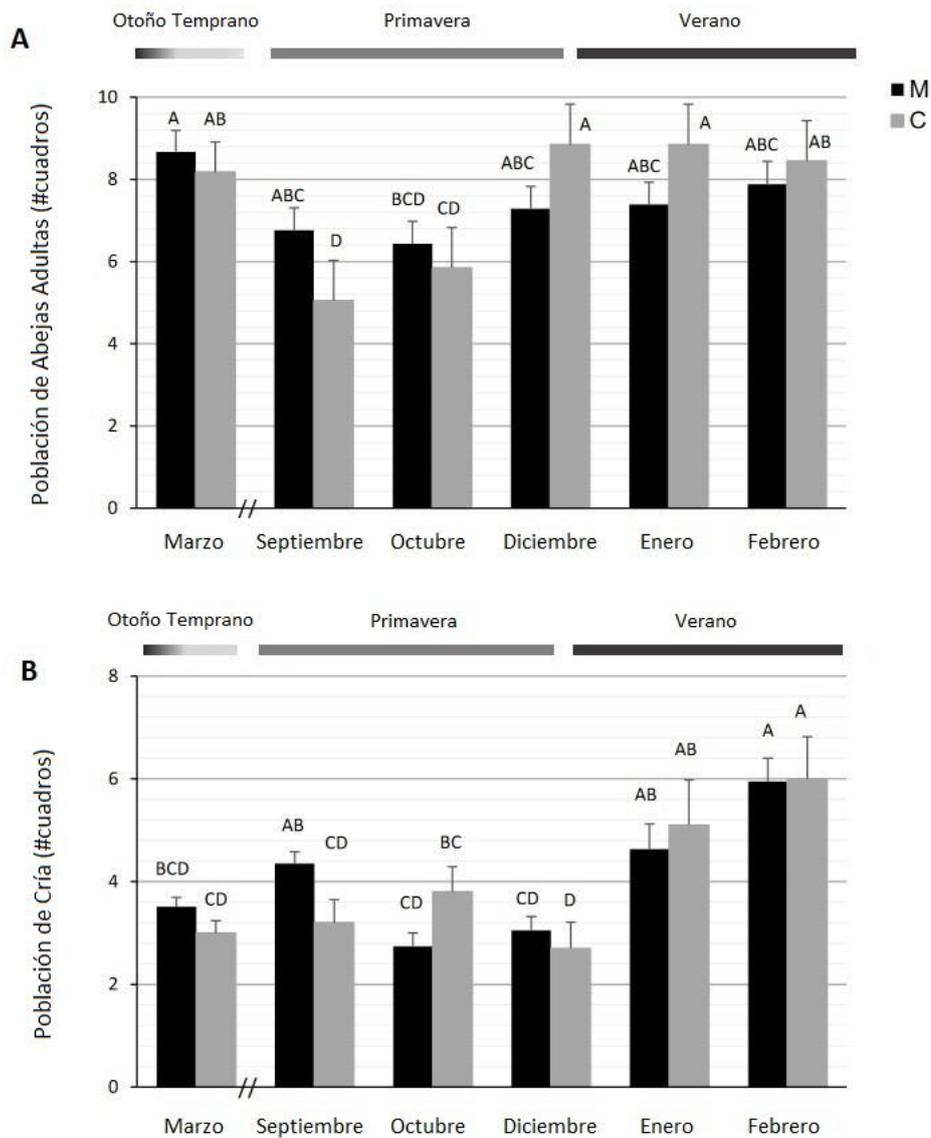


Figura 25. Número medio (\pm SE) de cuadros cubiertos por **(A)** abejas adultas y **(B)** cría en las poblaciones M y S. Letras diferentes indican diferencias significativas en las comparaciones *post-hoc* por LSD de Fisher ($\alpha = 0.05$).

1.3.3. Parámetros poblacionales de *V. destructor*

En concordancia a la dinámica poblacional de las colonias, el porcentaje de *Varroa* forética varió a lo largo de la temporada. La dinámica de la infestación en estado forético fue similar entre las colonias M y S, con niveles crecientes desde la primavera hasta el verano y con un pico a principios del otoño (Figura 26A). El aumento del porcentaje de *Varroa* forética observado en marzo fue significativamente mayor en las colonias S ($5,2 \pm 1,2$) respecto a las M ($11,5 \pm 1,7$) (Figura 26A).

En línea con lo observado para las cargas foréticas, el porcentaje de infestación de ácaros en la cría a principios de otoño fue significativamente mayor en las colonias S (6,64%) que en las M (2,57%) (Chi-cuadrado (χ^2) = 31,28; $P < 0,001$; Figura 26B). Se observó un porcentaje muy bajo de infestación en la cría tanto en las poblaciones M como S durante la primavera (0,09% en M y 0% en S; Chi-cuadrado (χ^2) = 1,05; $P = 0,31$; Figura 26B).

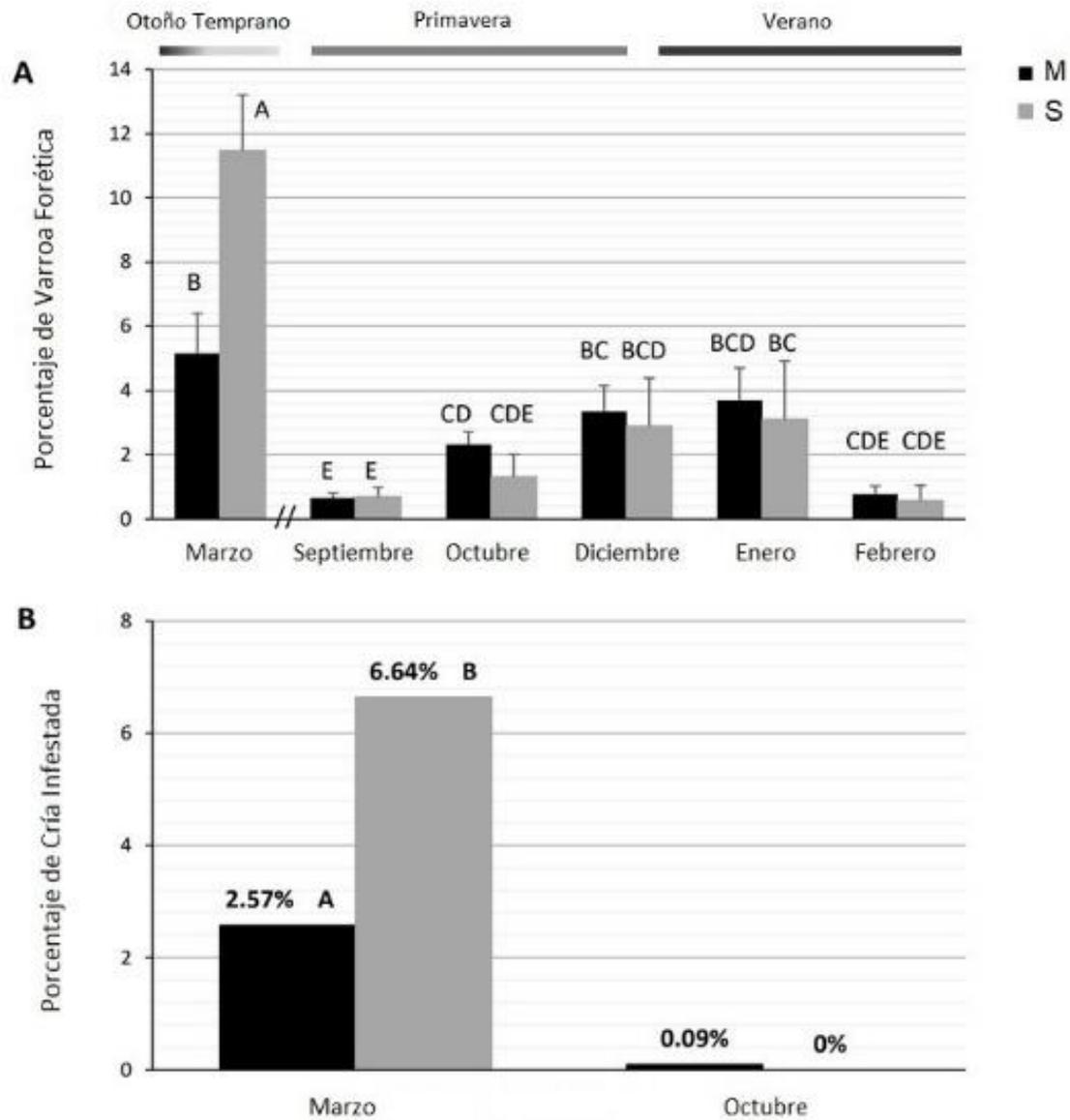


Figura 26. Porcentaje medio (\pm SE) de **(A)** *Varroa* forética y **(B)** cría infestada en las poblaciones M y S. Letras diferentes indican diferencias significativas entre poblaciones o meses, de acuerdo a resultados de: (A) comparaciones *post-hoc* (LSD de Fisher; $\alpha = 0,05$) o (B) análisis por tablas de contingencia.

1.3.4. Comportamiento higiénico

El comportamiento higiénico (CH) resultó diferente entre stocks y momentos de la temporada. Específicamente, para la población M, el CH fue similar entre la primavera y el otoño, con un valor medio de 85%, mientras que para la población S se observó un porcentaje más bajo en otoño respecto a la primavera (Cuadro 3). En otoño las colonias M mostraron un CH significativamente mayor en comparación con las colonias del stock S (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de comportamiento higiénico (\pm SE) medido en otoño temprano (Marzo) y primavera (Octubre) para las colonias de los stocks M y S.

	S	M
Otoño	68,7 (3,9) B	82,4 (3,0) A
Primavera	89,8 (5,7) A	88,8 (3,4) A

Letras diferentes indican diferencias significativas entre poblaciones y momentos de observación de acuerdo a comparaciones *post-hoc* por LSD de Fisher ($\alpha = 0,05$).

1.3.5. Comportamiento de *grooming*

El porcentaje de ácaros caídos en los pisos técnicos de las colmenas resultó diferente entre poblaciones y meses, con una interacción significativa entre dichos factores (Figura 27A). Se detectó una variación significativa en esta variable a lo largo de la temporada para las colonias M, siendo septiembre y febrero los meses con mayor porcentaje de caída de ácaros (Figura 27A). Por el contrario, las colonias S evidenciaron un bajo porcentaje de ácaros caídos sin diferencias significativas a lo largo de la temporada (Figura 27A).

El porcentaje medio de ácaros dañados a lo largo de la temporada fue mayor en la población M (25%) que en la S (9%) ($F_{1,97} = 8,51$; $P < 0,01$; Figura 27B). En las colonias S se observó un porcentaje bajo de ácaros dañados a lo largo de la temporada ($F_{1,16} = 0,01$, $P > 0,05$; Figura 27B). En cambio, este parámetro varió a lo largo de la temporada en las colonias del stock M ($F_{1,71} = 5,18$, $P < 0,001$; Figura 27B) presentando un daño comparativamente mayor durante la primavera (septiembre y octubre) y final del verano (febrero) respecto a los otros meses evaluados (Figura 27B).

En las colonias M se observó una asociación entre el porcentaje de ácaros caídos y el de ácaros dañados (coeficiente de correlación de Spearman: $r = 0,45$; $P < 0,001$), pero no así en las colonias S. No se encontró correlación significativa entre el porcentaje de *Varroa* forética y los parámetros de *grooming* (ácaros caídos y dañados) en las colonias M. Por el contrario, se detectó una correlación positiva entre el porcentaje de *Varroa* forética y el de ácaros caídos en la población S (coeficiente de correlación de Spearman: $r = 0,4$; $P < 0,05$).

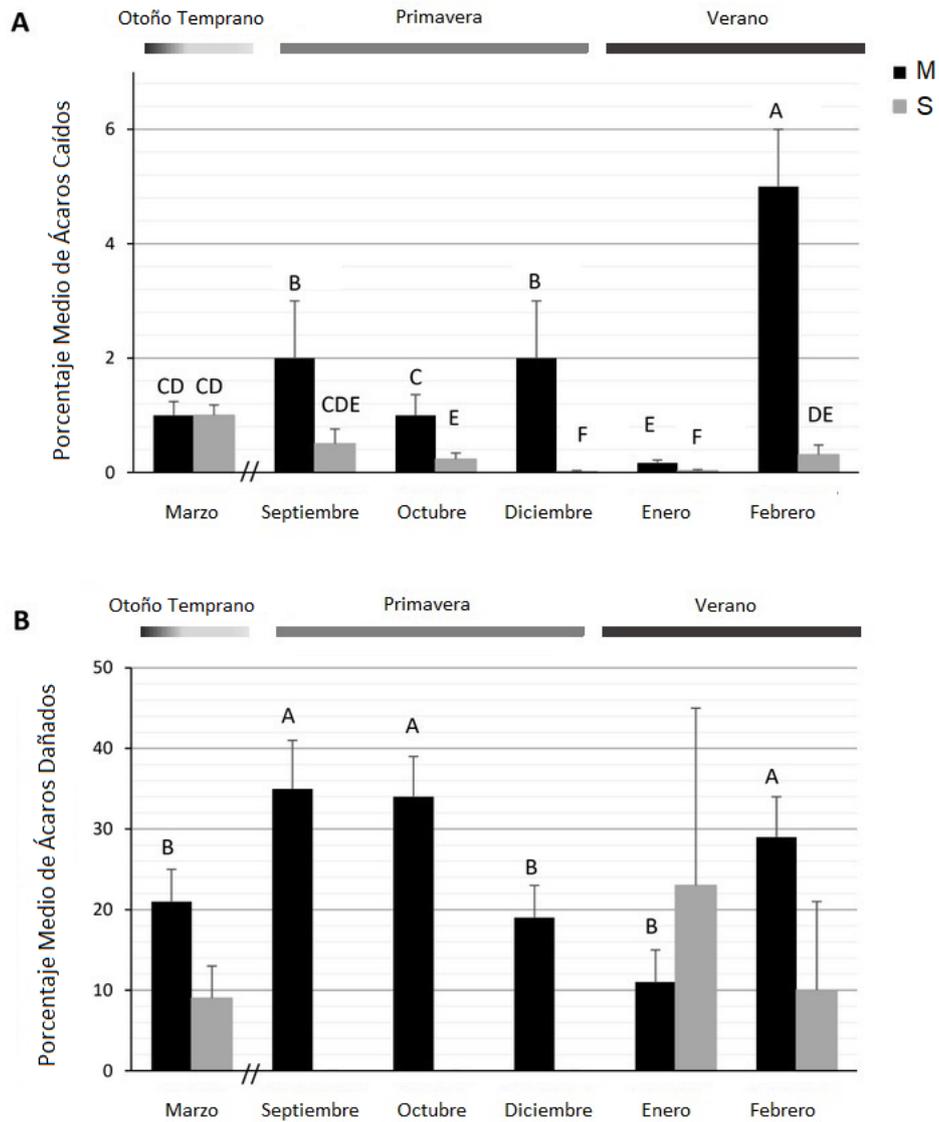


Figura 27. Porcentaje medio (\pm SE) de **(A)** ácaros caídos y **(B)** ácaros dañados en las poblaciones M y S. Letras diferentes indican diferencias significativas en el GLMM entre las poblaciones o los meses de acuerdo a LSD de Fisher ($\alpha=0,05$). No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de ácaros dañados entre meses para el stock S.

Todos los ácaros recolectados (caídos) fueron observados bajo lupa y se registraron diferentes categorías de daño (Figura 28A-D). Estas categorías se observaron en los ácaros de las colonias de ambas poblaciones, pero con frecuencias relativas diferentes según el origen de la colonia (Cuadro 4). El daño múltiple que involucra lesiones tanto en el cuerpo como en las patas (patas dañadas + gnatosoma o escudo dorsal dañado) se detectó en el 20,6 y el 5% de los ácaros dañados de las colonias M y S, respectivamente (Cuadro 4). Esta diferencia fue marginalmente significativa (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje medio de los diferentes tipos de daños registrados en individuos de *V. destructor* colectados en los pisos de las colonias M y S.

Tipo de daño	S (%)	M (%)	P-valor
Daño en patas	70	66,6	0,123
Daño en el idiosoma	15	2,3	0,001
Daño en gnatosoma	10	8,5	0,172
Daño en el cuerpo	0	2,0	0,369
Daño múltiple	5	20,6	0,062

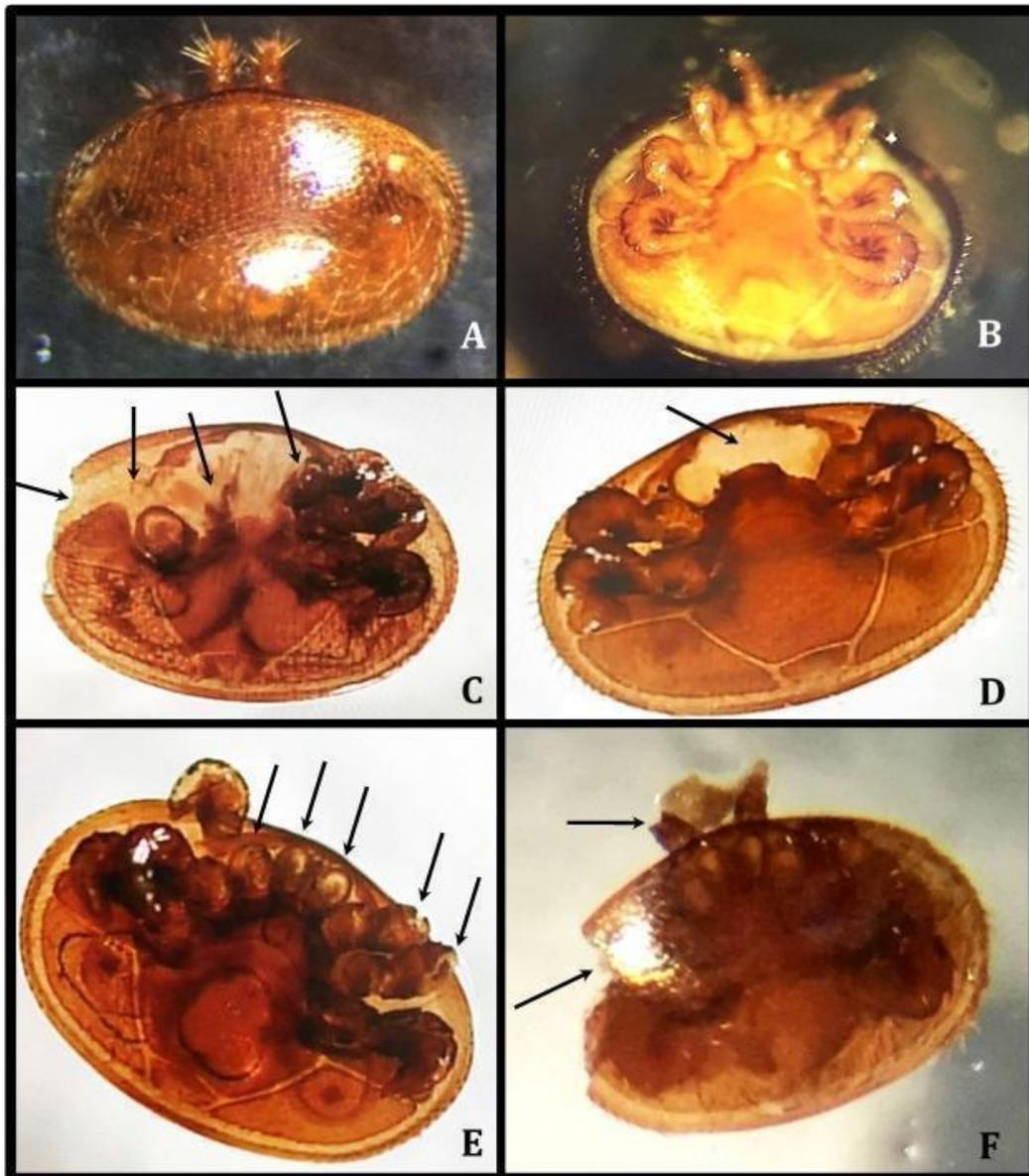


Figura 28. Fotografías donde se observan los diferentes patrones de daño en los ácaros *V. destructor*. Las flechas indican las lesiones en el cuerpo, las patas y los quelíceros del ácaro. (A, B) Vista dorsal y ventral de ácaros no dañados, (C) escudo dorsal dañado + gnatosoma dañado y patas faltantes + quelíceros, (D, E) patas faltantes + quelíceros, (F) escudo dorsal dañado + gnatosoma dañado. La clasificación del daño a los ácaros fue descrita previamente por Corrêa-Marques et al. (2000). Todas las fotos se tomaron con un microscopio Olympus BX40 con un aumento de 40x.

El daño en patas (pérdida total o parcial de una o más patas) fue el tipo de lesión física predominante en los ácaros de ambas poblaciones, y se presentó en porcentajes totales similares (Cuadro 5). Sin embargo, se detectaron diferencias significativas en la proporción de ácaros que presentaron más de 2 patas dañadas entre poblaciones (M: 63,3%; S: 10,5%; Chi-cuadrado (χ^2) = 20,98; $P < 0,001$). Además, el 52,7% de los ácaros dañados de las colonias M presentaron 4 o más patas dañadas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de ácaros dañados de las colonias M y S de acuerdo al número de patas dañadas (1 a 8).

# de patas dañadas	S	M
1	57,89	22,78
2	31,58	13,91
3	5,26	10,65
4	0,00	8,58
5	0,00	8,58
6	0,00	6,80
7	5,26	10,06
8	0,00	18,64

1.3.6. Supervivencia invernal de las colonias

El porcentaje de supervivencia durante el invierno (de marzo a septiembre de 2017) fue mayor para la población M (81,8%) que para la S (45,4%) (Chi-cuadrado (χ^2) = 4,59; $P = 0,032$).

1.4. DISCUSIÓN

La caracterización a campo de la población de abejas melíferas que sobrevive naturalmente a los ácaros y su comparación con una población comercial susceptible permitió comenzar a explorar el impacto del comportamiento de *grooming* en la dinámica de la parasitación y la supervivencia de las colonias.

Nuestros resultados revelaron que la población de abejas sobreviviente a *Varroa* (M) expresó un mayor comportamiento de *grooming* que la población control susceptible (S). Esto se evidenció en el mayor número de ácaros dañados colectados en los pisos técnicos de las colmenas M en comparación con las colmenas S. El porcentaje medio de daño a los ácaros producido por las abejas de la población M durante la primavera (34,5%) presentó valores intermedios en comparación con los registros previos en *A. m. ligustica* (26,4%) (Fries *et al.*, 1996) y en poblaciones africanizadas de *A. mellifera* (38,5%) (Moretto *et al.*, 1991).

Respecto al análisis de la dinámica de las poblaciones de *V. destructor* en las colonias, observamos una variación en el porcentaje de infestación de ácaros en abejas adultas (*Varroa* forética) y en la cría a través de la temporada apícola en ambos stocks. Particularmente, a principios del otoño el stock S presentó valores de infestación 2,2 (adultas) y 2,6 (cría) veces mayor que el stock M. La diferencia en la infestación de *Varroa* entre los stocks observada a principios de otoño, probablemente influyó en gran medida la supervivencia invernal y la fortaleza de las colonias al principio de la temporada.

El alto porcentaje de ácaros dañados, la mayor intensidad del daño infligido a los ácaros (discutido abajo), y el menor porcentaje de infestación tanto en abejas adultas como en cría observado durante la temporada apícola en el stock M sugieren que el comportamiento de *grooming* podría aumentar la mortalidad de los ácaros y, por tanto, modular su crecimiento poblacional dentro de las colonias. Estos resultados están en línea con trabajos ya publicados (Morse *et al.*, 1991; Moosbeckhofer, 1992; Ruttner y Hänel, 1992; Boecking y Ritter, 1993; Moretto *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 2018; Bienefeld *et al.*, 1999; Arechavaleta-Velasco y Guzmán Novoa, 2001; Guzmán Novoa *et al.*, 2012; Invernizzi *et al.*, 2015; Nganso *et al.*, 2017) y apoyan que el comportamiento de *grooming* puede ser un mecanismo importante que confiere resistencia a las colonias de *A. mellifera* hacia *V. destructor*. En este sentido, este rasgo, aún poco explorado en comparación con el comportamiento higiénico hacia celdas parasitadas, puede evolucionar por selección natural (como muestran los presentes resultados) y ser usado como blanco selectivo para la obtención y mejora de poblaciones de abejas resistentes al ácaro. Al respecto, Hunt *et al.* (2016) llevaron a cabo un programa de cría selectiva para la obtención de líneas de abejas resistentes a *Varroa* que tiene como característica un alto comportamiento de *grooming* (denominadas “mordedoras de ácaros”, del inglés, *mite biters*). Producto de una selección de 8 años sobre este carácter, lograron incrementar significativamente la proporción de ácaros

dañados en las poblaciones de abejas seleccionadas, iniciando con un promedio de 3% de ácaros lesionados al inicio de la selección (2007), hasta llegar a cerca del 50 % hacia el final del proceso selectivo (2015) (Hunt *et al.*, 2016). Estos autores sugirieron que, el daño infringido es un rasgo importante porque aunque no necesariamente provoque la muerte del ácaro, lo incapacita para poder aferrarse a las abejas, dificulta su movilidad dejando de ser una amenaza para la colmena. Recientemente se detectó que esta línea seleccionada presenta abejas con una estructura mandibular diferente respecto a abejas de colmenas no seleccionadas, que podría explicar la mayor capacidad de dañar a los ácaros (Smith *et al.*, 2021). Para continuar con la caracterización de nuestro stock M, consideramos relevante analizar en un futuro posibles diferencias morfológicas y/o fisiológicas respecto al material no seleccionado.

Nuestros resultados indicaron variación estacional en el porcentaje de ácaros dañados, como se había sugerido previamente para el comportamiento de *grooming* (Büchler, 1994; Moosbeckhofer, 1997). En concreto, las colonias M mostraron un alto porcentaje de ácaros dañados durante la primavera cuando la infestación forética es baja, coincidiendo con las observaciones previas de Mondragón *et al.* (2005). En este sentido, las colonias M (a diferencia de las S) responderían estratégicamente a la parasitación manteniéndola por debajo de un umbral de daño, conteniendo el crecimiento poblacional del ácaro durante la temporada, y asegurando una carga parasitaria que no comprometa la supervivencia invernal de la colonia. Esta respuesta estratégica de regulación de las cargas parasitarias se observó también en colonias resistentes caracterizadas por Mendoza *et al.* (2020). Los mencionados autores compararon colonias de *A. mellifera* resistentes y susceptibles a *V. destructor* de dos regiones de Uruguay, y detectaron que las resistentes mostraban mayor cantidad de ácaros dañados en pisos, sugiriendo que este carácter sería un factor importante en la regulación de la población del ácaro en esos materiales.

Aunque en Kruitwagen *et al.* (2017) sugirieron que el *grooming* estaría asociado a la carga parasitaria de la colonia y que solo sería útil a niveles altos de parasitación, este patrón fue observado específicamente en colonias control no seleccionadas (como nuestras colonias S) y de baja carga parasitaria. Por un lado, nuestros resultados resultan útiles para determinar el momento específico de la temporada en el que estimar con precisión la eficiencia del comportamiento de *grooming* de las colonias. Por otro lado, están en línea con las observaciones sobre colmenas seleccionadas para alto comportamiento higiénico, que resultan eficientes en la limpieza de la cría infestada por *Varroa* a bajos niveles de parasitación (Spivak y Reuter, 1998; 2001; Ibrahim y Spivak, 2006). Sería interesante poner a prueba esta hipótesis mediante la realización de ensayos controlados en mini-colmenas donde se evalúe la respuesta de *grooming* frente a diferentes cargas de ácaros.

La caída de ácaros en los pisos de las colonias ha sido descrita como una variable alternativa más sencilla y menos laboriosa para evaluar el comportamiento de *grooming* de una colonia en comparación con la proporción de ácaros dañados (Rosenkranz *et al.*, 1997; Bienefeld *et al.*, 1999; Aumeier, 2001; Kruitwagen *et al.*, 2017). Los presentes resultados evidenciaron una correlación positiva entre el porcentaje de ácaros caídos y dañados en la población M, pero no en la población S, por lo tanto, la validez de utilizar solo el porcentaje de caída como medida para seleccionar colonias con alto comportamiento de *grooming* debería evaluarse exhaustivamente en diferentes poblaciones. Para las poblaciones no seleccionadas, como nuestro stock S, la caída de ácaros puede reflejar principalmente una caída pasiva (consistente con su uso como estimador de la infestación de ácaros a nivel de colonia [Branco, Kidd y Pickard, 2006; Guzmán-Novoa *et al.*, 2012; Hunt *et al.*, 2016]) y no representar estrictamente una medida del *grooming*.

Para caracterizar las diferencias en la intensidad del comportamiento de *grooming* entre las poblaciones, analizamos los patrones de daño en los ácaros utilizando la clasificación previamente descrita por Corrêa-Marques *et al.* (2000). De acuerdo con estudios previos (Ruttner y Hänel, 1992; Lodesani *et al.*, 1996; Rosenkranz *et al.* 1997; Corrêa-Marques *et al.*, 2000; Stanimirović *et al.*, 2003), se encontró que los daños en las patas fueron las heridas más frecuentes en los ácaros de las colonias de ambos orígenes. Aunque el porcentaje de este tipo de daños no difirió entre éstos, el número de patas dañadas fue mayor en los ácaros de las colonias del origen M respecto a las colonias S. De hecho, más del 50% de los ácaros de las colonias M presentaron daño en 4 o más patas. Esto, junto con una aparente mayor frecuencia de lesiones múltiples (patas y daños en el gnatosoma o el escudo dorsal) en los ácaros de las colonias M, refleja que las abejas adultas de este origen exhiben un comportamiento de *grooming* más intenso. Nganso *et al.* (2017) detectaron el mismo tipo de lesiones combinadas en los ácaros de colonias de abejas de origen africano y europeo, con una mayor frecuencia en las primeras. En general, la alta tasa de mutilaciones en los ácaros observada en las colonias M apoya la robustez del daño de los ácaros como medida del nivel de *grooming* de una colonia. Aunque esta medición es laboriosa para los estudios de campo, representaría, de acuerdo a estudios previos y los presentes, el único rasgo fenotípico confiable para la selección de colonias de alto comportamiento de *grooming*. De acuerdo a lo propuesto por Emsen y colaboradores (2012), la estimación del crecimiento de la población de ácaros foréticos, estimado mediante la diferencia entre mediciones a lo largo del tiempo, podría representar un método más simple y que requiere menos tiempo para predecir la resistencia a *Varroa* en las poblaciones de abejas melíferas, que no involucre la selección sobre un comportamiento específico.

En relación al linaje mitocondrial de las colonias bajo estudio (europeo para ambos stocks M y S), y consideramos publicaciones previas que muestran que la región geográfica donde están establecidas

las colonias representa una zona híbrida en la que coexisten poblaciones de abejas melíferas africanizadas y europeas (Sheppard *et al.*, 1991; Agra *et al.*, 2018; Calfee *et al.*, 2020), es posible que nuestra población sobreviviente sea un ecotipo local adaptado que porte genes de ambos orígenes. De hecho, observamos diferencias en el temperamento de las poblaciones durante los relevamientos a campo, los que mostraron un comportamiento más excitable en las abejas de las colonias M respecto a las abejas S. En relación a esto, estudios anteriores revelaron que las subespecies de *A. mellifera* descritas como más excitables o incluso agresivas diferían de otras subespecies respecto al comportamiento *grooming* en ensayos de laboratorio (Aumeier 2001; Wilde *et al.*, 2003; Bąk y Wilde, 2015). Consideramos que otros marcadores, como los microsátélites y SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), así como herramientas de la morfometría geométrica, pueden ser de utilidad para analizar la introgresión de los linajes africanos en nuestros materiales (Agra *et al.*, 2018; Calfee *et al.*, 2020; Porrini *et al.*, 2020).

Es importante señalar que el comportamiento de *grooming* puede no ser el único rasgo sanitario implicado en la regulación de la parasitación de *Varroa* en las colonias M. De hecho, esta población expresó un más alto comportamiento higiénico hacia la cría muerta en comparación con la población comercial (S) durante el comienzo del otoño, cuando el porcentaje de infestación de la cría resultó elevado. Este resultado sugiere que las abejas de la población superviviente muestran una mayor higiene general y pueden responder conductualmente al estado de parasitación de la colonia. Además, es consistente con lo obtenido por Mendoza *et al.* (2020) quienes observaron que el comportamiento higiénico es mayor en colmenas resistentes respecto a colmenas susceptibles al ácaro en Uruguay. Sin embargo, dado que el método utilizado aquí para estimar el comportamiento higiénico puede sobrestimar su expresión (Espinosa-Montaña *et al.*, 2008), estos resultados deben tomarse con precaución y confirmarse en futuras investigaciones que utilicen métodos más robustos para analizar el efecto de este comportamiento complejo. Adicionalmente, a pesar de que el comportamiento higiénico frente a crías muertas no implica necesariamente una mayor resistencia al ácaro (por ejemplo, Danka *et al.*, 2013), estaría vinculado a otros comportamientos asociados como el comportamiento higiénico dirigido a *Varroa* (VSH del inglés, *Varroa Sensitive Hygiene*; Spivak, 1996; Vizintini, 2018; Vizintini *et al.*, 2021), que no fueron medidos durante la caracterización a campo. En este sentido, el análisis de otros rasgos que pueden determinar conjuntamente el fenotipo sobreviviente de nuestra población M (como se ha evidenciado previamente en otras poblaciones sobrevivientes de forma natural: Fries *et al.*, 2006; Locke y Fries, 2011; Harris *et al.*, 2010; Panziera *et al.*, 2017; Oddie *et al.*, 2018) es necesario.

El comportamiento de *grooming* puede estar influenciado por factores ambientales (Stanimirović *et al.*, 2003; Currie y Tahmasbi, 2008), y los umbrales de daño de *Varroa* pueden cambiar bajo diferentes

condiciones climáticas (Meixner *et al.*, 2014; Giacobino *et al.*, 2017). El análisis del desempeño comportamental de las colonias M y S en diferentes ambientes permitiría ayudar a entender la influencia de la interacción genotipo x ambiente (Büchler *et al.*, 2014; Meixner *et al.*, 2014) sobre el comportamiento de *grooming*. Asimismo, el desarrollo de programas regionales de cría de abejas melíferas resistentes a los ácaros, que incluyan el uso de las poblaciones adaptadas localmente merece ser considerado, especialmente en Argentina, donde coexisten en una misma región apícola subregiones o ecorregiones altamente contrastantes.

1.5. CONCLUSIÓN

A partir de la caracterización integral de una población de *A. mellifera* susceptible a *V. destructor* (S) y colonias sobrevivientes al ácaro (M) establecidas en clima subtropical (Reconquista, Santa Fe) proponemos al comportamiento de *grooming* hacia *V. destructor* como un rasgo clave en la supervivencia diferencial de las colonias del stock M. Esta propuesta se sustenta en que pudimos evidenciar una regulación estratégica (acciones en momentos específicos de la temporada) de las cargas parasitarias dentro de las colonias que permitiría minimizar el impacto de la parasitosis. De esta manera, concluimos que la población sobreviviente muestra comportamientos de resistencia activa al ácaro, que pueden haber evolucionado como respuesta a la selección en un ambiente sin uso de acaricidas. Nuestros resultados ponen de relieve la importancia de considerar el *grooming*, al igual que el comportamiento higiénico dirigido a celdas parasitadas, como un carácter relevante a ser incluido en los programas de mejoramiento genético apícola que proponen conservar y multiplicar stocks de abejas resistentes a *V. destructor*. Nuestros resultados exhiben, además, la necesidad de continuar profundizando el estudio de este comportamiento social relativamente poco explorado en *A. mellifera*, de su dinámica grupal e individual para entender y explicar lo observado a nivel de la colmena en el campo y a la vez analizar el impacto del ambiente sobre su expresión. Finalmente, consideramos clave iniciar estudios sobre la abundancia y diversidad de virus, así como la tolerancia viral en estos materiales para entender en mayor profundidad la interacción entre la abeja y el ácaro, considerando el rol activo de este último como vector viral.

CAPÍTULO 2.

**Caracterización del comportamiento de
grooming de *Apis mellifera* en arenas
experimentales**

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Generalidades del comportamiento de *grooming*

El comportamiento de *grooming* (CG) es una característica que se observa en varios taxones del reino animal, ya que ha sido descrito en artrópodos, vertebrados, e incluso en pulpos, y tiene orígenes evolutivos muy antiguos (Sachs 1988; Spruijt *et al.*, 1992; Mather y Alupay, 2016). Constituye una respuesta generalizada para remover objetos extraños de la superficie corporal y se lo ha asociado también a funciones tales como la distribución de sustancias a través de la superficie del cuerpo, la quimio-comunicación, la interacción social, la reducción de estrés y la locomoción (revisado en De Roode y Lefèvre, 2012). Se cree que el cuidado de la superficie corporal es importante para la prevención de enfermedades mediante la eliminación de patógenos, parásitos y parasitoides (Yanagawa *et al.*, 2007; Wilson-Rich *et al.*, 2009; Vincent y Bertram, 2010). Por ejemplo, las secreciones hidrofóbicas y bacteriostáticas esparcidas por la superficie del cuerpo mejoran las propiedades de barrera contra patógenos del tegumento y también actúan como firmas químicas tanto en vertebrados como en artrópodos (Zhukovskaya *et al.*, 2013). Asimismo, el CG es la primera línea de defensa de algunos mamíferos frente a la infestación por garrapatas, y se ha demostrado que los individuos con un comportamiento de *grooming* deficiente son vulnerables a la garrapatosis (Mooring *et al.*, 2009).

El CG ha sido descrito en detalles en insectos (p. ej., Farish, 1972; Basibuyuk y Quicke, 1999). Estos estudios se han dedicado a la descripción, clasificación y secuencia de los movimientos involucrados y de la variedad de estructuras especializadas utilizadas en la limpieza de la cutícula (revisado en Zhukovskaya *et al.*, 2013). Por ejemplo, se sabe que en *Drosophila melanogaster*, la eliminación del polvo mediante *grooming* comienza por los ojos y ocurre de manera jerárquica siguiendo una secuencia que procede en el orden: ojos > antenas > abdomen > alas > notum, de manera independiente uno de otros (Hampel *et al.*, 2017). También se ha discutido su rol clave como comportamiento adaptativo dentro de este clado (revisado en De Roode y Lefèvre, 2012).

2.1.2. Comportamiento de *grooming* en abejas melíferas

En abejas melíferas, el CG involucra el uso de piezas bucales, así como también el movimiento de patas pro y/o mesotorácicas para la remoción de polvo, polen, u algún agente extraño, tal como ectoparásitos (Jander, 1976; Pettis y Pankiw, 1998; Boecking y Spivak, 1999; Micholson, 2022). En particular, el CG hacia el ácaro *V. destructor* implica la habilidad de las abejas obreras de detectar y remover los ácaros de la superficie corporal propia (auto-*grooming*) o de sus compañeras de nido (*allo-grooming*), muchas veces dañándolos en el proceso (Peng *et al.*, 1987). En este último caso, las

abejas obreras que necesitan ser limpiadas pueden reunir a una o más compañeras de nido mediante una danza específica de invitación (Haydak, 1945; Land y Seeley, 2004).

La danza de invitación a realizar el CG fue descrita por primera vez por Haydak (1945) y, más tarde, caracterizada por Milum (1955). Posteriormente este comportamiento fue cuantificado y analizado en mayor detalle (Schenider *et al.*, 1986, 1987, 2001; Land y Seeley, 2004). Para realizar esta danza, las abejas obreras balancean todo su cuerpo de un lado al otro con movimientos vibratorios estimulando a otras compañeras de nido para que se acerquen y limpien a quien está realizando el baile (Land y Seeley, 2004). Estos autores demostraron que abejas de *A. mellifera* a las que estimularon con polvo de tiza ejecutaban más danza en comparación con abejas control, y confirmaron que el factor principal que desencadena la danza es la acumulación de pequeñas partículas en la base del ala (Land y Seeley, 2004). Por su parte, Pettis y Pankiw (1998) llevaron a cabo ensayos en *A. mellifera* utilizando colmenas de observación y realizando infestaciones artificiales con ácaros traqueales de la especie *Acarapis woodi*. Detectaron que el número de abejas que realizaban la danza de invitación aumentó significativamente a medida que se incrementó el porcentaje de infestación por el ácaro (0, 50 y 70 % de infestación). Recientemente, Cini *et al.* (2020) no detectaron diferencias en los perfiles de proteínas quimiosensoriales expresadas en antenas entre abejas que realizaban *allo-grooming* respecto a abejas que no, y sugirieron que la detección de las abejas que necesitan ser limpiadas podría desencadenarse mediante estímulos visuales y mecánicos a través de este baile.

2.1.2.1. Diferencias entre *A. mellifera* y *A. cerana*

En *Apis cerana* Fabricius, hospedador original de *V. destructor*, el CG es uno de los principales mecanismos de regulación de las poblaciones del ácaro dentro de las colonias. Es considerado un rasgo de inmunidad social muy importante en esta especie, ya que permite mantener la población de ácaros en umbrales bajos, evitando daños significativos a la colonia y contribuyendo al equilibrio en la relación parásito-hospedador (Büchler *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 1987; revisado por Pritchard, 2016). Las abejas obreras de esta especie son capaces de localizar, morder y eliminar los ácaros que se encuentran sobre la superficie corporal con una alta eficiencia. En efecto, Peng (1988) detectó que el CG en *A. cerana* induce la eliminación de más del 99% de los ácaros en tan sólo dos horas, y que más del 70% de éstos presentan lesiones físicas visibles. La eficiencia con que se expresa el comportamiento en esta especie podría explicar la resistencia hacia *V. destructor* que presentan sus colonias, producto de un largo período de coevolución (Evans y Spivak, 2009).

En el caso de *A. mellifera*, el CG también se ha observado, aunque expresado en menor frecuencia (Boecking y Ritter, 1993; Fries *et al.*, 1996). Por ejemplo, Buchler y colaboradores (1992), encontraron que *A. cerana* removió de forma exitosa el 75% de los ácaros en comparación con *A. mellifera* que

exhibió una remoción del 48%. Otros estudios han demostrado una variación significativa en la eficiencia e intensidad del CG entre diferentes subespecies de *A. mellifera* (revisado en Pritchard, 2016). Asimismo, las abejas africanizadas serían más eficientes en el acicalamiento de los ácaros respecto a las subespecies europeas (Aumeier, 2001; Guzmán-Novoa *et al.*, 2012; Moretto *et al.*, 1993; Morfin *et al.*, 2020). Por su parte, Rinderer *et al.* (2001) observaron que las abejas originarias de la región de Primorsky en Rusia realizaban con mayor intensidad este comportamiento en relación con las abejas originarias de Luisiana, EE.UU. Asimismo, en Thakur *et al.* (1997) durante un ensayo de grabación en *A. mellifera carnica* Pollman encontraron que, de todas las abejas que realizaban *allo-grooming* ninguna fue capaz de quitar el ácaro a alguna de sus compañeras de nido. Por último, un estudio reciente detectó diferencias en la intensidad del CG entre abejas de *A. mellifera* provenientes de poblaciones resistentes y susceptibles a *V. destructor* (Dadoun *et al.*, 2020).

2.1.2.2. Especialización del comportamiento hacia el ácaro

Una cuestión que ha sido poco explorada en los estudios de laboratorio es si el CG hacia *V. destructor* es una actividad específica de ciertas abejas dentro de la colonia (“especialistas”) o de abejas de una determinada edad, así como se observa para otros comportamientos de inmunidad social como el comportamiento higiénico (por ej. Panasiuk *et al.*, 2010; Scannapieco *et al.*, 2016; Spivak y Danka 2021).

A partir de trabajos pioneros en *A. mellifera*, se observó que dentro de las colonias de abejas hay grupos de obreras que no tendrían ninguna tarea “asignada” y en cambio estarían a la espera de alguna señal o estímulo ambiental específico (Kolmes, 1989; ver Robinson, 1992). Estos individuos estarían disponibles para compensar la deficiencia en alguna tarea, o para responder a emergencias, y solo una pequeña proporción de abejas se volvería especialista, incluyendo aquellas que hacen *allo-grooming* (ver Kolmes, 1989). En efecto, Winston y Punnett (1982) observaron abejas que realizaron *allo-grooming* durante toda su vida. Más tarde, Moore y colaboradores encontraron un cierto nivel de especialización en el CG entre las 200 abejas de *A. mellifera* observadas, detectando que una abeja había realizado actividades de acicalamiento a sus compañeras de nido el 84% de las veces en que fue observada, desplegando esta tarea casi de forma exclusiva desde los 4 hasta los 21 días de edad (Moore *et al.*, 1995). Los factores involucrados en el desarrollo de obreras especialistas en comportamiento de *allo-grooming* hacia *V. destructor* estarían asociados al despliegue del baile de invitación por parte de las abejas parasitadas, a la densidad poblacional de ácaros dentro de la colonia y la heredabilidad del carácter (revisado en Pritchard, 2016).

Por otro lado, Pettis y Pankiw (1998) estudiaron el comportamiento de *grooming* en *A. mellifera* en función de la edad de las obreras, y observaron que el 90% de las actividades de acicalamiento era

realizado por abejas que tenían entre 5 y 15 días. Recientemente en Dadoun *et al.* (2020) detectaron, en un ensayo con abejas de *A. mellifera*, que si bien las obreras de diferentes edades estaban involucradas en el CG, las de 21 días de edad lo hacían en menor proporción respecto a las más jóvenes.

2.1.2.3. Factores que influyen en el grooming

Entre los factores que pueden influir en el comportamiento de acicalamiento se han descrito el entorno ecológico (por ejemplo, la disponibilidad de alimento y/o la competencia) y social (por ejemplo, la tasa de interacción y las señales de comunicación entre individuos dentro de la colonia) (Jandt *et al.*, 2013). Asimismo, se ha postulado que factores abióticos podrían modular la expresión del CG hacia *V. destructor*. Por ejemplo, Currie y Tahmasbi (2008) encontraron diferencias significativas en el número de ácaros caídos al someter a abejas a distintos regímenes térmicos (25 °C y 34 °C). Además, observaron que a baja humedad, las abejas eran más exitosas limpiando y eliminando una mayor proporción de ácaros (Currie y Tahmasbi, 2008). Por otro lado, se ha propuesto que la susceptibilidad de los ácaros a la desecación aumentaría la eficiencia del CG en condiciones de baja humedad (Micholson, 2022).

2.1.2.4. Evaluación del comportamiento en el laboratorio

Para caracterizar la intensidad y efectividad del CG de *A. mellifera* hacia *V. destructor* es necesario recurrir a estudios de gran complejidad en colmenas completas o colmenas de observación (Bozic y Valentincic, 1995; Fries *et al.*, 1996; Moretto *et al.*, 1993, 1997; Peng *et al.*, 1987), que implican el desarrollo de ensayos por largos períodos que no necesariamente garantizan el registro continuo del comportamiento de una abeja en particular frente al ácaro (Büchler *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 1987; Thakur *et al.*, 1997). Es por ello, que se han desarrollado métodos de observación del CG en abejas individuales o grupos de abejas utilizando cajas de Petri. La evaluación del CG empleando abejas confinadas permite descartar factores ambientales, del entorno ecológico o social no controlados en condiciones de campo (ingreso de néctar, grado de infestación, temperatura ambiente, tamaño de la colonia). Dichos métodos incluyen la observación focal de las reacciones de las abejas frente a la infestación artificial con *V. destructor* (Arechavaleta-Velasco y Guzmán-Novoa, 2001; Aumeier, 2001; Currie y Tahmasbi, 2008; Andino y Hunt, 2011; Guzmán-Novoa *et al.*, 2012; Invernizzi *et al.*, 2016). Por ejemplo, en un estudio pionero, Aumeier (2001) desarrolló un método para describir y cuantificar varios componentes del CG en un corto intervalo de tiempo y bajo condiciones controladas en abejas africanizadas y europeas, mediante el uso de placas de petri. La investigadora reportó cinco reacciones de las abejas asociadas a este comportamiento frente al ácaro: (1) *Limpieza o sacudida débil*, que lo

definió como refregarse vagamente las antenas y sacudir el abdomen por un periodo muy breve (menos de 5 segundos); (2) *Limpieza o sacudida intensa*, en el que la abeja sacude el abdomen de forma más vigorosa durante un período más prolongado (más de 5 segundos), y ejecuta la danza de invitación al CG, en este caso la limpieza abarca todo su cuerpo no solo las antenas; (3) *Intento de morder*, que la abeja realiza con la intención de desprenderse el ácaro mediante el uso de sus mandíbulas; (4) *Comportamiento de rodar*, que la abeja despliega y consiste en movimientos de rodar sobre su zona dorsal intentando sacarse el ácaro; (5) *Intento de volar*, que consiste en vuelos muy cortos, que imitan saltos. Por su parte, en el año 2016, Invernizzi y su grupo de trabajo llevaron a cabo un ensayo en cajas de Petri que tenía como objetivo evaluar el CG en abejas africanizadas e italianas a nivel individual, de grupo y colonia. Las reacciones que observaron a nivel individual se asemejaron a las postuladas por Aumeier (2001), aunque se consideraron por separado las reacciones de limpieza y sacudir el abdomen, otorgando dos niveles, intenso y débil (Invernizzi *et al.*, 2016).

Otra propuesta para observar directamente el CG fue la implementada por Espinosa-Montaña *et al.* (2004), quienes usaron cuadros con un panal plástico cubierto por una placa de acrílico a la que se le hicieron dos aberturas para poder introducir las abejas y realizar las infestaciones artificiales con los ácaros (Figura 29). En este trabajo, los autores evaluaron dos genotipos de abejas diferentes (africanizadas y europeas) e intentaron proveer un ambiente más natural para la evaluación del CG.

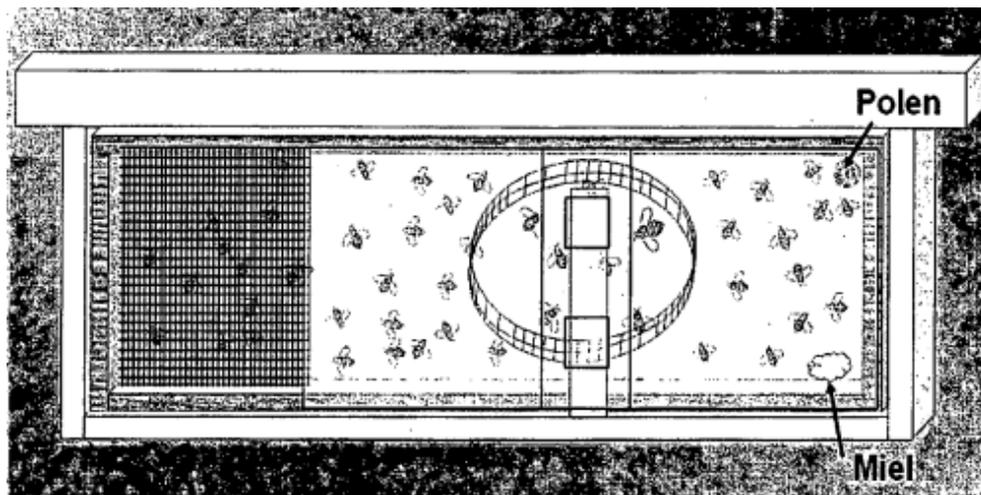


Figura 29. Esquema del cuadro de observación montado para la evaluación del CG de acuerdo a Espinosa-Montaña *et al.* (2004).

Este dispositivo fue posteriormente utilizado para seleccionar abejas que responden de manera casi inmediata a la infección artificial con *V. destructor* y usarlas de insumo en estudios de mapeo de QTL (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2012).

En función de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, en el cual se evidenció la importancia del CG de las colonias de *A. mellifera* de linaje europeo en la resistencia a *V. destructor*, y con el objetivo de entender más profundamente este comportamiento a nivel individual, en este capítulo presentaré los resultados de ensayos de laboratorio. Los mismos se realizaron en arenas experimentales especialmente diseñadas para observar y describir el CG en abejas de diferentes edades y genéticas (sobrevivientes y susceptibles). Las observaciones focales realizadas me permitirán describir las reacciones desplegadas por las abejas frente a la infestación artificial con *V. destructor*, analizando potenciales diferencias en la intensidad de acicalamiento y el tiempo de inicio de la respuesta. Discutiré los resultados obtenidos en las abejas de cada stock genético y su asociación con el fenotipo de *grooming* observado a nivel de la colonia.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Materiales

2.2.1.1. Colonias de *A. mellifera*

Se evaluaron los stocks de *A. mellifera* previamente descritos en el capítulo 1: (1) una población de abejas resistentes a *V. destructor* (M) que exhibe altos niveles de comportamiento de *grooming* a nivel de colonia, y (2) una población de abejas comerciales susceptible al ácaro (S) que fue considerada como control para este ensayo. Para los experimentos se usaron tres colmenas de cada stock (M y S) que exhibieron los fenotipos de *grooming* más contrastantes respecto al porcentaje de ácaros dañados colectados en los pisos técnicos (promedios: M= 25% y S=9%). De cada colonia, se seleccionaron dos cuadros que contenían cría operculada (pupa con cabeza pigmentada de coloración marrón y ojos oscuros). Veinticuatro horas antes de la emergencia de las abejas, cada cuadro se colocó individualmente en una colmena de observación y se mantuvo en cámara de cría a temperatura ($33 \pm 0,5$ °C) y humedad ($75 \pm 2\%$) controlada. Una vez emergidas, se marcó a las abejas en el tórax, usando un marcador de abeja reina (Figura 30). Se utilizaron diferentes colores a fin de identificar con facilidad la edad y el origen genético (M y S) de cada abeja. Para cada stock se obtuvieron cohortes de aproximadamente 100 abejas obreras de la misma edad. Una vez marcadas, las abejas fueron devueltas a las colonias correspondientes (Figura 30). A la edad de seis, diez y catorce días, se visitó nuevamente el apiario para la colecta de las abejas marcadas en las colonias, haciendo uso de un aspirador. Las abejas colectadas se transportaron al laboratorio para realizar los ensayos comportamentales (Figura 30). La selección de edades a evaluar se basó en estudios previos sobre el

rango etario en el que las abejas pueden potencialmente realizar el comportamiento de *grooming* (Kolmes, 1989; Robinson, 1992; Moore *et al.*, 1995).

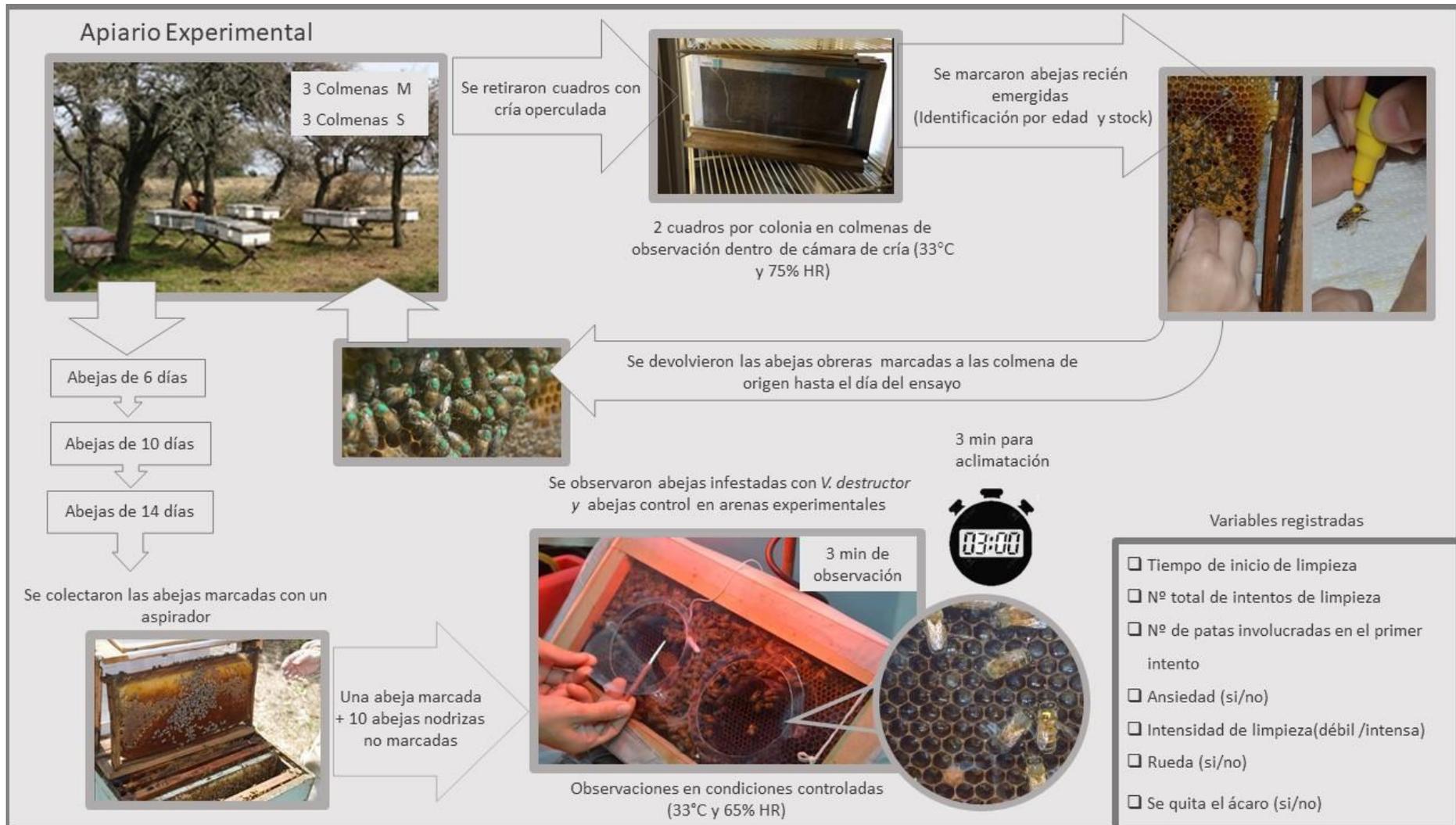


Figura 30. Esquema descriptivo de las etapas del bioensayo realizado para la evaluación del comportamiento de *grooming* en abejas individuales.

2.2.1.2. Muestras de *V. destructor*

Para las infestaciones artificiales se colectaron ácaros de colonias de *A. mellifera* con altas cargas de *Varroa* forética (>5%), a las que se denominaron “colmenas dadoras”, utilizando el método del azúcar impalpable (Dietemann *et al.*, 2013). Dichas colonias se encuentran en el apiario experimental del Instituto de Genética (INTA-Castelar). Los ácaros foréticos recolectados fueron colocados sobre un papel *tissue* húmedo y limpiados con un pincel fino humedecido con agua destilada para remover los restos de azúcar. Aquellos ácaros que presentaron dificultad para moverse o agarrarse de las cerdas del pincel, se consideraron no aptos y se descartaron. Los ácaros activos se transfirieron a placas de Petri cubiertas con papel *tissue* húmedo que contenían también larvas de abejas obreras. Estas placas se llevaron a una sala con temperatura controlada ($33 \pm 0,5$ °C) y se usaron dentro de las dos horas de la colecta para realizar la infestación artificial de las abejas. Pasadas las dos horas, los ácaros se descartaron.

2.2.2. Métodos

2.2.2.1. Ensayos en cuadros experimentales

Se prepararon cuadros de observación para registrar el comportamiento de *grooming*. Se realizaron modificaciones significativas al método previamente descrito por Espinosa-Montaña *et al.* (2004) y Arechavaleta-Velasco *et al.* (2012) de forma que permitiera la evaluación del CG en dos abejas en simultáneo, y a la vez que reprodujera un ambiente lo más similar posible al entorno natural de la colonia. Brevemente, se colocó un marco de madera sobre un cuadro estándar de tipo Langstroth (42x20 cm) que contenía miel en la parte superior. Estos cuadros provenían de la misma colmena de donde eran las abejas a ser evaluadas. Se incrustaron en la cera dos aros de acetato (9 cm de diámetro), que sirven como arenas experimentales pareadas (Figura 31). Sobre el marco de madera se colocó una tapa de acrílico que dispone de dos perforaciones. Estas perforaciones tienen, cada una, una tapa de acetato que facilita la manipulación de las abejas y los ácaros al momento de la infección y recambio de las abejas (Figura 31).

Se realizaron dos tratamientos sobre abejas de las distintas edades y stocks: (i) abejas infestadas con *V. destructor*, en las que se colocó un ácaro en la parte dorsal del tórax usando un pincel fino, y (ii) abejas control, a las que se las tocó con el pincel en la parte dorsal del tórax.

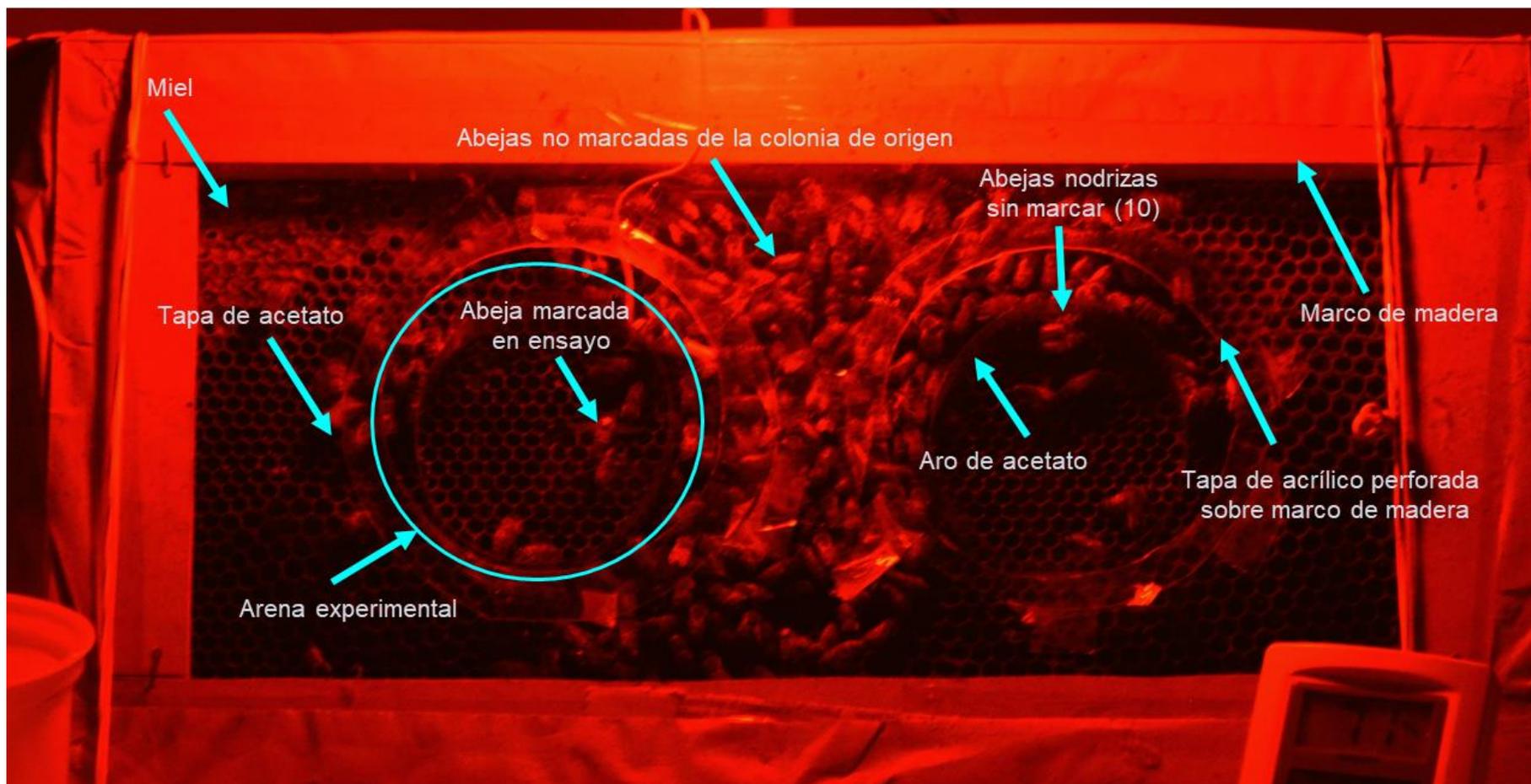


Figura 31. Fotografía del cuadro experimental diseñado para la medición del CG. Se observan las dos arenas experimentales donde se realizaron las observaciones en las abejas marcadas sometidas a los tratamientos control y de infestación con *V. destructor*. Los ensayos se llevaron a cabo bajo luz roja y en condiciones controladas de temperatura.

Se colocó una abeja marcada en cada arena experimental junto con diez abejas nodrizas (sin marcar) de la misma colonia y se las dejó durante tres minutos para que se aclimataran antes de comenzar las observaciones. Luego, en una de las arenas se infestó a la abeja marcada con un ácaro (“tratamiento *Varroa*”) y en la otra, se tocó a la abeja marcada con un pincel (“tratamiento control”). Una vez aplicados los tratamientos, se comenzó la observación de la abeja marcada. Durante la observación de 3 minutos, se registraron diferentes respuestas de acicalamiento, que ya habían sido descritas en estudios previos realizados por Aumeier (2001), Invernizzi *et al.* (2016) y Hamiduzzaman *et al.* (2017). Las variables observadas fueron: el tiempo en que demora la abeja en iniciar la limpieza, el número de patas involucradas en este primer intento de limpieza, el número total de intentos realizados durante el tiempo de observación y la intensidad de la limpieza. La limpieza se clasificó como una variable dicotómica según cuán vigorosos o débiles fueran los movimientos del cuerpo (Aumeier, 2001). Una quinta variable “Ansiedad”, que fue registrada y categorizada de acuerdo a Bąk y Wilde (2015) como: “sin ansiedad” (permanecer quieta); o “ansiedad” (que implica una actividad motora intensa con agitación rápida del cuerpo). Durante el tiempo de observación, también se registró si la abeja marcada rodaba y si efectivamente se quitaba el ácaro del cuerpo (Aumeier, 2001). Entre 15 y 20 abejas marcadas fueron evaluadas individualmente por stock (M y S), edad (6, 10 y 14 días) y tratamiento (ácaro y control), alcanzando un total de 584 abejas estudiadas. Las observaciones se realizaron en oscuridad en una sala de laboratorio iluminada con luz roja y acondicionada a temperatura controlada ($33 \pm 0,5$ °C) (Figura 31).

2.2.2.2. Análisis estadístico

Las posibles diferencias en las variables respuesta se analizaron, de forma independiente, con un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) considerando la edad, el stock y el tratamiento como factores fijos, y el día de evaluación, la colonia y las abejas apareadas como factores aleatorios. Las variables, “tiempo de respuesta del primer intento” y “número de intentos” se ajustaron a distribuciones Gamma y Poisson, respectivamente. La variable “número de patas utilizadas durante el primer intento de *grooming*” se ajustó a una distribución binomial (número de patas utilizadas vs. número de patas no utilizadas). El resto de las variables (nivel de ansiedad, intensidad de limpieza y comportamiento de rodar) se ajustaron a una distribución de Bernoulli, en estos casos los modelos se probaron mediante la prueba de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow. Para obtener la estructura de varianza más adecuada se utilizó el criterio de información de Akaike. Para comparar las variables respuesta entre factores (edades, stocks y tratamientos) se realizaron análisis post-hoc utilizando la prueba de Fisher de diferencia mínima significativa (LSD) ($\alpha = 0,05$). Para evaluar las diferencias en la efectividad del *grooming* entre los stocks, las frecuencias de abejas que pudieron quitarse con éxito

el ácaro de sus cuerpos se compararon mediante el test exacto de Fisher sobre tablas de contingencia. Todos los análisis se realizaron con la función `glmer` del paquete R "lme4" (Bates, 2015; R Core Team, 2017). Se realizó un análisis de componentes principales (CP) para describir la relación entre las variables de *grooming* (solo para las estadísticamente significativas en el análisis GLMM) y comparar en un espacio multidimensional abejas R y S infestadas con los ácaros. Este análisis se realizó utilizando InfoStat 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Tiempo de inicio del comportamiento de *grooming*

Se detectaron diferencias significativas en el tiempo tomado por las abejas para iniciar el comportamiento de *grooming* entre los tratamientos (infestación con ácaro y control), stocks (M y S) y edades (6, 10 y 14 días), encontrándose interacciones significativas entre dichos factores (Tratamiento: $F_{1,572} = 223,55$, $P < 0,001$; Genética: $F_{1,572} = 73,31$, $P < 0,001$; Edad: $F_{2,572} = 8,70$, $P = 0,002$; Genética x Edad: $F_{2,572} = 1,75$, $P = 0,17$; Genética x Tratamiento: $F_{1,572} = 22,84$, $P < 0,001$; Edad x Tratamiento: $F_{2,572} = 0,91$, $P < 0,401$; Tratamiento x Genética x Edad: $F_{2,572} = 4,85$, $P = 0,008$). Las abejas infestadas artificialmente con *V. destructor* comenzaron a limpiarse significativamente antes que las abejas a las que se les aplicó el tratamiento control, para todas las edades analizadas y para ambos stocks ($P < 0,05$; comparaciones *post-hoc*, prueba Fisher LSD; Figura 32). Específicamente, entre las abejas que fueron infestadas con un ácaro, los individuos del stock resistente (M) comenzaron a limpiarse significativamente antes (con un valor medio de 8,8 segundos para todas las edades) en comparación con las abejas del stock susceptible (S) (valor medio de 32,4 segundos para todas las edades) ($P < 0,05$; comparaciones *post-hoc*, prueba Fisher LSD; Figura 32). Para el stock M, se detectaron diferencias significativas en el tiempo de inicio del CG hacia el ácaro entre las edades evaluadas, siendo las abejas más jóvenes (6 días de edad) las que respondieron más rápido a la infestación que las abejas más viejas (10 y 14 días de edad) ($P < 0,05$; comparaciones *post-hoc*, Prueba LSD de Fisher; Figura 32). En el caso del stock S, el tiempo del primer intento de *grooming* fue menor en las abejas de 6 y 10 días en comparación con las abejas de 14 días (Figura 32).

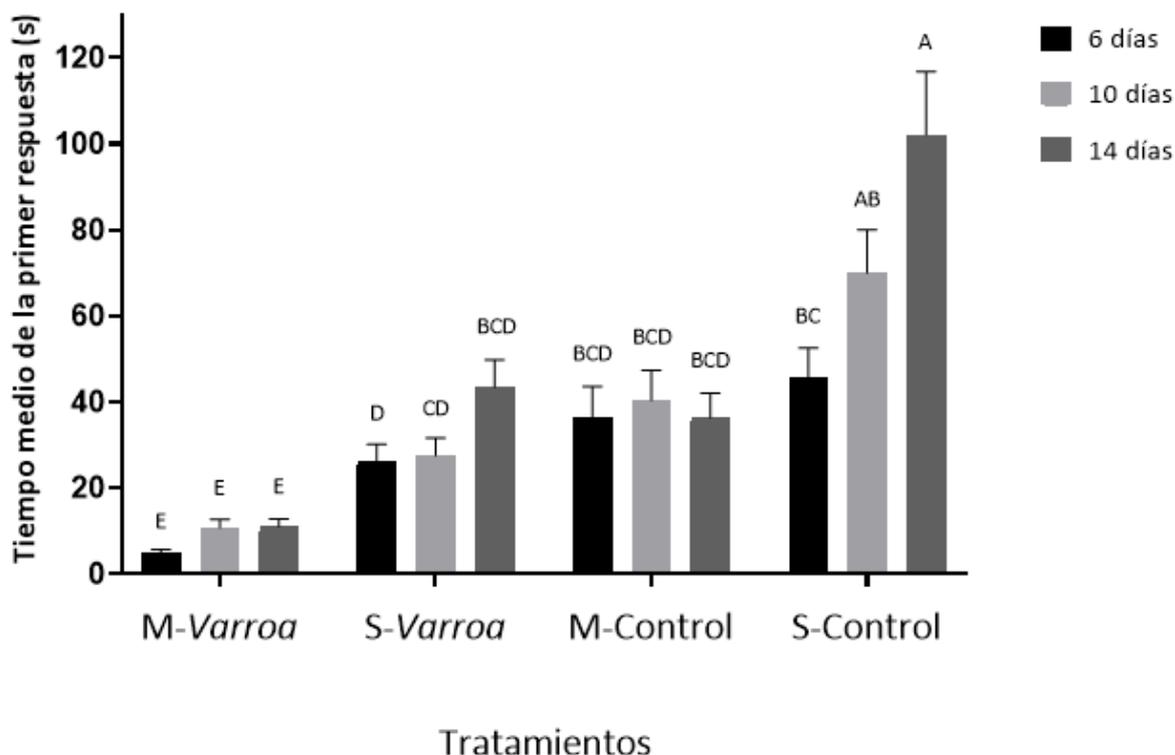


Figura 32. Tiempo medio (segundos \pm SE) de la primera respuesta de *grooming* realizada por las abejas expuestas al tratamiento con *V. destructor* (infestación con un ácaro) y al tratamiento control (toque de pincel). Los valores se muestran para las poblaciones de *A. mellifera* susceptibles (S) y resistentes (M), en las tres edades analizadas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre edades, stocks y tratamientos por Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

2.3.2. Nivel de respuesta del comportamiento de *grooming*

Se encontraron diferencias significativas en el número de intentos de *grooming* realizados por las abejas entre tratamientos, stocks y edades (Tratamiento: $F_{1,569} = 138,97$, $P < 0,001$; Genética: $F_{1,569} = 84,46$, $P < 0,001$; Edad: $F_{2,569} = 9,115$, $P = 0,001$; Genética x Edad: $F_{2,569} = 10,47$, $P < 0,001$; Genética x Tratamiento: $F_{1,569} = 5,22$, $P < 0,227$; Edad x Tratamiento: $F_{1,569} = 1,77$, $P = 0,1711$; Tratamiento x Genética x Edad: $F_{2,569} = 2,63$, $P = 0,072$) (Cuadro 6). Las comparaciones *post-hoc* revelaron que las abejas de ambos stocks y de todas las edades, realizaron un mayor número de intentos de limpieza en respuesta a la infestación con el ácaro en comparación con el tratamiento de control (Figura 33). Además, cuando se compararon los stocks, las abejas resistentes M exhibieron un mayor número medio de intentos contra el ácaro que las abejas S, mostrando las primeras casi el doble de intentos de limpieza a todas las edades (Figura 33). Analizando el factor edad, observamos que las abejas M mostraron un mayor número de intentos de *grooming* contra el ácaro en edades más jóvenes (6 y 10 días de edad) en comparación con las abejas más viejas (14 días de edad) del mismo stock (Figura 33). Este patrón no fue evidente para las abejas del stock S.

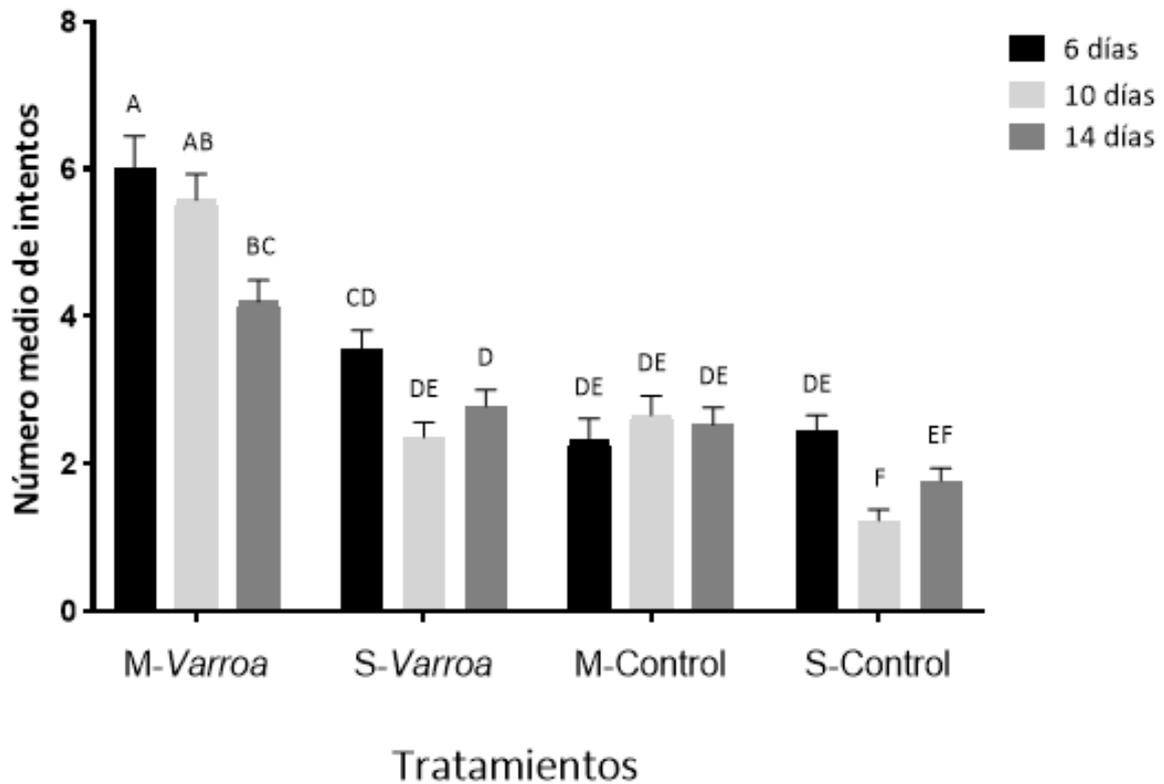


Figura 33. Número medio de intentos (\pm SE) que realizaron las abejas en respuesta al tratamiento con *V. destructor* (infestación con un ácaro) o al tratamiento control (toque de pincel). Cada barra representa los valores para abejas de diferentes edades de los stocks de *A. mellifera* resistente (M) y susceptible (S). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las edades de las abejas, los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

Cuadro 6. Número de intentos que realizaron las abejas marcadas durante el tiempo de observación en respuesta al tratamiento de *Varroa* (infestación con un ácaro) y al tratamiento control (toque de pincel). Los valores se muestran para las abejas de las poblaciones de *A. mellifera* S y M, a diferentes edades. Letras diferentes indican diferencias significativas entre edades, stocks (origen genético) y tratamientos por Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

Edad de las Abejas	Stock Susceptible (S)		Stock Resistente (M)	
	Control	Infestación Artificial	Control	Infestación Artificial
6	2,4 (0,21) DE	3,5 (0,25) CD	2,3 (0,29) DE	6,0 (0,45) A
10	1,2 (0,15) F	2,3 (0,2) DE	2,6 (0,26) DE	5,6 (0,35) AB
14	1,8 (0,17) EF	2,8 (0,22) D	2,5 (0,23) DE	4,2 (0,29) BC

Se encontraron diferencias significativas en la probabilidad de que las abejas utilicen todas sus patas durante el primer intento de limpieza entre tratamientos, stocks y edades, con interacciones significativas entre los factores (Tratamiento: $F_{1, 568} = 290,23$, $P < 0,001$; Genética: $F_{1, 568} = 19,88$, $P < 0,001$; Edad: $F_{2, 568} = 7,29$, $P = 0,0007$; Genética x Edad: $F_{2, 568} = 3,50$, $P = 0,031$; Genética x Tratamiento: $F_{1, 568} = 53,90$, $P < 0,001$; Edad x Tratamiento: $F_{2, 568} = 14,88$, $P < 0,001$; Tratamiento x Genética x Edad: $F_{2, 568} = 13,67$, $P < 0,001$). Específicamente, la probabilidad del uso de la totalidad de las patas durante la limpieza difirió entre los tratamientos: las abejas exhibieron entre un 75 % y 99 % menos de probabilidad de usar todas sus patas en respuesta al tratamiento de control en comparación al tratamiento de infestación, independientemente de la edad o la genética ($P < 0,05$; comparaciones *post-hoc*) (Archivo Suplementario S1a). Cuando se comparó el origen genético, observamos que la probabilidad de que las abejas S de 6 y 10 días usaran la totalidad de sus patas en la limpieza hacia el ácaro fue menor respecto a la de las abejas M de la misma edad (Archivo Suplementario S1b). En relación a la edad, las abejas más jóvenes del stock M mostraron una mayor probabilidad de usar la totalidad de sus patas en la limpieza hacia el ácaro en comparación con las abejas más viejas del mismo grupo (Archivo Suplementario S1c). No se detectaron diferencias en el uso de las patas entre las edades para el caso de las abejas S (Archivo Suplementario S1c).

No se detectaron diferencias significativas en la intensidad de limpieza entre los tratamientos, stocks o edades de abejas (Tratamiento: $F_{1, 560} = 0,000017$, $P = 0,9967$; Genética: $F_{1, 560} = 0,00002$, $P = 0,9965$; Edad: $F_{2, 560} = 0,000028$, $P > 0,9999$; Genética x Edad: $F_{2, 560} = 0,000017$, $P > 0,9999$; Genética x Tratamiento: $F_{1, 560} = 0,000000022$, $P = 0,9999$; Edad x Tratamiento: $F_{2, 560} = 0,000013$, $P > 0,9999$; Tratamiento x Genética x Edad: $F_{2, 560} = 0,00000012$, $P > 0,9999$) (Archivo Suplementario S2).

2.3.3. Nivel de ansiedad

Se detectaron diferencias en la proporción de abejas que exhibieron ansiedad entre tratamientos, stocks y edades de las abejas, con una triple interacción significativa entre los factores (Tratamiento: $F_{1,567} = 67,10$, $P < 0,001$; Genética: $F_{1,567} = 13,05$, $P < 0,001$; Edad: $F_{2,567} = 1,36$, $P = 0,258$; Genética x Edad: $F_{2,567} = 2,92$, $P = 0,055$; Genética x Tratamiento: $F_{1,567} = 1,15$, $P = 0,284$; Edad x Tratamiento: $F_{2,567} = 2,55$, $P = 0,079$; Tratamiento x Genética x Edad: $F_{2,567} = 4,26$, $P = 0,015$). Las comparaciones *post-hoc* revelaron que las abejas de ambos stocks mostraron niveles similares de ansiedad hacia el ácaro, pero una proporción significativamente mayor de abejas de 10 días de edad expresaron ansiedad en la población M en comparación con la población S (Figura 34). Además, el doble de la proporción de abejas M (media de 62% de las abejas en todas las edades) evidenció ansiedad cuando se aplicó el tratamiento control en comparación con las abejas S (media de 32% de las abejas en todas las edades) (Figura 34).

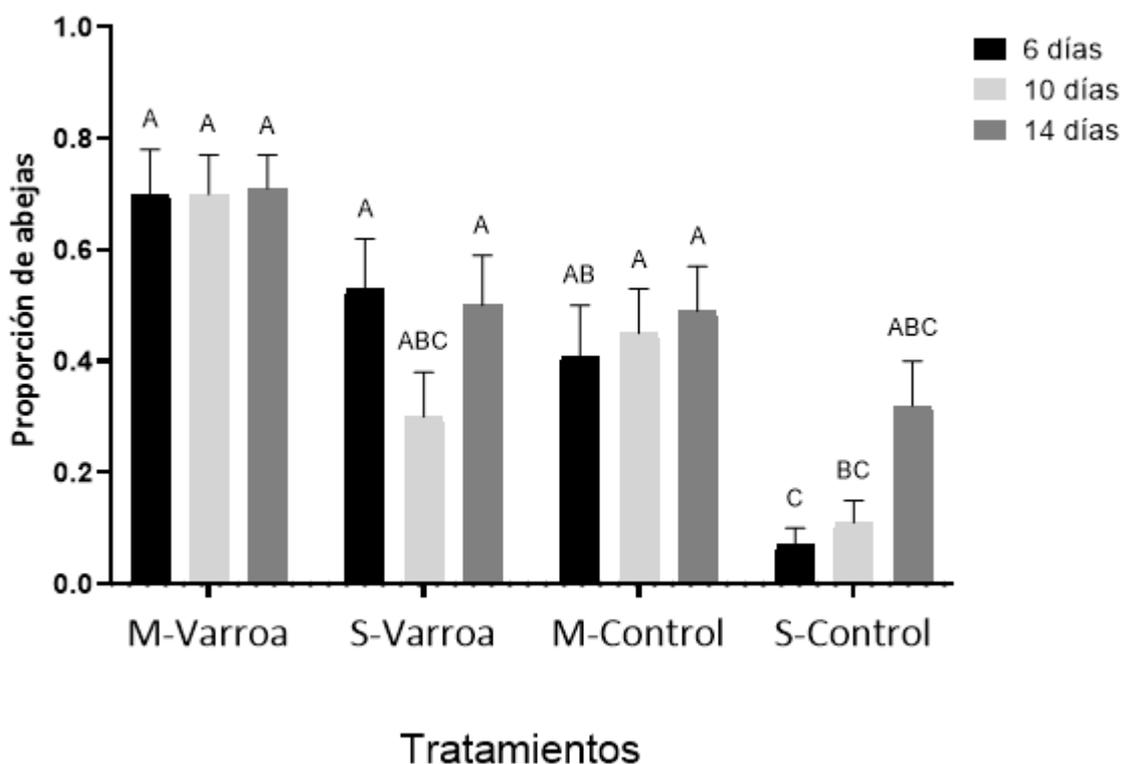


Figura 34. Proporción media (\pm SE) de abejas que expresaron ansiedad en respuesta al tratamiento con *V. destructor* (infestación con un ácaro) o al tratamiento control (toque de pincel). Se observan los datos obtenidos para abejas de diferentes edades de las colonias de *A. mellifera* resistentes (M) y susceptibles (S). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las edades de las abejas, los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

2.3.4. Comportamiento de rodar

Una mayor proporción de abejas del stock M (25 %) realizó el comportamiento de rodar frente a la infestación con el ácaro en comparación con las abejas del stock S (12 %), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 35). El comportamiento de rodar en las abejas sometidas al tratamiento control fue mínimo, lo que sugiere que esta reacción sería específica hacia el ácaro (Figura 35).

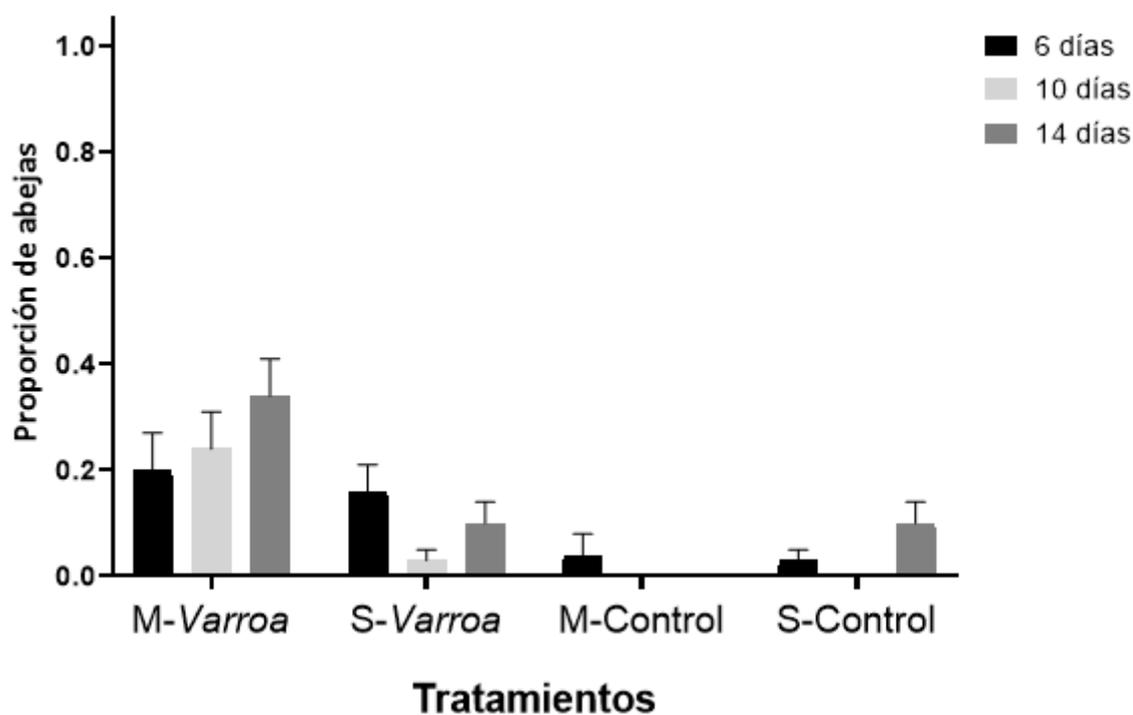


Figura 35. Proporción media (\pm SE) de abejas que mostraron un comportamiento de rodar en respuesta al tratamiento con *V. destructor* y tratamiento control (toque de pincel). Los valores se muestran para las abejas de origen S y M de *A. mellifera*, a diferentes edades.

2.3.5. Eficiencia del comportamiento de *grooming*

Una baja proporción de abejas fue capaz de quitarse el ácaro de su cuerpo durante los 3 minutos de observación. Específicamente 3 de 118 abejas M (2,5 %) eliminaron con éxito los ácaros colocados en sus cuerpos, mientras que ninguna de las abejas S (0 de 173 abejas) se pudo quitar el ácaro. Esta diferencia en la eficiencia del *grooming* entre stocks fue marginalmente significativa (Test Exacto de Fisher; $P=0,0657$).

2.3.6. Análisis de componentes principales

Para entender globalmente la respuesta de limpieza de las abejas hacia los ácaros, y poder compararla entre los stocks, se realizó un análisis de Componentes Principales (CP) considerando las variables que resultaron significativas en los análisis de GLMM. Los resultados indicaron que los dos primeros componentes explican el 77 % de la variabilidad total de los datos (CP1: 62 % y CP2: 15 %; Figura 36; Archivo Suplementario S3). El número de intentos de limpieza hacia el ácaro y el número de patas involucradas en esta actividad están asociados de manera negativa con el tiempo en que las abejas inician la respuesta de *grooming*, y estas tres variables mostraron una contribución significativa al primer componente (Figura 36). La ansiedad contribuye significativamente al CP2, se correlaciona negativamente con el tiempo en que se inicia la respuesta y positivamente con el número de intentos y el número de patas utilizadas contra el ácaro. Es decir, aquellas abejas que exhibieron bajos tiempos de reacción frente al tratamiento de infestación, también presentaron alta ansiedad y desplegaron mayores intentos para limpiar el ácaro (Figura 36). En cuanto a la diferenciación entre stocks, se evidenció una separación parcial en el espacio bidimensional (Figura 36). Las muestras correspondientes al stock M muestran la tendencia a distribuirse en valores más altos en ambos componentes y a formar un grupo relativamente homogéneo donde casi todas las abejas evidenciaron un CG intenso (Figura 36). Por el contrario, las muestras pertenecientes al stock S parecen organizarse en dos grupos, uno con abejas que exhibieron reacciones de limpieza "débiles" y un segundo grupo con abejas de respuesta más intensa a la infestación con el ácaro (Figura 36).

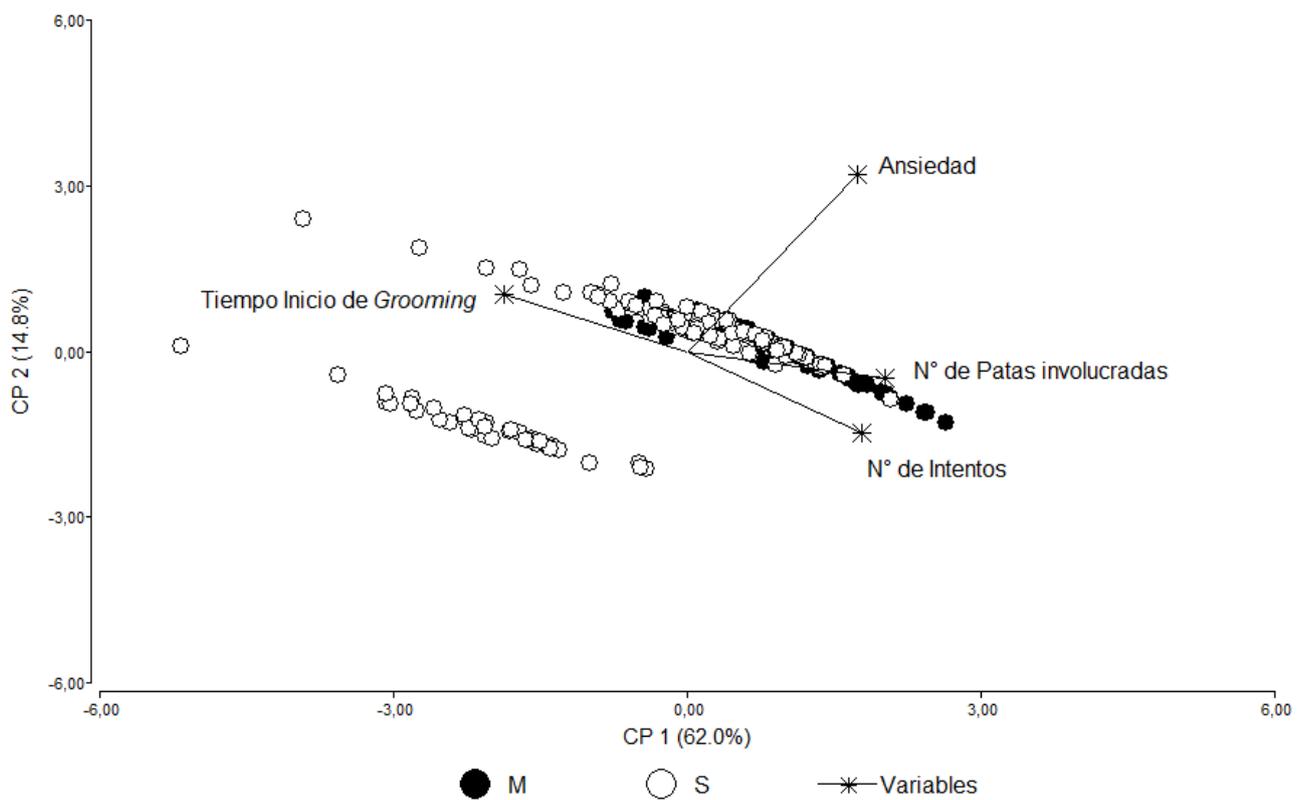


Figura 36. Análisis de componentes principales (CP) basados en las siguientes variables: tiempo de la primera respuesta, número de intentos, número de patas involucradas en el primer intento y nivel de ansiedad de las abejas frente a la infestación con el ácaro (tratamiento *V. destructor*). Estas variables se incluyeron en el análisis de CP en función de su significación estadística en los resultados de GLMM. Los datos se muestran para abejas de todas las edades de los stocks resistente (M, puntos negros) y susceptible (S, puntos blancos) de *A. mellifera*.

2.4. DISCUSIÓN

En el presente capítulo se caracterizaron, mediante estudios observacionales en arenas experimentales, diferentes reacciones asociadas al comportamiento de *grooming* (CG) hacia *V. destructor* en abejas obreras de *A. mellifera* de distintas edades y genéticas. Se documentaron diferencias en el tiempo de inicio y la intensidad de las reacciones de *grooming* entre las genéticas (susceptible y superviviente o resistente a *Varroa*) y las edades analizadas, y se observó una asociación entre las medidas del CG a nivel de colonia (p. ej., número de ácaros dañados) y la *performance* a nivel individual.

Varios autores han caracterizado las reacciones de *grooming* ejecutadas por abejas individuales al ser infestadas por *V. destructor*. En un estudio pionero, Aumeier (2001) identificó cinco reacciones ligadas al CG en abejas africanizadas y carniolas, y de forma similar, Invernizzi *et al.* (2016) registró su ocurrencia en abejas europeas y africanizadas. Cuando estos autores agruparon todos los comportamientos encontraron que, en general, las abejas africanizadas reaccionan más intensamente a *V. destructor* que las abejas europeas. En este capítulo, a pesar de que se compararon dos poblaciones de abejas melíferas de origen europeo, detectamos diferencias entre las poblaciones resistentes a *Varroa* (M) y las susceptibles (S) en algunas de las variables asociadas al CG y una respuesta general más intensa hacia el ácaro en las colonias M. Específicamente, las abejas resistentes (M) exhibieron un menor tiempo de respuesta de limpieza hacia el ácaro, utilizaron con mayor probabilidad todas sus patas durante el primer intento de limpieza y realizaron un mayor número de intentos durante todo el período de observación. Estos resultados sugieren la existencia de variabilidad genotípica en la respuesta de *grooming* de las abejas contra *V. destructor*, en forma consistente a estudios previos en los que se detectó variación entre líneas o stocks en el porcentaje de abejas que realizaron el CG y el tiempo de inicio de la respuesta (Aumeier, 2001; Vandame *et al.*, 2002). Además, se evidenció una asociación entre la respuesta de *grooming* a nivel individual y a nivel de colonia (descrita en el capítulo anterior), ya que las abejas de las colonias M, un genotipo de abejas con niveles más bajos de infestación y proporción más altas de ácaros dañados en sus colonias, fueron las que lograron desprender en mayor medida los ácaros durante los ensayos de laboratorio en comparación con las abejas del stock S. Esta evidencia está en línea con los resultados obtenidos previamente por Guzmán-Novoa *et al.* (2012) y Dadoum *et al.* (2020) y apoya la propuesta de que el porcentaje de ácaros dañados representa un adecuado indicador del CG a nivel de la colonia, tal como fue sugerido por estos y otros autores. Observamos que el 2,5% de las abejas M (3 de 118) se quitaron el ácaro del cuerpo durante el tiempo de observación, mientras que ninguna de las abejas S pudo eliminarlo con éxito. A pesar de ser bajo, el éxito de remoción de los ácaros observado en nuestro stock M (resistente) es similar al obtenido por Invernizzi *et al.* (2016), quienes encontraron 3 de 48

abejas (6,3%) que lograron quitarse el ácaro (2 abejas italianas y 1 africanizada). De manera similar, Guzmán-Novoa *et al.* (2012) encontraron un 29,4 % y 4,3 % de abejas “exitosas” en la remoción de *Varroa* de origen africanizado e italiano, respectivamente, mientras que Aumeier (2001), obtuvo porcentajes de 18,3 % y 9,1 % para abejas africanizadas y carniolas, respectivamente. Por el contrario, Dadoun *et al.* (2020) observaron que más del 60 % de las abejas de un stock resistente se quitaron el ácaro de sus cuerpos, siendo el valor más alto encontrado en estudios previos y recientes. Las diferencias en el éxito de remoción entre los distintos estudios podrían explicarse por diferencias en la metodología utilizada para evaluar la respuesta de *grooming* (placas de Petri vs. cuadros de observación), así como por la genética de las abejas melíferas estudiadas y su tendencia a realizar el CG, o el método de obtención de los ácaros. Kirrane *et al.* (2012) sugirieron que el éxito de *grooming* de las abejas contra *V. destructor* en ensayos de laboratorio en cajas de Petri, se vio afectado por la edad y el estado reproductivo de los ácaros. Específicamente, detectaron una mayor caída de hembras hijas en comparación con hembras fundadoras. En nuestro ensayo se usaron hembras fundadoras de *V. destructor* para infestar artificialmente a las abejas experimentales, por lo que esto podría estar explicando la baja proporción de ácaros removidos con éxito durante los 3 minutos de observación. Cabe destacar que durante la infestación artificial se colocó el ácaro en el tórax de la abeja experimental, lugar de difícil acceso para la remoción de los ácaros por parte de las abejas (Bak y Wilde, 2016). En este sentido, la ubicación del ácaro también pudo haber influido en la efectividad de su eliminación por parte de las abejas en este ensayo.

El desempeño general de las abejas resistentes (stock M) analizadas en esta Tesis se puede considerar como un “*grooming* intenso”, que consiste en movimientos vigorosos y sacudidas que involucran el uso de más de dos patas, como fue descrito previamente por Guzmán-Novoa *et al.* (2012) para abejas de genotipos resistentes a *V. destructor*. Observamos que las abejas resistentes se vuelven muy activas inmediatamente después de la colocación del ácaro sobre sus cuerpos e inician la respuesta de *grooming* en menos de 30 segundos, con un tiempo medio de respuesta sobre todas las edades de 26,16 segundos. Este comportamiento también se ha observado en poblaciones seleccionadas de abejas Tellian resistentes al ácaro (Dadoun *et al.*, 2020), lo que indica que la selección de colonias para la resistencia a *V. destructor* puede afectar el comportamiento individual de las abejas frente a la infestación.

Nuestros resultados aportan nueva información sobre las asociaciones entre las variables (reacciones) de *grooming* y qué tan informativa es cada una en la diferenciación entre líneas resistentes y susceptibles al ácaro. Observamos, mediante el análisis de componentes principales, que el tiempo hasta el inicio de la respuesta de *grooming* está negativamente asociado tanto con el número de patas involucradas en el primer intento como con el número total de intentos realizados contra el ácaro, y

que estas tres variables contribuyeron de forma significativa a la diferenciación de los stocks en los ensayos de laboratorio. Podemos especular que un mayor número de intentos contra *Varroa* y una mayor intensidad en dichos intentos aumentarían la probabilidad de eliminación del ácaro por parte de las abejas a nivel individual. Además, nuestras observaciones permitieron detectar a las abejas infestadas caminando dentro de la arena experimental con diferentes intensidades, alcanzando y tocando a sus compañeras. Este comportamiento se observó específicamente en aproximadamente el 50 % de las abejas resistentes y con frecuencias más bajas en las abejas susceptibles (18–20 %), y podría representar un estímulo para que las abejas compañeras ubicadas dentro de la arena experimental ayuden en el acicalamiento. Si estas observaciones indican un posible signo de *allo-grooming*, es algo que debe evaluarse en futuros estudios.

Consistentemente con los resultados descritos arriba, observamos que una mayor proporción de abejas del stock resistente (M) expresaron ansiedad y exhibieron un comportamiento de rodar en todas las edades evaluadas e independientemente del estímulo (control o infestación artificial). Estas observaciones a nivel individual están en línea con las descripciones previas del comportamiento en las colonias del stock M en el campo (capítulo 1) y sugieren que una colonia “*groomeadora*” estaría compuesta por abejas “*groomeadoras*” con alta capacidad de respuesta, no solo al ácaro sino también a otros estímulos. De todas maneras, esto debe evaluarse más a fondo analizando a nivel genético la capacidad de respuesta de las abejas *groomeadoras*, como se exploró previamente para el comportamiento higiénico (por ejemplo, Boutin *et al.*, 2015; Mondet *et al.*, 2015; Scannapieco *et al.*, 2017).

Además de la diferenciación entre los stocks para el CG a nivel individual, encontramos diferencias en algunas de las variables de *grooming* entre abejas de diferentes edades, específicamente para las abejas del stock M. Las abejas resistentes más jóvenes realizaron un mayor número de intentos y utilizaron una mayor proporción de patas en comparación con las abejas más viejas de este stock. Resultó evidente una disminución en la intensidad de la respuesta de *grooming* a través del rango de edad analizado, lo que sugiere que las abejas más jóvenes estarían más involucradas en las actividades de acicalamiento hacia el ácaro. Estos resultados están en línea con un estudio pionero que encontró que el 90% del CG contra *A. woodi* en *A. mellifera* fue realizado por abejas que tenían entre 5 y 15 días de edad (Pettis y Pankiw, 1998). Según estos autores, la edad y el genotipo de una obrera influyen significativamente en la tendencia a realizar el CG por parte de las abejas. Recientemente, Dadoun *et al.* (2020) analizaron en cajas de Petri la eficiencia de remoción de *V. destructor* en abejas resistentes y susceptibles de 4, 7, 15 y 21 días de edad. Encontraron que las obreras de todas las edades están involucradas en la respuesta frente a la infestación artificial, aunque el porcentaje más bajo de remoción se observó en las abejas de 21 días de edad en ambas poblaciones (resistente y susceptible).

A diferencia de estos autores, nosotros detectamos diferencias en la intensidad del *grooming* dependiendo de la edad específicamente en las abejas de las colonias resistentes. Nuestros resultados sugieren que una más estructurada división etaria de estas actividades entre las abejas M podría generar una mayor eficiencia en la respuesta de *grooming* a nivel de la colonia, tal como se ha evidenciado para el comportamiento higiénico (Scannapieco *et al.*, 2016). Al respecto, Moore y colaboradores (1995) observaron el comportamiento de *grooming* de una abeja obrera de *A. mellifera* (“Red 93”), y la describieron como una “acicaladora” social altamente especializada que realizó *grooming* casi exclusivamente durante las observaciones. Teniendo en cuenta estos resultados (Moore *et al.*, 1995) y nuestras observaciones, sería interesante evaluar nuestras abejas resistentes a lo largo de la vida para determinar si se vuelven especialistas en el acicalamiento o cambian su capacidad de respuesta hacia el ácaro a medida que se hacen mayores.

2.5. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten evidenciar que un *grooming* intenso es clave para maximizar la probabilidad de una eliminación exitosa de los ácaros por parte de las abejas resistentes (stock M) e identificar las reacciones de acicalamiento que contribuyen mayormente a la diferenciación entre los stocks aquí analizados. Los ensayos individuales demostraron ser útiles para determinar el fenotipo de *grooming* de las colonias de *A. mellifera* en un entorno controlado y a la vez más natural respecto a los experimentados en cajas de Petri previamente realizados. Sin embargo, su utilidad en la determinación del nivel de CG de las colonias en el marco de un programa de mejoramiento es discutible debido a la complejidad metodológica y el tiempo requerido. Consideramos que este tipo de ensayo puede ser útil para seleccionar abejas que exhiben fenotipos de acicalamiento contrastante (en tiempo real) y poder explorar las bases genéticas de estas diferencias. Si bien se han realizado avances mediante la identificación de algunos genes candidatos asociados al comportamiento de *grooming* (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2012; Hamiduzzaman *et al.*, 2017; Morfin *et al.*, 2020), consideramos fundamental avanzar en la caracterización genética específica de nuestros materiales y explorar si los genes que confieren una alta capacidad de respuesta de acicalamiento frente al ácaro son los mismos entre diferentes poblaciones resistentes. Esto representaría el primer paso para, además de explorar las vías moleculares asociadas a la expresión del CG, desarrollar marcadores específicos aplicables a la selección asistida por marcadores, y la obtención y mantenimiento de poblaciones de abejas melíferas locales resistentes al ácaro.

CAPÍTULO 3.

**Análisis de expresión de genes
candidatos asociados al comportamiento
de *grooming* en *Apis mellifera***

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. El comportamiento y los genes

Darwin en su obra “El origen del hombre” (1871) ya mencionaba que “los rasgos del temperamento de los animales pueden ser heredados”. Hoy en día sabemos que, en rasgos generales, el comportamiento de los animales posee un componente genético significativo. Dado que el comportamiento representa la integración de muchos de los sistemas corporales, un cambio a nivel genético puede tener efectos perceptibles en algún aspecto de la conducta animal y las diferencias genéticas entre las poblaciones pueden determinar comportamientos distintos en sus integrantes (Parra, 2011), determinando así su evolución (Krebs y Davies, 1996). Un cierto comportamiento puede ser caracterizado mediante el estudio de la variación genética natural, su naturaleza multigénica, el impacto de genes individuales sobre múltiples rasgos, la interacción entre genes, y la existencia de efectos sexo-específicos (Kendler y Greenspan, 2006). Además, el estudio de las bases genéticas de los comportamientos animales y su interacción con el ambiente permite comprender los procesos fisiológicos involucrados y su evolución (York, 2018).

Para conocer en mayor profundidad los despliegues conductuales de los organismos, se requiere de un trabajo integral, siendo el estudio del comportamiento y la identificación y análisis de la expresión de genes asociados, un aspecto clave. En efecto, se considera que cambios en la regulación génica subyacen la evolución de fenotipos animales novedosos (Stern, 2000; Carroll *et al.*, 2001; Davidson, 2001; Carroll, 2005). Particularmente entre los insectos, los modelos de regulación génica son más complejos en especies sociales respecto a los que están involucrados en la fisiología y el comportamiento de especies solitarias (Johnson y Linksvayer, 2010; Linksvayer, 2015; Warner *et al.*, 2019). Esta característica se manifiesta en una mayor complejidad de las conexiones funcionales entre genes, y una mayor división tanto espacial de la expresión génica (por ejemplo, patrones de expresión específicos de sexo, casta y tejido) como temporal (por ejemplo, patrones de expresión diferenciales a lo largo del tiempo de desarrollo, como el que subyace al polietismo) (Lemanski *et al.*, 2019; Kocher *et al.*, 2018). Así, las colonias de insectos sociales pueden responder a retos ecológicos de forma no lineal, mediante la expresión de genes que influyen en la fisiología específica de los tejidos de los órganos sensoriales y el procesamiento central en el cerebro (Lemanski *et al.*, 2019; Kocher *et al.*, 2018; ver Alaux *et al.*, 2009).

Numerosos estudios han mostrado que varios de los comportamientos sociales de las abejas melíferas están determinados genéticamente (comportamiento defensivo, comportamiento higiénico, comportamiento de *grooming*, etc.) y también poseen un importante componente ambiental (Frumhoff y Baker, 1988; Breed *et al.*, 1991; Pritchard, 2016, Leclercq *et al.*, 2017). Además, se ha descrito la existencia de variación genética entre poblaciones en el desempeño de tareas como la

recolección de agua, néctar y polen (Robinson y Page, 1989a; Oldroyd *et al.*, 1992a; Page *et al.*, 2000), la vigilancia (Robinson y Page, 1988), y la distancia de pecoreo (Oldroyd *et al.*, 1993), entre otras. La variación genética no es únicamente evidente entre diferentes poblaciones de abejas melíferas. El hecho de que la reina se aparee con múltiples zánganos posibilita la variación genética dentro de la colonia (es decir, las obreras pueden ser hermanas enteras o medio hermanas), pudiendo dar lugar a diferencias entre abejas de una misma colmena en el desempeño o participación en diferentes comportamientos (Jandt *et al.*, 2014). Page y Robison (1991) encontraron que las abejas que eran hermanas enteras se inclinaban a especializarse en tareas específicas, por ejemplo, algunas subfamilias se volvían colectoras de polen mientras que otras, de néctar.

Los primeros estudios de expresión génica en abejas melíferas sugirieron que las diferencias en la fisiología y el comportamiento serían factores importantes en la tolerancia o resistencia hacia *V. destructor* (Navajas *et al.*, 2008). Otros estudios señalaron además que la tolerancia del hospedador al ácaro puede caracterizarse por diferentes procesos metabólicos y de señalización nerviosa (Zhang *et al.*, 2010). En este sentido, las tecnologías de análisis de la expresión génica ofrecen un recurso integrado y completo para la exploración de las vías moleculares involucradas en la interacción entre *A. mellifera* y *V. destructor* (Robinson *et al.*, 2006).

3.1.2. Bases genéticas del comportamiento de *grooming*

El *grooming* es un comportamiento conservado entre diferentes especies animales, lo que apoya que tiene una base genética y es importante para la supervivencia (Sachs 1988; Zhukovskaya *et al.*, 2013). En roedores, se ha propuesto que genes asociados con los niveles basales de ansiedad o actividad y la coordinación motora modularían el comportamiento de *grooming* (CG) a través de múltiples mecanismos (Roth *et al.*, 2013). En *D. melanogaster*, los genes candidatos para el CG están involucrados con el desarrollo o función del sistema nervioso, así como con el desarrollo de tejidos, incluyendo patas y músculos (Yanagawa *et al.*, 2020).

Existen escasas referencias sobre las bases genéticas y moleculares del CG en abejas melíferas (ver Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2012). Se considera que la expresión de este rasgo está relacionada con la capacidad del individuo de percibir estímulos de su entorno (Zhukovskaya *et al.*, 2013). Los ácaros proporcionan estímulos mecánicos y quimiosensoriales, que son reconocidos por su hospedador y pueden estimular el inicio del CG por parte de la abeja afectada (Roode y Lefevre, 2012). Estudios precursores establecieron que la base genética del *grooming* es poligénica con diferentes grados de dominancia (Fuchs *et al.*, 1996; Villa y Rinderer, 2008) y abordaron el estudio de la heredabilidad del carácter, con resultados variables y poco concluyentes (Moretto *et al.*, 1993; Ehrhardt *et al.*, 2007; Stanimirovitz *et al.*, 2010; revisado en Alphen y Fernhout, 2020).

3.1.3. Genes candidatos para el comportamiento de *grooming* en *A. mellifera*

En un trabajo pionero publicado en el año 2012, Arechavaleta-Velasco y su grupo de trabajo propusieron, mediante el mapeo de loci de rasgo cuantitativo (QTL, del inglés *Quantitative Trait Loci*), 27 genes candidatos que mapean dentro de una región genómica que presentó una asociación significativa con el tiempo que le tomaba a las abejas de *A. mellifera* iniciar el CG. Entre éstos, los genes *atlastin*, *ataxin* y *neurexin-1 (Nrx1)* tienen funciones predichas asociadas al desarrollo neuronal y el comportamiento. Recientemente, Morfin *et al.* (2020) encontraron que la expresión de *Nrx1* fue significativamente mayor en colonias de abejas con alto *grooming* respecto a colonias control, y que además, el nivel de expresión de este gen se correlacionó positivamente con la proporción de ácaros dañados en las colonias. Por su parte, Hamiduzzaman *et al.* (2017) detectaron una correlación entre la expresión de *Nrx1* y la intensidad del CG, y propusieron también otros genes candidatos, tales como *poly(U)-binding-splicing factor half pint (pUf68)*, con funciones reguladoras en el control de la producción de diversas proteínas posiblemente asociadas con actividades físicas del insecto, de acuerdo a Bourgeois *et al.*, 2004), y *cytochrome P450 9e2 (CYP9Q3)*, involucrado en el metabolismo de xenobióticos; Nauen *et al.*, 2021). Otro gen potencialmente involucrado en el CG es el que codifica para el receptor de octopamina (*Oa1*), un neuromodulador involucrado en la percepción y memoria olfativa en la abeja melífera (Farooqui *et al.*, 2003), que fue propuesto como gen candidato para el comportamiento higiénico (Scannapieco *et al.*, 2017; ver Spivak *et al.*, 2003). Todos los antecedentes descritos apoyan la idea de que hay múltiples genes implicados en el CG y que su regulación podría tener efectos en la intensidad de limpieza de las abejas hacia el ácaro.

En el presente capítulo, presentaré los principales resultados sobre el análisis de expresión de genes candidatos para el CG descritos en la bibliografía. Analizaré la asociación de la expresión de cada gen con el fenotipo de *grooming* desplegado por las abejas de las colonias bajo estudio. Los ensayos permitirán comparar las posibles diferencias de expresión génica entre los dos stocks caracterizados en los capítulos previos (resistente, susceptible a *Varroa*) en distintos tejidos (cuerpo, cabeza). Discutiré las posibles vías metabólicas involucradas en la expresión de este comportamiento complejo y el uso potencial de estos genes como marcadores moleculares que asistan a la selección de colmenas con altos niveles de acicalamiento

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Materiales

Durante el ensayo de observación del *grooming* en arenas experimentales presentado en el capítulo 2, se retiró, al finalizar el tiempo de observación de 3 minutos, cada una de las abejas ensayadas. Estas fueron colocadas individualmente en tubos de 1,5 ml para su conservación en un ultrafreezer de -70 °C (Ultrafreezer RIGHI, modelo UF386-86LV) y su posterior análisis de expresión génica. Si bien los ensayos observaciones se realizaron en abejas de diferentes edades, en este capítulo sólo se analizaron las abejas más jóvenes (6 días) de ambas genéticas (M y S) sometidas a los dos tratamientos (infestación artificial con *Varroa* y estimulación con pincel) y seleccionadas al azar en cada grupo evaluado, dado que fueron las que mostraron comportamientos más contrastantes respecto a las abejas de mayor edad (ver Capítulo 2).

3.2.3. Métodos

3.2.3.1. Extracción de ARN y obtención de ADNc

El ARN total se aisló de abejas individuales de dos tejidos diferentes (cabeza y resto del cuerpo). La elección del tejido “cabeza” se basó en bibliografía previa (Le Conte *et al.*, 2011; Mondet *et al.*, 2015; Scannapieco *et al.*, 2017; Morfin *et al.*, 2020) ya que la mayoría de los estudios de expresión de genes candidatos asociados a la inmunidad social detectaron diferencias en cerebros y/o antenas de abejas. Nosotros planteamos analizar también otro tejido (que denominamos “cuerpo” en referencia al resto del cuerpo) para evaluar si la expresión de estos genes es tejido-específica. Brevemente, cada muestra se homogeneizó en 500 µL de Trizol® (*Thermo Fisher Scientific*) con un equipo *TissueLyser* y perlas de acero inoxidable de 7 mm (*Qiagen, Courtaboeuf, Francia*) (4 × 30 s a 30 Hz). Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 150 µL de cloroformo. Las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio que contenía 300 µl de isopropanol y 1 µl de glicógeno (20 mg/ml). Cada tubo se mezcló suavemente por inversión y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente para lograr la precipitación del ARN. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. De cada tubo, se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se agregó 400 µl de etanol frío al 70 %. Los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y luego, el etanol se descartó cuidadosamente. Este último paso se realizó dos veces para mejorar el lavado. Finalmente, se retiró el etanol y las muestras se dejaron secar en flujo laminar. Una vez secas, se resuspendieron en 20 µl de agua DEPC (*Invitrogen*), y se las incubó a temperatura ambiente en agitador durante 10 minutos.

La pureza y concentración del ARN extraído se midió utilizando un espectrofotómetro de volúmenes reducidos *NanoDrop* (*Thermo Scientific Nanodrop 1000*), y su integridad y calidad se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1% P/V) con formamida. Las muestras se almacenaron a -70 °C.

Posteriormente, se usó 1 µg de ARN total como molde para sintetizar el ADN copia (ADNc) usando la enzima *ImProm-II Reverse Transcriptase* (Promega) y oligonucleótidos con cola de poli-T (*Oligo Dt primers*, Promega), siguiendo el protocolo del fabricante.

3.2.3.2. Análisis de la expresión génica

3.2.3.2.1 Selección de genes candidatos

En base a una exhaustiva revisión bibliográfica se seleccionaron genes candidatos asociados al comportamiento de *grooming* para realizar el ensayo de expresión génica en nuestros materiales. Esta selección se realizó particularmente sobre los genes citados que tenían relación con la respuesta de las abejas frente a *Varroa*. Los genes candidatos seleccionados fueron aquellos que codifican para: una proteína de adhesión presináptica, *neurexin-1 (Nrx1)*, una enzima del complejo P450 denominada *cytochrome P450 9e2 (CYP9Q3)*, un regulador de la traducción, poli(U)-binding-splicing factor half pint (*pUf68*), una GTPasa denominada *atlastin (atl1)* (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2012; Hamiduzzamann *et al.*, 2017; Morfin *et al.*, 2020), y el receptor de la octopamina (*Oa1*) (Spivak *et al.*, 2003; Scannapieco *et al.*, 2017) (Cuadro 7).

3.2.3.2.2. Expresión diferencial de genes

Los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizaron en un ciclador *LightCycler 96* (Roche), utilizando el ADNc como templado y cebadores específicos para la amplificación de los genes candidatos y de referencia. Algunos de los cebadores se tomaron de bibliografía, mientras que otros se diseñaron usando *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) y se analizaron con *Oligo Analyzer* de IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Se probó la amplificación por qPCR de 3 pares de cebadores para cada gen. En función de los resultados de las curvas de *melting*, la eficiencia y el rango de amplificación, se seleccionó el mejor cebador para cada gen (Cuadro 7).

Cada reacción se realizó en un volumen final de 10 µL, que contenía 5 µL de *Fast Start Essential DNA Green Master* (Roche), 0,25 µL (50 mM) de cada cebador (*forward* y *reverse*), 4 µL de dH₂O y 0,5 µL de molde de ADNc. Los parámetros de ciclado fueron: 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 45 segundos, finalizando con una amplificación del producto y la

obtención de las curvas de *melting*. Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado (es decir, tres réplicas técnicas).

La expresión de los genes que codifican para el factor de elongación (*EF-1*) y la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa 2 (*GAPD2*) se utilizaron para normalizar la expresión de los genes candidatos (Cuadro 7). Estos genes se describieron previamente como genes de expresión estables en *A. mellifera* (Lourenço *et al.*, 2008 y Jeon *et al.*, 2020). De todas maneras, la estabilidad y la idoneidad de dichos genes de referencia en las muestras obtenidas se evaluaron con la herramienta *RefFinder* (Xie *et al.*, 2012).

Para analizar los perfiles de expresión de los genes candidatos, aplicamos el modelo NRQ, que consiste en convertir los valores del número de ciclos de cuantificación (Ct) en cantidades relativas normalizadas (en inglés: NRQ por *normalized relative quantities*), ajustando las diferencias en la eficiencia de la qPCR entre los amplicones (Pfaffl *et al.* 2001), y normalizando los datos usando múltiples genes de referencia (Hellemans *et al.*, 2007). Las cantidades relativas y los datos normalizados se obtuvieron siguiendo las fórmulas descritas en Hellemans *et al.*, (2007). Para cada gen candidato, se evaluaron las diferencias en log (NRQ) entre grupos (abejas susceptibles y resistentes al ácaro) y tratamientos (infestación artificial con *Varroa* y estimulación con pincel) con un modelo de mínimos cuadrados generalizados (GLS) con función *VarIdent*. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete R 'nlme' (Pinheiro *et al.*, 2013).

Cuadro 7. Cebadores específicos usados para la amplificación por qPCR de los genes candidatos asociados al comportamiento de *grooming* y los genes de referencia.

Nombre del Gen	N° de Acceso a GeneBank	Secuencia del cebador 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
<i>pUf68</i>	XM_393194.5	CCTCTCCACCTCCACAACAG CAGGACCAACCATGTTACGC	117	Diseñado en esta Tesis
<i>Nrx1</i>	FJ580046	ACGCCCACCACAGAGATGAC CCGATTATTAAGGCAGCGTTCT	137	Hamiduzzaman <i>et al.</i> (2017)
<i>CYP9Q3</i>	XM_006562300	GTTCCGGGAAAATGACTAC ACTCTCGACGCACATCCTG	296	Hamiduzzaman <i>et al.</i> (2012, 2017)
<i>at11</i>	XM_006557226.2	GCTATCGATCGGCACGAGAA ACAGGGTGTCTAAGTCCGA	188	Diseñado en esta Tesis
<i>Oa1</i>	AJ547798.1	GTTCATCCTCTGCTGGCTTC GCCTAGCCAAAACAGTACGC	103	Scannapieco <i>et al.</i> , 2017
<i>GAPD2</i>	GB14798	GATGCACCCATGTTTGTGTTG TTTGCAGAAGGTGCATCAAC	203	Thompson <i>et al.</i> (2007) Hamiduzzaman <i>et al.</i> (2012, 2017)
<i>EF-1</i>	NM_001014993	GGAGATGCTGCCATCGTTAT CAGCAGCGTCCTTGAAAGTT	154	Hinshaw <i>et al.</i> , 2021

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Extracción de ARN de muestras de *A. mellifera*

Se logró la extracción exitosa del ARN de *A. mellifera* de cada tejido, obteniendo concentraciones para la cabeza de entre 20,8 y 255,5 ng/ μ l y de entre 100,1 y 500,2 ng/ μ l para el resto del cuerpo. Las muestras de ARN obtenidas resultaron de la calidad adecuada para ser utilizadas en los análisis genéticos posteriores. Específicamente, los resultados de los índices de calidad y concentración del ARN extraído se muestran en el apéndice como S4. En total, se realizó la extracción de ARN de 46 obreras de *A. mellifera* que habían sido conservadas en -70 °C luego de las observaciones realizadas en el capítulo 2. Estas incluyeron muestras de abejas de 6 días de edad de colonias resistentes (M) y susceptibles (S), sometidas a los dos tratamientos (infestación con *Varroa* y toque de pincel).

3.3.1 Elección de cebadores para amplificación por qPCR

Antes de iniciar los ensayos de expresión sobre las abejas seleccionadas mediante el ensayo comportamental, se realizaron pruebas y ajustes técnicos para la elección del mejor par de cebadores para la amplificación de cada gen candidato mediante qPCR. Los resultados mostraron en general, adecuadas pendientes de amplificación y curvas de *melting* para los cebadores analizados, con algunas variaciones. Entre éstos, y considerando el rango de amplificación y la eficiencia, se seleccionó el mejor par de cebadores para cada gen. Las eficiencias de los pares de cebadores elegidos variaron entre 1,72 y 1,96 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valor de la eficiencia del par de cebadores elegidos para cada gen, calculado en base al algoritmo del programa *LinRegPCR*. Se muestra el rango de amplificación en Ct (número de ciclos).

Gen	<i>Nrx1</i>	<i>CYP9Q3</i>	<i>Oa1</i>	<i>pUf68</i>	<i>at11</i>	<i>EF-1</i>	<i>GAPD2</i>	
Eficiencia	1,840	1,826	1,889	1,894	1,797	1,964	1,716	
Rango de amplificación (Ct)	Cabeza	23,56-28,72	21,65-28,31	21,77-27,06	>37	>37	19,52-28,08	26,87-32,35
	Cuerpo	23,47-30,23	18,73-25,48	21,36-26,24	21,15-26,15	25,53-32,50	16,24-21,12	18,64-24,66

3.3.1 Análisis de expresión de genes

3.3.1.1 *Neurexin-1 (Nrx1)*

El análisis de expresión del gen *Nrx1* en cabeza reveló una interacción significativa entre los factores tratamiento (infestación con *Varroa* vs. control) y genética (M vs. S) (Tratamiento: $F_{1, 33} = 0,56$, $P=0,4585$; Genética: $F_{1, 33}=1,72$, $P=0,1988$; Genética x Tratamiento: $F_{1, 33}= 4,82$, $P=0,0353$). Analizando los contrastes, observamos que las abejas de colonias M expresaron mayores niveles del gen respecto de las susceptibles cuando fueron sometidas al tratamiento con *Varroa*. Asimismo, se detectaron diferencias significativas en el nivel de expresión del gen entre los tratamientos en las abejas del stock M; particularmente las abejas sometidas al tratamiento de infestación con el ácaro presentaron mayores niveles de expresión respecto a las sometidas al estímulo con el pincel (Figura 37). Cuando comparamos los tratamientos en las abejas de origen S, no detectamos diferencias significativas en la expresión de *Nrx1* (Figura 37).

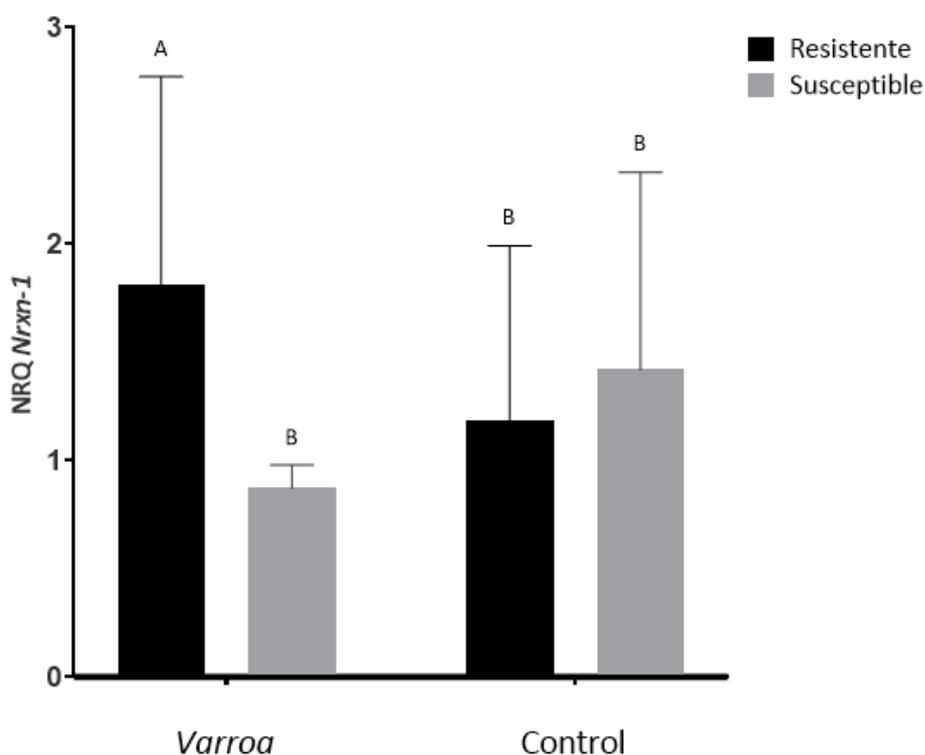


Figura 37. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infestación artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *neurexin-1* en cabezas de abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

El análisis de expresión del gen *Nrx1* en el cuerpo mostró diferencias significativas entre las abejas de los stocks resistente (M) y susceptible (S) para ambos tratamientos (Tratamiento: $F_{1,31} = 1,96$, $P = 0,1714$; Genética: $F_{1, 31} = 10,98$, $P = 0,0023$; Genética x Tratamiento: $F_{1, 31} = 0,65$, $P = 0,4261$). Específicamente, el nivel de expresión de este gen fue mayor en las abejas M respecto a las abejas del stock S, tanto para el tratamiento de infestación con el ácaro como para el control (Figura 38). No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos para las abejas de ninguno de los dos stocks, es decir que el nivel de expresión de *Nrx1* en el cuerpo de la abeja no varió frente a la aplicación de los estímulos (Figura 38).

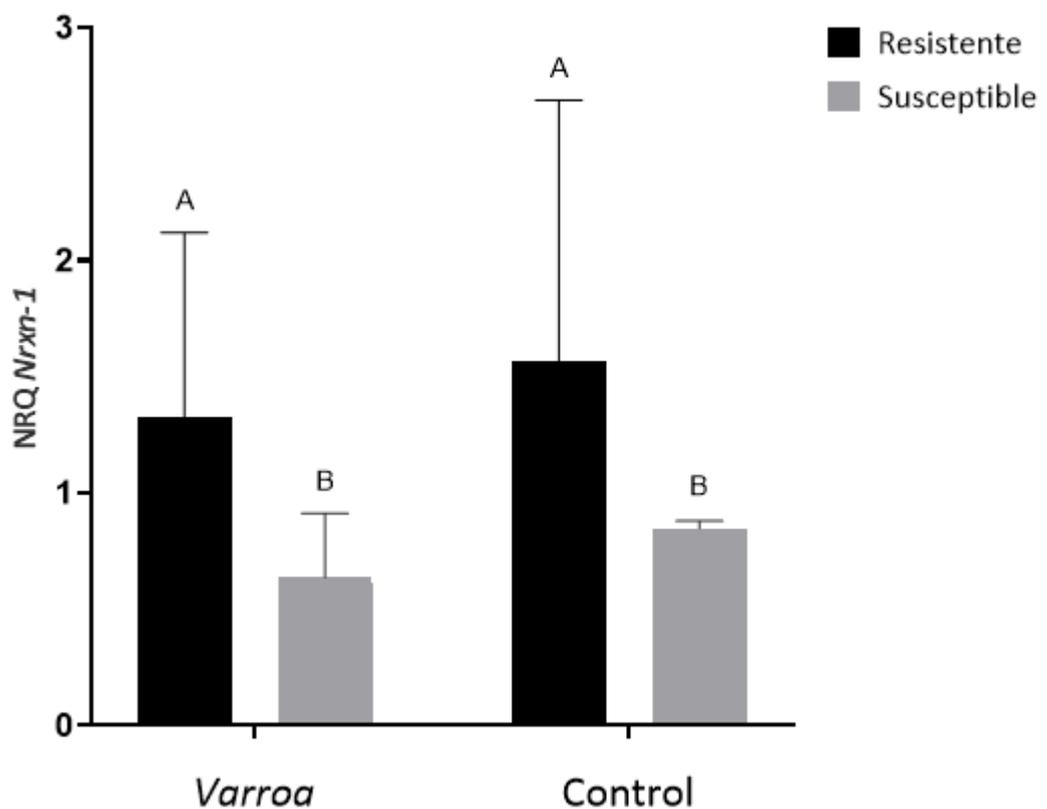


Figura 38. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *Nrx1* en el cuerpo de las abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

3.3.1.2. Cytochrome P450 9e2 (CYP9Q3)

El nivel de expresión del gen *CYP9Q3* en la cabeza de las abejas no difirió entre stocks ni entre tratamientos (Tratamiento: $F_{1,34} = 0,03$, $P = 0,8529$; Genética: $F_{1,34} = 1,182$, $P = 0,2847$; Genética x Tratamiento: $F_{1,34} = 1,27$, $P = 0,2670$; Figura 39). Las abejas del stock M parecen expresar mayores niveles del gen frente a la infestación con el ácaro respecto al tratamiento control, patrón no evidente para las abejas del stock S. De todas maneras, estas diferencias no resultaron significativas en el GLM. Al comparar los stocks, podemos observar una tendencia hacia una mayor expresión del gen en las abejas M respecto a las abejas S frente al tratamiento de *Varroa*, aunque nuevamente, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (Figura 39).

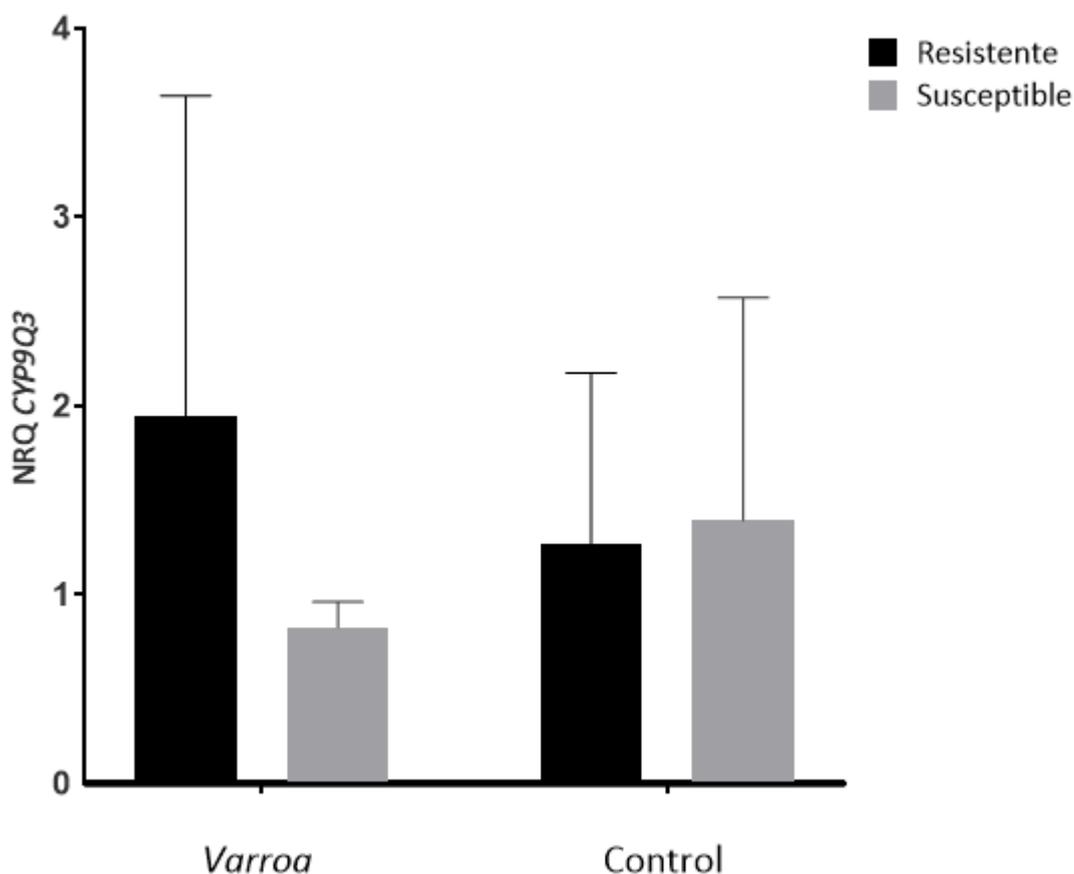


Figura 39. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infestación artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *CYP9Q3* en cabezas de abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión del gen *CYP9Q3* en el cuerpo de la abeja indicaron que existen diferencias significativas tanto entre los tratamientos como entre los stocks (Tratamiento: $F_{1, 32} = 8,29$, $P = 0,0071$; Genética: $F_{1, 32} = 4,16$, $P = 0,0497$; Genética x Tratamiento: $F_{1, 32} = 2,24$, $P = 0,1441$; Figura 40). Al comparar las genéticas, observamos que la expresión del gen fue mayor en abejas de origen S en relación con las de origen M solamente en el caso del tratamiento de infestación con el ácaro (Figura 40). El nivel de expresión del gen en las abejas del stock M fue similar frente a ambos tratamientos (Figura 40). Un patrón diferente se observó en las abejas del stock S, las cuales mostraron una mayor expresión del gen frente al tratamiento de infestación respecto al tratamiento control (Figura 40).

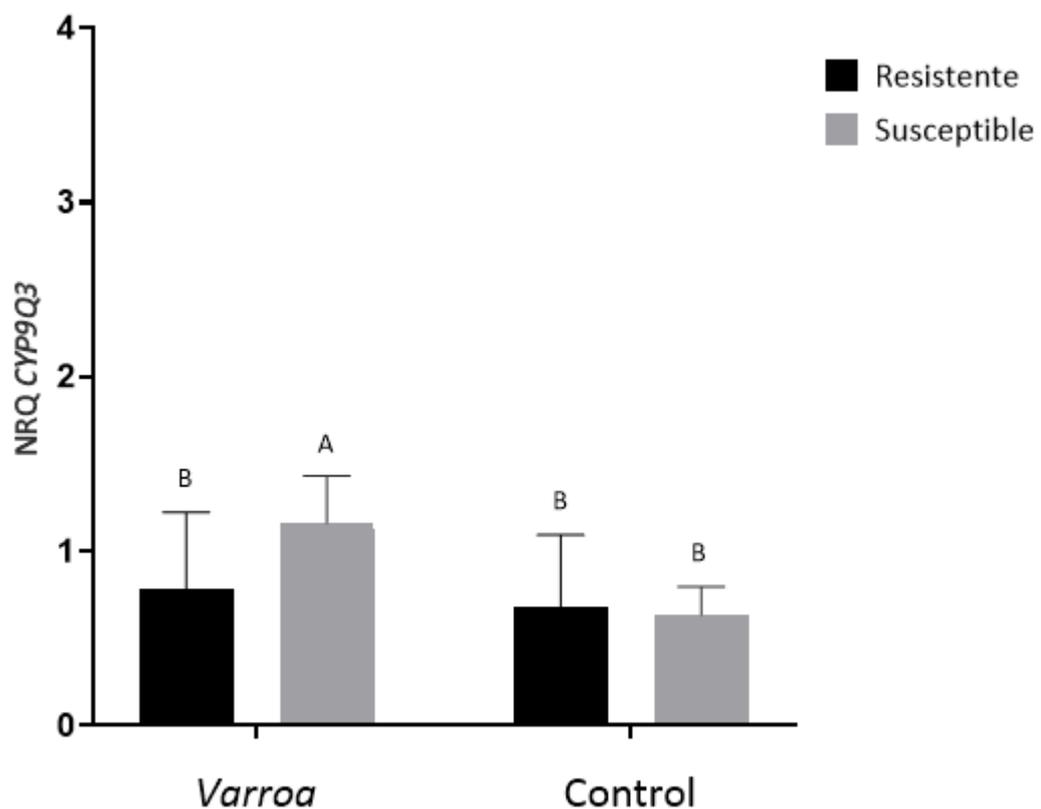


Figura 40. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *CYP9Q3* en el cuerpo de las abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

3.3. 1. 3 Octopamine receptor-1 (*Oa1*)

El análisis de la expresión del gen que codifica para el receptor de la octopamina (*Oa1*) en el tejido cabeza no evidenció diferencias significativas ni entre genéticas ni tratamientos (Tratamiento: $F_{1, 34} = 0,17$, $P = 0,6861$; Genética: $F_{1, 34} = 1,21$, $P = 0,791$; Genética x Tratamiento: $F_{1, 34} = 2,18$, $P = 0,1490$; Figura 41). Sin embargo, en términos descriptivos podemos ver que en respuesta al tratamiento con *Varroa*, las abejas de la genética M tienden a expresar un mayor nivel del gen en comparación con las abejas del stock S, patrón no evidente al considerar el tratamiento control (Figura 41). Asimismo, se puede observar que las abejas del stock resistente tienden a expresar mayores niveles de *Oa1* cuando son sometidas al tratamiento de infestación respecto al tratamiento control (Figura 41).

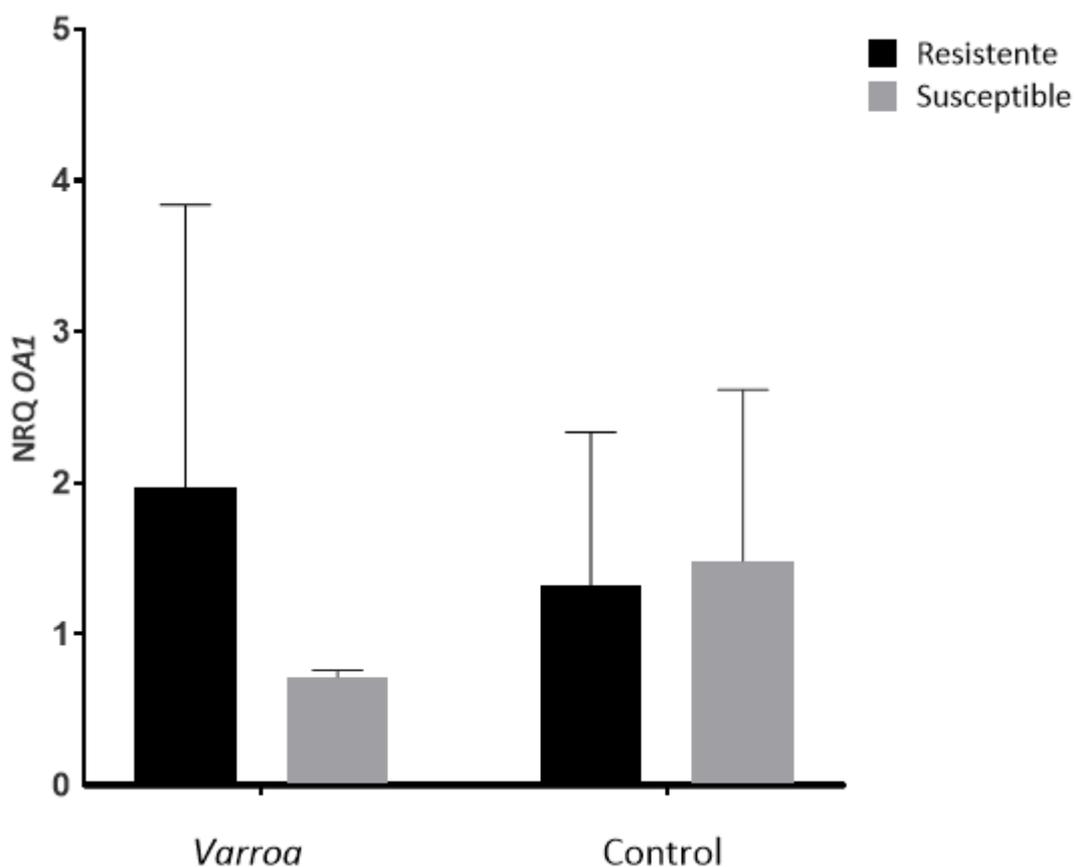


Figura 41. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infestación artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *Oa1* en cabezas de abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia.

Contrariamente a lo observado en cabeza, se detectaron diferencias significativas en la expresión del gen *Oa1* en el cuerpo de la abeja, tanto entre tratamientos como entre genéticas (Tratamiento: $F_{1,32} = 7,43$, $P = 0,0103$; Genética: $F_{1,32} = 7,05$, $P = 0,0122$; Genética x Tratamiento: $F_{1,32} = 1,81$, $P = 0,1877$; Figura 41). Específicamente, las abejas del stock M mostraron un mayor nivel de expresión del gen frente al tratamiento con *Varroa* respecto a las abejas del stock S (Figura 42). En cambio, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de *Oa1* entre las genéticas frente al tratamiento control (Figura 42). Al comparar la respuesta de las abejas frente a los tratamientos, observamos que únicamente para las abejas del stock S, hay diferencias en el nivel de expresión del gen, mostrando una sub-expresión frente a la infestación respecto al tratamiento control (Figura 42).

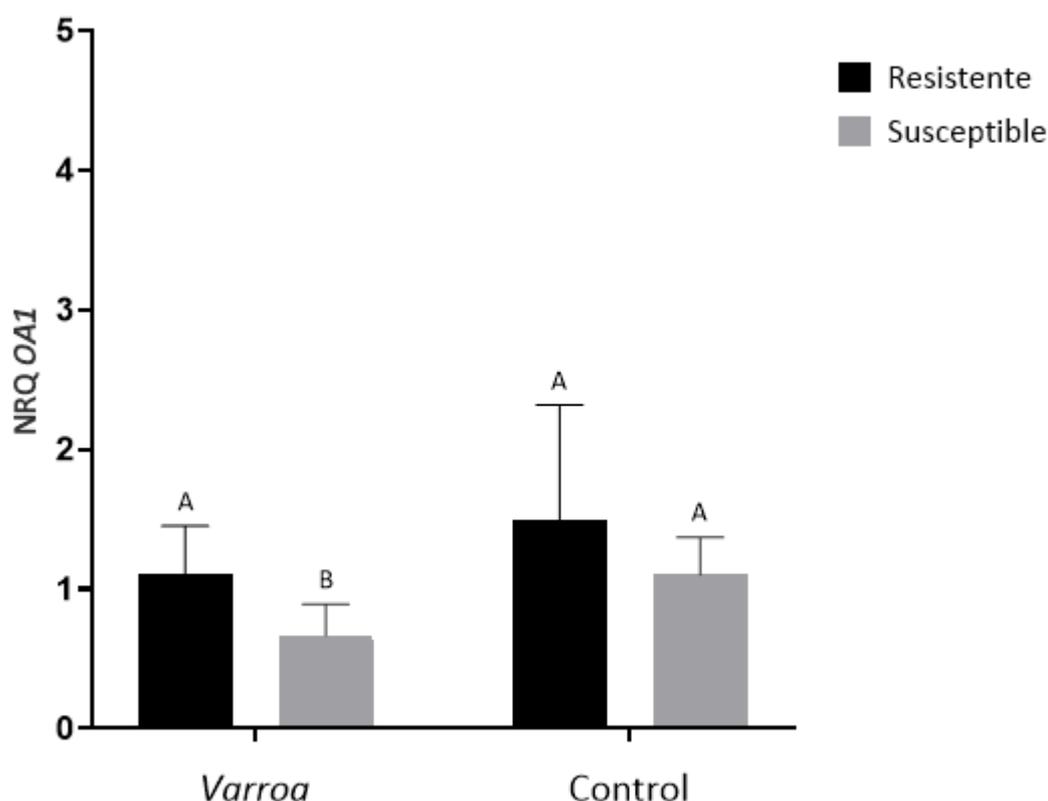


Figura 42. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *Oa1* en el cuerpo de la abeja. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

3.3.2.4. Poli (U)-binding-splicing factor half pint (*pUf68*)

En los ensayos de qPCR realizados utilizando como templado ADNc obtenido de cabeza de abejas y cebadores obtenidos de bibliografía (Hamiduzzaman *et al.*, 2017), no se logró la amplificación positiva del gen *pUf68*, presentando las muestras analizadas valores de Ct superiores a 37. En relación al análisis de expresión de este gen en el resto del cuerpo, se detectó una interacción significativa entre los factores genética y tratamiento (Tratamiento: $F_{1,35} = 14,72$, $P=0,0005$; Genética: $F_{1,35} = 6,50$, $P = 0,0153$; Genética x Tratamiento: $F_{1,35} = 6,34$, $P = 0,0166$; Figura 43). Al comparar las genéticas, podemos observar que las abejas de las colonias M expresaron mayores niveles de expresión del gen respecto a las abejas de las colonias S, solo frente al tratamiento *Varroa* (Figura 43). Al considerar la comparación entre tratamientos, detectamos que las abejas de las colonias M expresaron similares niveles de este gen frente a ambos estímulos (Figura 43). Contrariamente, se detectaron diferencias significativas en los niveles del gen entre tratamientos para las abejas S (Figura 43). Específicamente, las abejas de dicho stock mostraron una sub-expresión del gen frente a la infestación con el ácaro en comparación al tratamiento control (Figura 43).

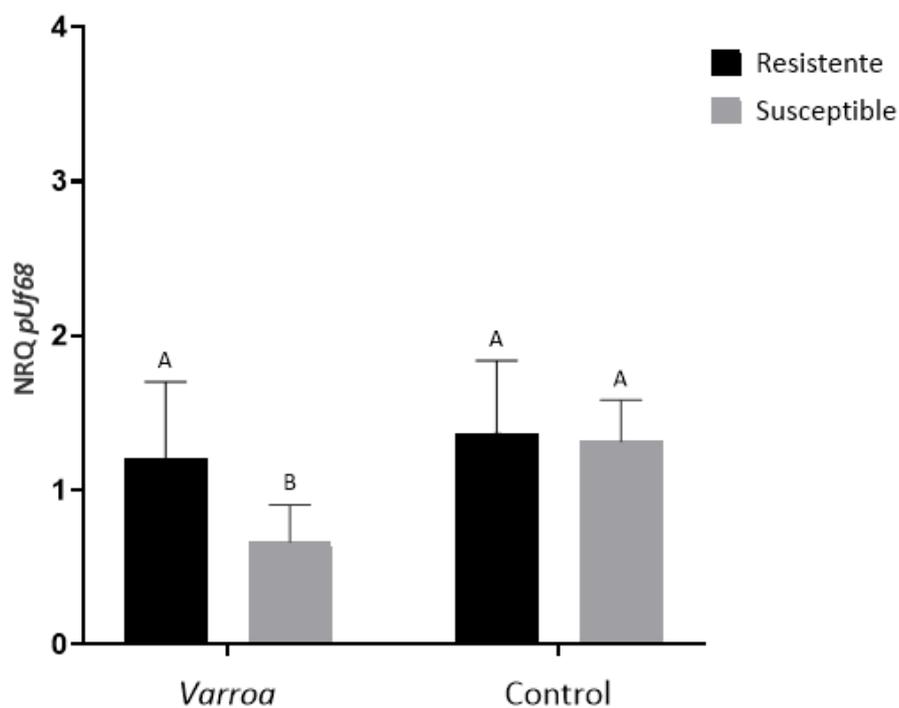


Figura 43. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *pUf68* en el cuerpo de las abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

3.3.2.5. *Atlastin (at1)*

Al igual que lo obtenido para el gen *pUf68*, no se logró amplificación para el gen *at1* para las muestras de ADNc obtenidas del tejido cabeza, con valores de Ct superiores a 37. En el caso de las muestras de cuerpo, se logró una correcta amplificación del fragmento, resultados que se sometieron a análisis descriptivos y estadísticos. Detectamos una interacción significativa entre los factores de variación, genética y tratamiento (Tratamiento: $F_{1, 23} = 6,27$, $P = 0,0198$; Genética: $F_{1, 23} = 0,75$, $P = 0,3958$; Genética x Tratamiento: $F_{1, 35} = 7,14$, $P = 0,0136$; Figura 44). Al considerar la comparación entre stocks, no se detectaron diferencias significativas entre M y S frente al tratamiento de infestación con *Varroa*, aunque sí se observó que las abejas M muestran mayor nivel de expresión del gen *Puf68* que las abejas S frente al tratamiento control. Por otro lado, las abejas de las colonias M presentaron un patrón de expresión similar del gen frente a ambos tratamientos (Figura 44). Contrariamente, las abejas del stock S exhibieron un mayor nivel de expresión al ser sometidas al tratamiento de infestación con el ácaro en comparación con el tratamiento control (Figura 44).

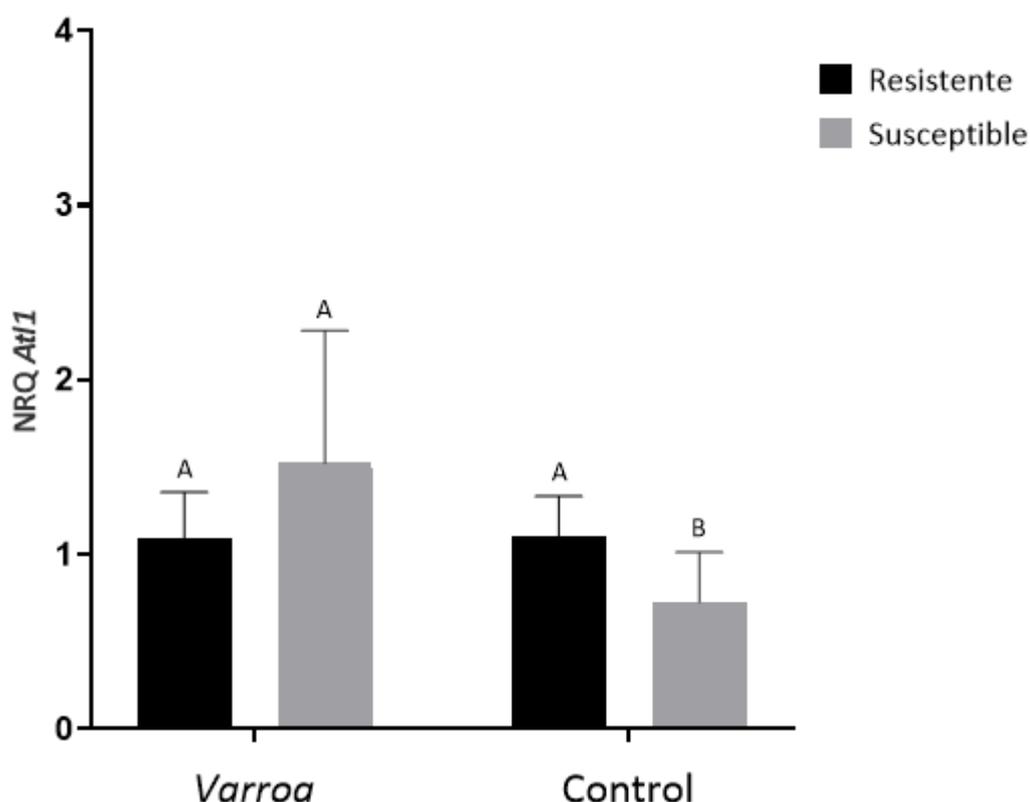


Figura 44. Perfiles de expresión obtenidos por qPCR en abejas de *A. mellifera* de los stocks M (resistente) y S (susceptible al ácaro) expuestas a los dos tratamientos (infección artificial con *Varroa* y control). Se muestra el nivel de expresión génica relativa (NRQ) del gen *at1* en el cuerpo de las abejas. Se utilizaron *GAPD2* y *EF-1* como genes de referencia. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los stocks y los tratamientos con Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

3.4. DISCUSIÓN

En este capítulo analizamos los perfiles de expresión de cinco genes candidatos (*Nrx1*, *CYP9Q3*, *Oa1*, *pUf68* y *at11*) previamente descritos como asociados al comportamiento de acicalamiento y/o higiénico en *A. mellifera*, comparando abejas de los stocks M y S evaluadas a nivel fenotípico en el Capítulo 2. En líneas generales, detectamos diferencias en los niveles de expresión de algunos de los genes analizados entre stocks (M/S) y también entre tratamientos (pincel/ácaro), lo que sugiere que éstos podrían explicar parte de las diferencias observadas en la intensidad del comportamiento de *grooming* (CG) a nivel individual, y que su expresión estaría influenciada por el tipo de estímulo que la abeja percibe para iniciar el acicalamiento.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión del gen *neurexin-1* evidencian diferencias significativas entre los stocks comparados, apoyando el rol que tendría este gen en la transmisión neuronal asociada a la estimulación del CG en *A. mellifera*. En particular, detectamos que las abejas del stock resistente, sometidas a la infestación con *V. destructor*, expresan mayores niveles de este gen respecto a las abejas del stock susceptible, tanto a nivel de la cabeza como a nivel del cuerpo. Las abejas resistentes (que presentan un CG intenso) tendrían una mayor sensibilidad frente al ácaro (por ejemplo, mediante un rápido reconocimiento sensorial del mismo), que podría resultar en una expresión aumentada de genes como el de *neurexin-1*, la cual sugiere la presencia de consolidación sináptica (Biswas *et al.*, 2008; 2010; Ramírez *et al.*, 2016; Grosso *et al.*, 2018). Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos previamente por Hamiduzzaman *et al.* (2017), quienes trabajando con colmenas de alto CG, observaron mayores niveles de expresión del gen *neurexin-1* en abejas que desplegaban un acicalamiento “intenso” respecto a abejas de acicalamiento “débil” frente a *V. destructor*. Por su parte, y en línea con los presentes resultados, Morfin *et al.* (2020), detectaron una mayor expresión del gen en *pooles* de cabezas de abejas de colonias seleccionadas (población de abejas seleccionadas por su alta tasa de ácaros dañados debido al comportamiento “mordedor” asociado al *grooming*; conocida como “Indiana mite-biter”) respecto de abejas de colonias susceptibles. En conjunto, todas estas evidencias sugieren el rol clave de este gen en la modulación del CG, aún en distintos stocks con historias de selección y *background* genéticos diferentes. En este sentido, nuestros resultados aportan una evidencia más para considerar este gen como un marcador molecular promisorio a ser usado en sistemas de selección asistida por marcadores para la obtención de stocks de *A. mellifera* resistentes a *V. destructor*. Al respecto, recientemente Morfin *et al.* (2020) encontraron una correlación positiva entre la expresión de *Nrx1* y la proporción de ácaros dañados recolectados en los pisos de las colmenas, aunque no detectaron la misma relación al considerar el crecimiento poblacional de *V. destructor* dentro de la colonia.

Además de las diferencias observadas en el patrón de expresión del gen *neurexin-1* entre los stocks, observamos que, específicamente en la cabeza de las abejas M, la infestación con el ácaro indujo una mayor expresión del gen respecto al tratamiento control. Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de este gen sería estímulo-específica, particularmente en el caso de las abejas del stock resistente. Es decir, las abejas del stock que exhibe un intenso CG podrían ser capaces de discriminar, a nivel de la cabeza, el estímulo causado por el ácaro con una alta especificidad y así desencadenar una respuesta comportamental diferencial frente a éste respecto a otro estímulo, como puede ser restos de polen o polvo. Además, nuestras evidencias son consistentes con las observaciones de Morfin *et al.* (2020) quienes detectaron que *Nrx1* presenta un nivel de expresión basal bajo y solo se expresa durante la sinapsis en el sistema nervioso. En efecto, Biswas *et al.* (2010) informó que la expresión de este gen, y su contraparte la neurologina (*NGL*), está afectada por la experiencia sensorial de las abejas, la que puede jugar un rol en el desarrollo de las conexiones sinápticas e influenciar, de esta manera, el aprendizaje y la expresión de caracteres comportamentales en esta especie. Las neurexinas son proteínas de membrana pre-sináptica que se unen a las neurologinas (proteínas post-sinápticas) para formar complejos neurexina/neurologina dependientes de Ca^{2+} que participan en la formación o establecimiento de la sinapsis (Servián Morilla, 2012). Este complejo es necesario para una neurotransmisión eficaz y participa en la formación de contactos sinápticos (Cortés *et al.*, 2022). Las neurexinas están codificadas por tres genes en mamíferos (*Nrx1*, 2 y 3), con dos promotores alternativos que dan lugar a las isoformas largas (α -neurexinas) o las isoformas cortas (β -neurexinas) (Ushkaryov *et al.*, 1992; Missler *et al.*, 1998). En invertebrados, se ha descrito que el gen que codifica para *Nrx1* también tiene funciones neuronales, aunque se desconoce aún la existencia de isoformas en este caso (Cortés *et al.*, 2022). Estas proteínas están relacionadas con el autismo y la esquizofrenia en humanos (Lowther *et al.*, 2017; Tromp *et al.*, 2021), con el aprendizaje por asociación en *Drosophila* (Zeng *et al.*, 2007) y con el CG en ratones (Grayton *et al.*, 2013). Por ejemplo, en ratones *knockout* para *Nrx1- α* se incrementa el comportamiento de auto-*grooming* en comparación con ratones control (Etherton *et al.*, 2009). En función de esta información previa y de nuestros resultados, podemos concluir que el gen *neurexin-1* tendría un rol importante en el despliegue de limpieza de la abeja, y que la regulación de su expresión podría ser uno de los aspectos de diferenciación entre las abejas de los stocks analizados, más aún considerando que las abejas de *grooming* intenso (M) presentan mayores niveles de expresión del gen (en cuerpo) frente a ambos tratamientos en comparación con las abejas de *grooming* débil (S). Desconocemos si la selección sobre el CG a nivel de la colonia pudo haber impactado en el nivel de reactividad de las abejas (específicamente hacia el ácaro), por ejemplo, a través de un cambio en los niveles basales o inducibles de este gen. Próximos estudios que aborden la caracterización funcional de *neurexin-1*, por ejemplo,

a través de ensayos de silenciamiento génico, así como eco-químicos y fisiológicos que permitan entender más acerca de los estímulos involucrados en la regulación de su expresión, son necesarios para profundizar sobre las vías moleculares y bases fisiológicas asociadas al CG.

Las abejas melíferas, al igual que otros insectos, poseen genes que codifican para moléculas involucradas en las vías metabólicas de detoxificación, como los del complejo enzimático citocromo p450 (Mao *et al.*, 2011). En particular, la subfamilia *CYP9Q* está altamente expresada en los túbulos de Malpighi, el ventrículo y el cerebro de la abeja melífera, lo que coincide con el hecho de que en estos tejidos es donde normalmente tendría lugar la detoxificación de xenobióticos (Manjon *et al.*, 2018; Vannette *et al.*, 2015). En particular, el gen *CYP9Q3*, ha mostrado patrones de expresión alterados cuando las abejas están expuestas a diferentes tipos de sustancias químicas o estrés nutricional (Mao *et al.*, 2011; Macri *et al.*, 2021), o cuando realizan actividades de limpieza como el comportamiento higiénico (Boutin *et al.*, 2015). En este capítulo, analizamos los patrones de expresión de este gen en abejas de 6 días de edad, de ambos stocks y sometidas a los estímulos de limpieza mencionados. Nuestros resultados indican una tendencia hacia una mayor expresión del gen en cabezas de abejas M respecto a las de abejas S frente al tratamiento de infestación artificial, aunque dichas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas (probablemente por la gran variación entre las muestras). Evidencias similares fueron reportadas por Jiang *et al.* (2016), quienes detectaron mayores niveles de expresión de *CYP9Q3* en abejas adultas de colonias tolerantes a *V. destructor* respecto a colonias susceptibles al ácaro, y por Hamiduzzaman *et al.* (2017) quienes encontraron el mismo patrón al comparar abejas de CG intenso respecto a abejas control.

Al analizar la expresión de *CYP9Q3* en el cuerpo de las abejas, detectamos un patrón contrario al evidenciado en la cabeza, con una sobreexpresión significativa del gen en las abejas del stock S respecto a las de la población M, también frente al tratamiento con *Varroa*. Es más, las abejas S mostraron una expresión génica aumentada frente a la infestación con el ácaro respecto al tratamiento control. Boutin *et al.* (2015) encontraron que los genes de la citocromo p450 estaban sobreexpresados en abejas no higiénicas en comparación con abejas higiénicas, y propusieron que los productos de estos genes podrían degradar las feromonas y señales químicas asociadas a la presencia de cría enferma, haciendo que estas abejas sean menos eficientes en su detección. Es posible que la expresión del gen *CYP9Q3* esté influenciada por señales químicas producidas por la presencia del ácaro sobre el cuerpo de la abeja, ya que éste puede proporcionar tanto estímulos mecánicos como quimiosensoriales (Zhukovskaya *et al.*, 2013; ver Hamiduzzaman *et al.*, 2017). En este sentido, estudios previos han mostrado que la parasitación con el ácaro puede inducir cambios en los perfiles químicos cuticulares de las abejas (Salvy *et al.*, 2001; Annoscia *et al.*, 2012; McDonnell *et al.*, 2013) y que éstos pueden ser censados por las abejas guardianas para detectar pecoreadoras foráneas que se

encuentran parasitadas (Cappa *et al.*, 2016). De todas maneras, es necesario avanzar en el estudio del tipo de estímulo y las vías involucradas en su percepción para entender un poco más acerca de posibles disparadores del CG frente al ácaro y su efecto a nivel comportamental.

El gen que codifica para el receptor de la octopamina (*octopamine receptor; Oa1*) se expresa abundantemente en células del cerebro de las abejas melíferas, incluyendo los denominados *mushroom bodies (copora pedunculata)* y el sistema nervioso central, estructuras cerebrales que se proponen como involucradas en la locomoción de los insectos (Martin *et al.*, 1998; Strauss y Heisenberg, 1993). La activación de este receptor conduce a oscilaciones en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Grohmann *et al.*, 2003) y está asociado al procesamiento de estímulos sensoriales, respuestas motoras antenales y funciones cerebrales de orden superior (Hammer 1993,1997; Hammer y Menzel 1998; Menzel *et al.*, 1999). En este capítulo evaluamos el perfil de expresión de este gen en abejas de alto y bajo CG, tanto a nivel de la cabeza como del resto del cuerpo. Observamos que el nivel de expresión de *Oa1* resultó mayor en las abejas del stock resistente respecto a las abejas del stock susceptible cuando fueron sometidas al tratamiento de infestación con el ácaro, con diferencias estadísticamente significativas a nivel del cuerpo. Estos resultados apoyan la evidencia de que la octopamina puede tener efectos no solo a nivel del cerebro y el ganglio torácico (Linn *et al.*, 1994) sino también a nivel de la periferia, actuando en las uniones neuromusculares (Kutsukake *et al.*, 2000; Nagaya *et al.*, 2002). Además, son consistentes con estudios pioneros en *A. mellifera* que demostraron que cambios en los niveles de esta proteína se correlaciona con modificaciones en el comportamiento y tareas que realizan las obreras dentro de la colmena y también fuera de ella (Bozic y Woodring, 1998; Harris y Woodring, 1992; Schulz y Robinson, 1999; Wagener-Hulme *et al.*, 1999; ver Giray *et al.*, 2007), apoyando su rol clave en la modulación de comportamientos complejos y rítmicos, tal como los de inmunidad social. Como ocurre con el comportamiento higiénico, la expresión de *Oa1* estaría modulada por los estímulos que experimenta la abeja, por ejemplo, cuando es parasitada por un ácaro. En este sentido, tanto las abejas altamente higiénicas (Scannapieco *et al.*, 2017) como las que exhiben intenso CG (presentes resultados), serían capaces de responder al estímulo experimentado (frente a la cría enferma o a un ácaro sobre el cuerpo) induciendo mayores niveles de octopamina y de su receptor, y generando así una respuesta comportamental de limpieza. Dado que evidencias previas sostienen que la octopamina tiene un rol clave en la modulación de la información sensorial, y afecta tanto la percepción olfativa como mecanosensorial (Erber y Kloppenburg, 1995; Kutsukake *et al.*, 2000; Scheiner *et al.*, 2002; Widmer *et al.*, 2005), queda pendiente entender cuáles son los estímulos (mecánicos, sensoriales) que genera el ácaro y que son censados por las abejas, y así explorar las vías involucradas en desencadenar esta respuesta comportamental. Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación de inyecciones con octopamina u otras aminas biogénicas tiene efectos

en los niveles de agresión (Robinson *et al.*, 1999; ver Roeder *et al.*, 2003 y Acevedo-González *et al.*, 2022) o el CG en abejas melíferas (Fussnecker *et al.*, 2006). Estos últimos autores, detectaron que abejas inyectadas con diferentes dosis de octopamina aumentaron el tiempo dedicado al acicalamiento en detrimento de otras actividades motoras (como volar, permanecer en reposo). Para explorar más profundamente el impacto de la expresión del gen *Oa1* y su posible función, se podrían realizar ensayos similares a los presentados en los capítulos 2 y 3, incorporando inyecciones con distintas dosis de octopamina y evaluando su efecto en el CG de las abejas M y S hacia el ácaro.

El gen *poli (U)-binding-splicing factor (pUf68)* también conocido como *half-pint* desempeña importantes funciones reguladoras en el control de la síntesis de proteínas complejas (Bourgeois *et al.*, 2004). Este gen es conocido por su papel en el empalme de pre-ARNm y la proliferación de células madre (Wang *et al.*, 2013), y se lo propuso como un gen asociado con la inmunidad, la detoxificación y la longevidad (Tarek *et al.*, 2018). En este trabajo encontramos que el nivel de *pUf68* difiere entre abejas resistentes y susceptibles cuando son expuestas al tratamiento de infestación artificial con el ácaro. Particularmente, pudimos observar que el nivel de este gen disminuyó en las abejas susceptibles respecto a las abejas resistentes en presencia del ácaro, sugiriendo que su expresión podría verse afectada por la actividad de acicalamiento. Resultados similares fueron obtenidos por Hamiduzzaman *et al.* (2017), quienes encontraron que la expresión de *pUf68* aumentó significativamente en las abejas con *grooming* intenso y débil en relación con las abejas sin *grooming* y control. Si bien poco se sabe sobre la función o la expresión de *pUf68* en *A. mellifera*, estos autores propusieron que la actividad física, como la involucrada durante el CG, podría tener un impacto en el *splicing* de *pUf68* y en la proliferación del transcrito en las células a través del sistema nervioso periférico (Hamiduzzaman *et al.*, 2017). En este sentido, es posible que la alta actividad física de las abejas *groomeadoras* conduzca a cambios fisiológicos que resultan en una mayor expresión de *pUf68*. También es posible que la expresión de este gen, junto con la activación de neuromoduladores, desencadenen una respuesta de mayor actividad física a través de mecanismos neuromotores estimulados por la presencia del ácaro sobre el cuerpo de la abeja. Se sabe que los comportamientos rítmicos como volar, caminar o acicalarse son controlados por circuitos neuromotores centrales (revisado en Marder y Bucher, 2001; Marder *et al.*, 2005; Katz, 2016). Los patrones básicos de estos movimientos repetitivos estereotipados están frecuentemente generados en el ganglio torácico, sin embargo, el ritmo puede ser modulado por retroalimentación sensorial en respuesta a nuevos estímulos recibidos (Büschges, 2005; Marder *et al.*, 2005; Ridgel y Ritzmann, 2005). Nuestros resultados suman evidencia a la relación entre la abundancia de ARNm de *pUf68* y el CG, que permitirán seguir explorando las rutas metabólicas involucradas en este comportamiento en *A. mellifera*.

Al comparar los tratamientos (control vs. *Varroa*), el nivel de *pUf68* fue menor en las abejas sometidas a la infestación artificial respecto a las que recibieron el estímulo control solo en el caso del stock S. Previamente, Koleoglu *et al.* (2017) ya habían sugerido que la presencia de *Varroa* podía inhibir la expresión de este gen. Estos autores, encontraron que abejas obreras recién emergidas inyectadas con un homogenato de varroas, presentaron un menor nivel de expresión del gen *pUf68* en comparación a abejas inyectadas con una solución control (*buffer PBS*). Otros autores también demostraron que la expresión de *pUf68* estaba suprimida por el parasitismo de *Varroa* en abejas adultas (Yang y Cox Foster, 2005) y crías (Dainat *et al.*, 2012; Hamiduzzaman *et al.*, 2012). La detección de genes de *A. mellifera* que se sub-expresan en presencia de *V. destructor* no resulta llamativo. Por ejemplo, Navajas *et al.* (2008) hallaron 30 genes con niveles de expresión reducida en crías de abejas parasitadas respecto a crías sanas. Algunos genes reportados como sub-expresados debido a la presencia de *V. destructor* forman parte de la vía JAK/STAT, involucrada en la respuesta inmune humoral y la respuesta antiviral (Evans *et al.*, 2006; Navajas *et al.*, 2008). Se sabe que, durante su alimentación, el ácaro inocula inmunosupresores a través de su saliva (Yang y CoxFoster, 2007; Richards *et al.*, 2011) pudiendo inducir la supresión de ciertos genes de inmunidad (Yang y Cox-Foster 2005; Navajas *et al.*, 2008; Hamiduzzaman *et al.*, 2012; Le Conte *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante destacar que en nuestros ensayos las abejas estuvieron expuestas al ácaro solamente durante 3 minutos, por lo que es poco probable que la disminución de la expresión de *pUf68* en abejas susceptibles expuestas a *V. destructor* esté vinculada a la capacidad de éste de suprimir la expresión de genes asociados a la inmunidad en las abejas. Futuros estudios que involucren aproximaciones de secuenciación masiva, permitirán entender más profundamente el rol de éste y otros genes asociados a las vías moleculares involucradas en la respuesta inmediata de acicalamiento de la abeja hacia el ácaro.

La atlastina es una proteína integral de membrana que pertenece a la familia de las *GTPasas* dinaminas; está embebida en el retículo endoplasmático de células eucariotas y es fundamental para la formación de la red tubular del mismo, la biogénesis del aparato de Golgi, la función de los microtúbulos, el tráfico de proteínas; además es crítica en los eventos de endocitosis y el desarrollo axonal (Hu *et al.*, 2009; Pawar *et al.*, 2017; Ibacache Chía, 2018). Se ha asociado a esta proteína con el desempeño motor tanto en *Drosophila* como en humanos, ya que en estos últimos, la mutación del gen está vinculada con la paraplejía espástica en miembros inferiores (Ferguson *et al.*, 2012). En nuestro estudio no logramos una amplificación positiva del gen *atl1* en las muestras de cabeza de abejas, aunque sí al analizar el resto del cuerpo. Para este tejido, no encontramos variación en el nivel de expresión del gen entre las abejas M tratadas con *Varroa* respecto a las expuestas al estímulo control. Contrariamente, las abejas S mostraron diferencias en el nivel de expresión de *atl1*

dependiendo del estímulo recibido, siendo mayor frente al tratamiento de infestación respecto al tratamiento control. En *Drosophila*, el gen *at11* está altamente expresado en el sistema nervioso central de la larva y en las paredes musculares del cuerpo (O'Sullivan *et al.*, 2013) y su sobre o sub-regulación en las neuronas motoras resultan en una disminución de la frecuencia de contracción en larvas y de la capacidad de trepar en moscas adultas (De Gregorio *et al.*, 2017). El hecho de que las abejas de *grooming* intenso (M) expresen la misma cantidad de ARNm de *at11* independientemente del estímulo, y que ésta sea similar a los niveles expresados por las abejas de *grooming* débil sólo cuando son tratadas con el ácaro, sugeriría un mayor nivel de reactividad basal y/o despliegue motor frente a los estímulos por parte de las abejas M, independientemente del tipo de los mismos. El análisis de expresión de *at11* desarrollado en este capítulo es el primero realizado en *A. mellifera* y considerando dos tejidos, por lo que los resultados obtenidos representan valiosos avances para entender el posible rol de este gen en los mecanismos moleculares que se activan frente a los estímulos generados por el ácaro y que desencadenan el CG.

3.5. CONCLUSIÓN

Los análisis de expresión de los genes candidatos evaluados y los antecedentes sobre sus posibles funciones biológicas nos permitieron iniciar la exploración de las vías genético-moleculares subyacentes al GC. Las principales funciones potencialmente asociadas a dicho comportamiento en nuestros materiales serían las involucradas en la transmisión y modulación neuronal y la regulación de la expresión de proteínas. Estas funciones podrían ser las impulsoras de respuestas tanto motoras como fisiológicas, como las relacionadas con la reacción instantánea ante estímulos químico y mecano-sensoriales y las asociadas con la locomoción y movimiento. Dada la complejidad de medir el daño de los ácaros a nivel de la colonia y los esfuerzos que conlleva su selección a gran escala, la identificación y estudio de genes asociados al *grooming* contribuye al desarrollo de herramientas de selección asistida por marcadores que permite agilizar la tarea de selección de colonias resistentes a *Varroa* (Guarna *et al.*, 2017; Grozinger y Robinson, 2015, Mondet *et al.*, 2020). En este sentido, si bien iniciales, nuestros resultados aportan información significativa sobre las bases genéticas del comportamiento de *grooming* y sugieren que diferencias en la regulación de estos genes permitiría explicar en parte la intensidad diferencial con que abejas de distintos stocks despliegan la respuesta de acicalamiento frente al ácaro. Sin embargo, consideramos que la información obtenida debe ser profundizada mediante un abordaje transcriptómico que permita describir globalmente la expresión de genes y vías metabólicas involucradas en este carácter de inmunidad social. Además, sería interesante abordar estudios comparativos de expresión génica frente a la presencia de diferentes estímulos irritativos.

CAPÍTULO 4.

Discusión y conclusiones generales

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo de Tesis de Doctorado estuvo enfocado en el estudio integral de colonias de *A. mellifera* que sobreviven de forma natural a *V. destructor* con los objetivos de caracterizar aspectos sanitarios, comportamentales y genéticos de esta población seleccionada altamente promisorio en términos apícolas, entender la contribución del comportamiento de *grooming* al fenotipo de resistencia, y explorar las bases conductuales y genéticas de este carácter.

En las últimas décadas, el ácaro ectoparásito *V. destructor* se ha asociado con la muerte de millones de colonias de abejas melíferas en todo el mundo. Este fenómeno ha impactado negativamente en la producción de miel y la polinización de cultivos, generando pérdidas económicas de miles de millones de dólares (Sanford, 2001; Rinderer *et al.*, 2010; Popovska Stojanov *et al.*, 2021). Actualmente, el control químico es la principal estrategia implementada por los apicultores para minimizar los efectos de la varroosis y garantizar la sobrevivencia de las colonias manejadas de *A. mellifera* (revisado en Noël *et al.*, 2020). Esta forma de control tiene varias desventajas, tales como la persistencia en el ambiente de los productos químicos utilizados, y su acumulación en propóleos, miel y ceras (Tremolada *et al.*, 2004; Premrov Bajuk *et al.*, 2017). Además, su uso inadecuado puede conducir a la aparición de focos de resistencia en las poblaciones del ácaro (revisado en Mitton *et al.*, 2022). La identificación y utilización de poblaciones de abejas melíferas que logran sobrevivir en ausencia de tratamientos acaricidas, mediante la expresión de rasgos de resistencia a *V. destructor*, representa una alternativa sustentable para el manejo de la parasitosis en las colonias (revisado en Locke, 2016). Para la implementación de esta estrategia, es necesaria la identificación de los mecanismos que subyacen a la resistencia en colmenas adaptadas a una determinada región, que permitan el desarrollo de planes de mejoramiento apícola a nivel local (revisado en Mondet *et al.*, 2020). Uno de los mecanismos comportamentales de defensa natural que tiene *A. mellifera* hacia *V. destructor* es el comportamiento de *grooming*, que involucra el desprendimiento y daño de los ácaros en estado forético por parte de las abejas obreras (revisado en Pritchard, 2016). A diferencia del comportamiento higiénico, el *grooming* ha sido un carácter menos estudiado, tanto a nivel individual como de colonia, ampliamente cuestionado como mecanismo de resistencia significativo en *A. mellifera*, y por tal motivo, pobremente incluido como blanco de selección en programas de mejoramiento apícola a nivel mundial.

Durante la primera etapa de esta Tesis (Capítulo 1), se realizó la caracterización a campo de las colonias de *A. mellifera* con rasgos promisorios de resistencia a *V. destructor*, como una alta caída de ácaros en pisos técnicos y sobrevivencia en ausencia de tratamientos acaricidas. Los resultados obtenidos (vinculados al objetivo específico 1) permitieron determinar que el comportamiento de *grooming* es un carácter fenotípicamente variable entre las colmenas de abejas analizadas, y que se

expresa con alta intensidad en las colonias sobrevivientes al ácaro (M) respecto a las susceptibles (S). Observamos que el daño producido por las abejas de las colonias sobrevivientes presenta valores intermedios entre los informados previamente para poblaciones europeas (Fries *et al.*, 1996) y africanizadas (Moretto *et al.*, 1991) de *A. mellifera*. El alto porcentaje de ácaros dañados, y el bajo porcentaje de infestación tanto en abejas adultas como en cría observado en el stock M sugieren que el comportamiento de *grooming* aumentaría la mortalidad de los ácaros y modularía así su crecimiento poblacional dentro de las colonias, como había sugerido Mondragón *et al.* (2005) en estudios pioneros sobre abejas africanizadas. La regulación de las cargas parasitarias en las colmenas M impactaría positivamente en las condiciones durante la invernada y consecuentemente en el desarrollo y fortaleza poblacional de las colonias durante la primavera. Estos hallazgos permiten concluir que el stock M es resistente a *V. destructor* y que el comportamiento de *grooming* sería uno de los mecanismos de resistencia activa desplegados por estas abejas frente a la parasitación, tal como se ha propuesto en trabajos previos sobre abejas de origen africanizado (Boecking y Ritter, 1993; Moretto *et al.*, 1993; Invernizzi *et al.*, 2016; Nganso *et al.*, 2017) y europeo (Moosbeckhofer, 1992; Ruttner y Hänel, 1992; Bienefeld *et al.*, 1999; Arechavaleta-Velasco y Guzmán Novoa, 2001; Guzmán Novoa *et al.*, 2012). Además, pudimos determinar que la proporción de ácaros dañados es un buen indicador para determinar el nivel de acicalamiento de una colonia a campo, en forma consistente con discusiones previas y análisis de colmenas africanizadas y europeas de otras regiones (Guzmán Novoa *et al.*, 2012; Dadoun *et al.*, 2020). En conjunto, la información obtenida en esta primera etapa permitió sustentar el estatus promisorio de este material genético apícola, entender el rol del comportamiento de *grooming* en la resistencia a *V. destructor*, y sentar las bases para el desarrollo futuro de un programa local de selección de colonias resistentes al ácaro, con una buena aptitud para la invernada y apropiado desarrollo poblacional al inicio de la temporada apícola.

La caracterización a campo de un comportamiento de inmunidad social, tal como el comportamiento de *grooming*, si bien permite explorar su vínculo y potencial efecto sobre variables sanitarias y poblacionales de interés, así como considerar el contexto ambiental externo e interno de la colonia, no permite describir las acciones de limpieza que despliegan las abejas frente al ácaro, ni caracterizar la intensidad y efectividad del comportamiento a nivel individual. Para ello, es necesario realizar estudios en colmenas de observación que implican ensayos de alta complejidad (Büchler *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 1987; Thakur *et al.*, 1997). En los últimos años se ha recurrido al uso de un método de observación más simple, que involucra la documentación del comportamiento individual de las abejas frente al ácaro u otro estímulo en cajas de Petri (Aumeier, 2001; Andino y Hunt, 2011; Guzmán-Novoa *et al.*, 2012; Invernizzi *et al.*, 2016). A pesar de ser un método simple y rápido para

medir el *grooming*, conlleva un alto estrés para las abejas ensayadas y contrasta significativamente con el ambiente natural de las colonias (discutido en Espinosa-Montaño *et al.*, 2004).

En la segunda etapa de esta Tesis (Capítulo 2) se realizaron ensayos de laboratorio para caracterizar el comportamiento de *grooming* de abejas individuales frente a la infestación artificial con *V. destructor*. Logramos diseñar y establecer un dispositivo (cuadro de observación) para describir las reacciones de limpieza de las abejas frente al ácaro en un entorno relativamente natural, que previamente no se había implementado. De esta manera, evaluamos diferencias en la intensidad y tipo de despliegue conductual de las abejas de distintas genéticas (resistentes, susceptibles) y edades. Los resultados obtenidos (vinculados al objetivo específico 2) permitieron determinar que las abejas resistentes, a diferencia de las susceptibles, iniciaron el acicalamiento casi inmediatamente luego de ser infestadas con el ácaro y presentaron un despliegue de limpieza intenso, usando la totalidad de sus patas y realizando un gran número de intentos. Estos resultados son los primeros en la bibliografía que documentan diferencias en el despliegue de la respuesta de acicalamiento frente al ácaro entre abejas de colonias resistentes y susceptibles. Si bien, observaciones previas en cajas de Petri indicaron que las abejas de origen europeo reaccionan menos intensamente a *V. destructor* que las abejas africanizadas (Aumier, 2001; Invernizzi *et al.*, 2016), nuestras abejas resistentes de linaje mitocondrial europeo (stock M) expresaron un *grooming* “intenso”, de acuerdo a lo descrito previamente por Guzmán-Novoa *et al.* (2012). Mediante los ensayos realizados también pudimos confirmar un efecto de la edad de las abejas sobre la respuesta de limpieza hacia el ácaro, previamente sugerido por Pettis y Pankiw (1998) y más recientemente por Dadoun *et al.* (2020). Estos hallazgos permiten proponer la presencia de polietismo en el comportamiento de *grooming* en *A. mellifera* y de un cierto grado de especialización en estas tareas de limpieza, que merece ser explorado en mayor profundidad en futuros estudios.

En conjunto, los resultados obtenidos en los Capítulos 1 y 2 están en línea con lo observado por Guzmán-Novoa *et al.* (2012) en otro material genético apícola, y sugieren que una colmena de alto comportamiento de *grooming* estaría conformada por abejas con mayor predisposición genética hacia la limpieza y la respuesta específica a *V. destructor*. Podemos concluir entonces, que el fenotipo de las abejas en el laboratorio es un buen indicador del nivel de acicalamiento de una colonia a campo (independientemente del fondo genético y la historia selectiva del material), que puede ser utilizado en trabajos posteriores tanto de investigación como de cría selectiva. Una vez corroborado que el comportamiento de *grooming*, tanto a nivel colonia como individual, impacta sobre la dinámica de la parasitación, se realizaron ensayos de laboratorio para explorar las bases genéticas de este comportamiento y explicar las diferencias observadas entre las abejas de los stocks analizados.

En la tercera y última etapa de esta Tesis, realizamos ensayos de biología molecular para caracterizar los perfiles de expresión de cinco genes candidatos asociados al comportamiento de *grooming* de acuerdo a bibliografía previa (objetivo específico 3). Pudimos corroborar la variación en la expresión de algunos de los genes candidatos en presencia y ausencia de *V. destructor*, resultado que sugiere que la expresión de dichos genes sería estímulo-específica. Además, observamos en algunos casos que los patrones de expresión difieren según el tejido analizado, información adicional para la exploración de los posibles estímulos y vías fisiológicas involucradas en la respuesta de acicalamiento. Estos resultados son novedosos, y no se habían explorado antes en la bibliografía, por lo que merecen ser profundizados y complementados con ensayos de eco-química y neurofisiología. Detectamos también diferencias en los niveles de expresión en la mayoría de los genes estudiados entre abejas de *grooming* intenso y abejas de *grooming* débil, resultado que sugiere su participación en la modulación del fenotipo de acicalamiento y demuestra que diferencias genéticas subyacen a la diferenciación de los stocks analizados. En este sentido, nuestros resultados coinciden con las evidencias obtenidas por Arechavaleta-Velasco *et al.* (2012), quienes mediante un análisis de mapeo de QTL, propusieron que múltiples genes estarían involucrados en la expresión del *grooming*. Específicamente, las abejas del stock resistente (*grooming* intenso), sometidas a la infestación con *V. destructor*, expresan mayores niveles del gen *neurexin-1* tanto en el tejido correspondiente al cuerpo como al de la cabeza. Estos resultados sugieren que las abejas de dicho stock tienen una mayor sensibilidad a la presencia del ácaro, y están en línea con los resultados obtenidos por Hamiduzzaman *et al.* (2017) y Morfin *et al.* (2020), quienes detectaron una mayor expresión de este gen en *pooles* de cabezas de abejas de una población seleccionada por su alta tasa de ácaros dañados. De acuerdo a los antecedentes previos y a nuestros resultados, sugerimos que el gen *neurexin-1* tendría un papel esencial en la ejecución de la limpieza de la abeja, y lo consideramos como un marcador molecular promisorio a ser usado en sistemas de selección asistida por marcadores para la obtención de stocks de *A. mellifera* resistentes a *V. destructor*.

Si bien en otras regiones del mundo se han descrito colonias de abejas con diferentes grados de resistencia a *V. destructor* como consecuencia de respuestas fisiológicas y comportamentales (revisado en Mondet *et al.*, 2020), no se habían identificado ni caracterizado hasta el momento materiales apícolas resistentes al ácaro en Argentina. La realización de esta Tesis permitió describir la relación parásito-hospedador en un material local resistente y adaptado a clima subtropical, identificar al comportamiento de *grooming* como un carácter estrechamente asociado con la supervivencia diferencial, y caracterizarlo en términos fenotípicos y genéticos. Además, durante el desarrollo de este trabajo, se incorporaron elementos claves que nos permitieron abordar la complejidad del sistema en estudio de una manera integral, tales como el desarrollo y ajuste de

protocolos que incluyen diferentes escalas de aproximación y diferentes niveles de análisis basados en el conocimiento previo (Aumeier, 2001; Invernizzi *et al.*, 2016; Hamiduzzaman *et al.*, 2017) pero también involucrando ensayos concatenados en ambientes naturales y de laboratorio que contemplan la biología de *A. mellifera* y su interacción con *V. destructor*.

Consideramos que el material apícola aquí caracterizado y el protocolo seguido para su obtención representan herramientas claves para el establecimiento de un programa de selección regional, que considere las particularidades del ambiente subtropical. Asimismo, el desarrollo de programas regionales de cría de abejas melíferas resistentes a los ácaros, que incluyan el uso de las poblaciones adaptadas localmente, merece ser considerado, especialmente en Argentina, donde coexisten en una misma región apícola ecorregiones altamente contrastantes.

4.2. CONCLUSIONES

Se logró caracterizar integralmente una población de *A. mellifera* de linaje europeo establecida en clima subtropical que muestra resistencia activa a *V. destructor* mediante la expresión de un alto comportamiento de *grooming* respecto a colmenas comerciales utilizadas comúnmente en la región. Se demostró así que existe variabilidad fenotípica en este comportamiento entre colmenas adaptadas a clima subtropical en Argentina. De esta manera, podemos apoyar las hipótesis N°1 y N°2 planteadas en esta Tesis. Los ensayos de observación en arenas experimentales permitieron comprender en detalle las reacciones de *grooming* a nivel individual y describir las diferencias en tiempo de reacción e intensidad de acicalamiento entre abejas de colmenas pertenecientes a los stocks evaluados, evidenciando una alta consistencia con lo observado a nivel de las colmenas a campo. En base a estos resultados, podemos apoyar las hipótesis N°3 y N°4. Por último, se detectó variación en la expresión de genes candidatos para el comportamiento de *grooming* y se lograron reconocer funciones biológicas potencialmente asociadas, que se relacionan con mecanismos neuronales de recepción y procesamiento de estímulos externos y la subsecuente regulación de vías moleculares y respuestas de movimiento, testeando de esta manera las hipótesis N°5 y N°6.

En esta Tesis se exploraron conceptos novedosos en el estudio de la complejidad en un organismo eusocial y su relación con un parásito crítico. A través de enfoques multidisciplinarios, basados en conocimientos contextuales preexistentes, se integró información de evaluaciones de colmenas en su ambiente, de arenas experimentales -donde se trabajó con individuos de dichas colmenas- y de laboratorio de biología molecular -explorando la expresión de genes candidatos de *grooming* en estos individuos. Los resultados, además de ampliar el conocimiento de los procesos involucrados en la respuesta de limpieza de *A. mellifera* hacia *V. destructor*, permiten proponer parámetros de evaluación que constituirán herramientas para la selección de colmenas resistentes al

ácaro. Los protocolos establecidos, los experimentos puestos a punto y la información generada y discutida en esta Tesis son relevantes para implementar mejoras en los programas regionales de mejoramiento genético apícola, y como tales, contribuirán a la sustentabilidad de la apicultura nacional, actividad que produce alimentos naturales y contribuye, mediante la polinización, a la producción de gran parte de los productos frutihortícolas.

4.3. PERSPECTIVAS A FUTURO

En base a los resultados obtenidos y las herramientas generadas a partir de la presente Tesis Doctoral, se proponen las siguientes acciones a futuro:

1. Conservar y poner en valor el material vivo resistente a *V. destructor* aquí caracterizado, y poner a disposición su uso para apicultores locales una vez finalizada su evaluación productiva.
2. Realizar estudios que implementen aproximaciones fisiológicas y eco-químicas para comprender la naturaleza de los principales estímulos que inducen la respuesta de acicalamiento de las abejas frente al ácaro.
3. Explorar la contribución del comportamiento de *allo-grooming* (acicalamiento entre abejas obreras) para profundizar su entendimiento como carácter de inmunidad social y su impacto en la dinámica de la parasitosis dentro de la colonia.
4. Profundizar los estudios comportamentales para determinar la existencia de polietismo en el *grooming* en *A. mellifera* y explorar su contribución a la inmunidad organizacional.
5. Iniciar estudios transcriptómicos comparativos para identificar nuevos genes candidatos y explorar las potenciales vías moleculares involucradas en el comportamiento de *grooming* y otros comportamientos de inmunidad social relacionados.
6. Complementar los estudios transcriptómicos con análisis a nivel genómico que permitan caracterizar la variabilidad genética e identificar mutaciones puntuales en el stock resistente a *V. destructor* para identificar potenciales marcadores moleculares asociados a la resistencia y asistir al mejoramiento genético de los materiales.

BIBLIOGRAFÍA

Abrahamovich, A., Díaz, N., y Lucia, M. (2007). Identificación de las “abejas sociales” del género *Bombus* (Hymenoptera, Apidae) presentes en la Argentina: clave pictórica, diagnosis, distribución geográfica y asociaciones florales. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 106(2), 165-176.

Acevedo-Gonzalez, J. P., Galindo-Cardona, A., Fuenzalida-Uribe, N. L., Ghezzi, A., y Giray, T. (2022). Defensiveness measurement in honey bees (*Apis mellifera*) and brain expression of associated genes after noxious stimulus. *bioRxiv*, 2022-04.

Agra, M. N. (2018). Caracterización de la variabilidad genética de colonias comerciales y silvestres de *Apis mellifera* en Argentina (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata).

Agra, M. N., Conte, C. A., Corva, P. M., Cladera, J. L., Lanzavecchia, S. B., y Palacio, M. A. (2018). Molecular characterization of *Apis mellifera* colonies from Argentina: genotypic admixture associated with ecoclimatic regions and apicultural activities. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(9), 724-738.

Aizen, M. A., y Harder, L. D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current biology*, 19(11), 915-918.

Alaux, C., Sinha, S., Hasadsri, L., Hunt, G. J., Guzmán-Novoa, E., DeGrandi-Hoffman, G., Uribe-Rubio, J. L., Southey, B. R., Rodriguez-Zas, S. y Robinson, G. E. (2009). Honey bee aggression supports a link between gene regulation and behavioral evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15400-15405.

Alburaki, M., Bertrand, B., Legout, H., Moulin, S., Alburaki, A., Sheppard, W. S., y Garnery, L. (2013). A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC genetics*, 14(1), 1-11.

Alburaki, M., Moulin, S., Legout, H., Alburaki, A., y Garnery, L. (2011). Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*, 42, 628-641.

Al-Ghamdi, A. A., Nuru, A., Khanbash, M. S., y Smith, D. R. (2013). Geographical distribution and population variation of *Apis mellifera jemenitica* Ruttner. *Journal of Apicultural Research*, 52(3), 124-133.

Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., y Omholt, S. W. (2004). Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering?. *Journal of economic entomology*, 97(3), 741-747.

Anderson, D. L., y Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental y applied acarology*, 24, 165-189.

Andino, G. K., y Hunt, G. J. (2011). A scientific note on a new assay to measure honeybee mite-grooming behavior. *Apidologie*, 42, 481-484.

Annoscia, D., Del Piccolo, F., y Nazzi, F. (2012). How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *Journal of insect physiology*, 58(12), 1548-1555.

Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., y Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of invertebrate pathology*, 93(1), 67-70.

Arias, M. C., y Sheppard, W. S. (1996). Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera* L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. *Molecular phylogenetics and evolution*, 5(3), 557-566.

Aumeier, P. (2001). Bioassay for grooming effectiveness towards *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees. *Apidologie*, 32(1), 81-90.

Aydin, L., Gulegen, E., Cakmak, I., Girisgin, A. O., y Wells, H. (2006). Relation between Nosema and Chalkbrood diseases, and its implication for an apiary management model. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 50(4), 471.

B

Bak, B., y Wilde, J. (2015). Grooming behavior by worker bees of various subspecies of honey bees to remove *Varroa destructor* mites. *Journal of Apicultural Research*, 54(3), 207-215.

Baracchi, D., Fadda, A., y Turillazzi, S. (2012). Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies. *Journal of insect physiology*, 58(12), 1589-1596.

Baracchi, D., y Cini, A. (2014). A socio-spatial combined approach confirms a highly compartmentalised structure in honeybees. *Ethology*, 120(12), 1167-1176.

Basibuyuk, H. H., y Quike, D. L. (1999). Grooming behaviours in the Hymenoptera (Insecta): potential phylogenetic significance. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 125(3), 349-382.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., y Walker, S. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823*.

Bedascarrasbure, E. L. (1995). *Perspectivas de la apicultura en el NOA* (No. C016. 044). INTA PROAPI.

Bienefeld, K., Zautke, F., Pronin, D., y Mazed, A. (1999). Recording the proportion of damaged *Varroa jacobsoni* Oud. in the debris of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Apidologie* 30, 249–256.

Bierzuchudek, A. (1979). *Historia de la apicultura argentina* (No. 638.10982). Héctor J. Mattone.

Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P., Reemer, M., Ohlemuller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A. P., Potts, S. G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J. y Kunin, W. E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785), 351-354.

Biganski, S., Kurze, C., Müller, M. Y., y Moritz, R. F. (2018). Social response of healthy honeybees towards *Nosema ceranae*-infected workers: care or kill?. *Apidologie*, 49, 325-334.

Biswas, S., Reinhard, J., Oakeshott, J., Russell, R., Srinivasan, M. V., y Claudianos, C. (2010). Sensory regulation of neuropeptides and neurexin I in the honeybee brain. *Plos one*, 5(2), e9133

Boecking, O., y Genersch, E. (2008). Varroosis—the ongoing crisis in bee keeping. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3, 221-228.

Boecking, O., y Ritter, W. (1994). Current status of behavioral tolerance of the honey bee *Apis mellifera* to the mite *Varroa jacobsoni*. *American bee journal* (USA).

Boecking, O., y Spivak, M. (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2-3), 141-158.

Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-18.

Boot, W. J., Driessen, R. G., Calis, J. N., y Beetsma, J. (1995). Further observations on the correlation between attractiveness of honey bee brood cells to *Varroa jacobsoni* and the distance from larva to cell rim. *Entomologia experimentalis et applicata*, 76(3), 223-232.

Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., y Higes, M. (2013). *Nosema spp.* infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary research*, 44, 1-15.

Bourgeois, C. F., Lejeune, F., y Stévenin, J. (2004). Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 78, 37-88.

Boutin, S., Alburaki, M., Mercier, P. L., Giovenazzo, P., y Derome, N. (2015). Differential gene expression between hygienic and non-hygienic honeybee (*Apis mellifera* L.) hives. *BMC genomics*, 16(1), 1-13.

Božič, J., y Valentinčič, T. (1995). Quantitative analysis of social grooming behavior of the honey bee *Apis mellifera* carnica. *Apidologie*, 26(2), 141-147.

Božič, J., y Woodring, J. (1998). Variations of brain biogenic amines in mature honeybees and induction of recruitment behavior. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, 120(4), 737-744.

Branco, M. R., Kidd, N. A., y Pickard, R. S. (1999). Development of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis mellifera* iberica in a Mediterranean climate. *Apidologie*, 30(6), 491-503.

Brascesco, C., de Landa, G. F., Quintana, S., Junges, C., Di Gerónimo, V., Porrini, L., Reynaldi, F. J., Eguaras, M., y Maggi, M. (2021). A Lake Sinai Virus variant is infecting managed honey bee colonies of Argentina with varying degrees of *Varroa destructor* infestation. *Bee World*, 98(4), 126-131.

Brutscher, L. M., Baer, B., y Niño, E. L. (2019). Putative drone copulation factors regulating honey bee (*Apis mellifera*) queen reproduction and health: A review. *Insects*, 10(1), 8.

Brutscher, L. M., McMenamin, A. J., y Flenniken, M. L. (2016). The buzz about honey bee viruses. *PLoS Pathogens*, 12(8), e1005757.

Büchler, R. (1994). *Varroa* tolerance in honey bees—occurrence, characters and breeding. *Bee World*, 75(2), 54-70.

Büchler, R., Berg, S., y Le Conte, Y. (2010). Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie*, 41(3), 393-408.

Büchler, R., Costa, C., Hatjina, F., Andonov, S., Meixner, M. D., Conte, Y. L., Uzunov, A., Berg, S., Bienkowska, M., Bougaa, M., Drazic, M., Dyrba, W., Kryger, Per., Panasiuk, B., Pechacker, H., Petrov, P., Kexic, N., Korpela, S., y Wilde, J. (2014). The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 53(2), 205-214.

Büchler, R., Drescher, W., y Tornier, I. (1992). Grooming behaviour of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Experimental y applied acarology*, 16(4), 313-319.

Bulacio Cagnolo, N., Basualdo, M., y Eguaras, M. (2010). Actividad Varroocida del timol en colonias de *Apis mellifera* L. de la provincia de Santa Fe. *InVet*, 12(1), 85-90.

Burgett, M., Rucker, R. R., y Thurman, W. N. (2004). Economics and honey bee pollination markets. *American Bee Journal*.

Büschges, A. (2005). Sensory control and organization of neural networks mediating coordination of multisegmental organs for locomotion. *Journal of neurophysiology*, 93(3), 1127-1135.

- Calderone, N. W. (1999). Evaluation of formic acid and a thymol-based blend of natural products for the fall control of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(2), 253-260.
- Calderone, N. W., Lin, S., y Kuenen, L. P. (2002). Differential infestation of honey bee, *Apis mellifera*, worker and queen brood by the parasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 33(4), 389-398.
- Calderone, N. W., y Page, R. E. (1988). Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behavioral ecology and sociobiology*, 22, 17-25.
- Calfee, E., Agra, M. N., Palacio, M. A., Ramírez, S. R., y Coop, G. (2020). Selection and hybridization shaped the rapid spread of African honey bee ancestry in the Americas. *PLoS Genetics*, 16(10), e1009038.
- Calis, J. N., Fries, I., y Ryrie, S. C. (1999). Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2-3), 111-124.
- Cappa, F., Bruschini, C., Protti, I., Turillazzi, S., y Cervo, R. (2016). Bee guards detect foreign foragers with cuticular chemical profiles altered by phoretic varroa mites. *Journal of Apicultural Research*, 55(3), 268-277.
- Cini, A., Bordoni, A., Cappa, F., Petrocelli, I., Pitzalis, M., Iovinella, I., Dani, F. R., Turillazzi, S. y Cervo, R. (2020). Increased immunocompetence and network centrality of allogroomer workers suggest a link between individual and social immunity in honeybees. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12.
- Clarke, K. E., Rinderer, T. E., Franck, P., Quezada-Euán, J. G., y Oldroyd, B. P. (2002). The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution*, 56(7), 1462-1474.
- Conlon, B. H., Aurori, A., Giurgiu, A. I., Kefuss, J., Dezmirean, D. S., Moritz, R. F., y Routtu, J. (2019). A gene for resistance to the Varroa mite (Acari) in honey bee (*Apis mellifera*) pupae. *Molecular ecology*, 28(12), 2958-2966.
- Conte, C., Lanzavecchia S., Agra M., Corva P., Cladera J. (2008). Descripción de nuevas variante haplotípicas en poblaciones de *Apis mellifera* en Argentina. IX Simposio Iberoamericano Sobre Conservación Y Utilización De Recursos Zootenéticos. Mar Del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Cornman, R. S. (2017). Relative abundance of deformed wing virus, *Varroa destructor* virus 1, and their recombinants in honey bees (*Apis mellifera*) assessed by kmer analysis of public RNA-Seq data. *Journal of invertebrate pathology*, 149, 44-50.
- Cornuet, J. M., Fresnaye, J., y Tassencourt, L. (1975). Discrimination et classification de populations d'abeilles à partir de caractères biométriques. *Apidologie*, 6(2), 145-187.
- Cornuet, J. M., Garnery, L., y Solignac, M. (1991). Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*, 128(2), 393-403.
- Corrêa-Marques, M. H., Issa, M. R. C., y Jong, D. D. (2000). Classification and quantification of damaged *Varroa jacobsoni* found in the debris of honey bee colonies as criteria for selection?. *American Bee Journal*, 140(10), 820-824.
- Cotter, S. C., Pincheira-Donoso, D., y Thorogood, R. (2019). Defences against brood parasites from a social immunity perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1769), 20180207.
- Cournoyer, A., Plamondon, L., Bau-Gaudreault, L., Deschamps, A., Dubreuil, P., y Benoit-Biancamano, M. O. (2022). Effects of *Varroa destructor* on Hemolymph Sugars and Secondary Infections in Honeybees (*Apis mellifera*). *Applied Sciences*, 12(22), 11630.

- Cremer, S., Armitage, S. A., y Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current biology*, 17(16), R693-R702.
- Cremer, S., Pull, C. D., y Fürst, M. A. (2018). Social immunity: emergence and evolution of colony-level disease protection. *Annual Review of Entomology*, 63, 105-123.
- Cridland, J. M., Tsutsui, N. D., y Ramírez, S. R. (2017). The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Biology and Evolution*, 9(2), 457-472.
- Currie, R. W., y Tahmasbi, G. H. (2008). The ability of high-and low-grooming lines of honey bees to remove the parasitic mite *Varroa destructor* is affected by environmental conditions. *Canadian Journal of Zoology*, 86(9), 1059-1067.
- Currie, R. W., Pernal, S. F., y Guzmán-Novoa, E. (2010). Honey bee colony losses in Canada. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 104-106.

D

- Dadoun, N., Nait-Mouloud, M., Mohammedi, A., y Sadeddine Zennouche, O. (2020). Differences in grooming behavior between susceptible and resistant honey bee colonies after 13 years of natural selection. *Apidologie*, 51, 793-801.
- Dahle, B. (2010). The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 124-125.
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., y Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS one*, 7(2), e32151.
- Danka, R. G., Harris, J. W., Villa, J. D., y Dodds, G. E. (2013). Varying congruence of hygienic responses to *Varroa destructor* and freeze-killed brood among different types of honeybees. *Apidologie*, 44, 447-457.
- Darwin, C. (1871). *The descent of man and selection in relation to sex*. John Murray. London, England. UK, 1, 423.
- Daszak, P., Cunningham, A. A., y Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452), 443-449.
- Daughenbaugh, K. F., Martin, M., Brutscher, L. M., Cavigli, I., Garcia, E., Lavin, M., y Flenniken, M. L. (2015). Honey bee infecting Lake Sinai viruses. *Viruses*, 7(6), 3285-3309.
- De Gregorio, C., Delgado, R., Ibacache, A., Sierralta, J., y Couve, A. (2017). *Drosophila* Atlastin in motor neurons is required for locomotion and presynaptic function. *Journal of Cell Science*, 130(20), 3507-3516.
- de Guzman, L. I., y Rinderer, T. E. (1999). Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees. *Apidologie*, 30(2-3), 85-95.
- de Guzman, L., Rinderer, T. E., Stelzer, J. A., y Anderson, D. (1998). Congruence of RAPD and mitochondrial DNA markers in assessing *Varroa jacobsoni* genotypes. *Journal of Apicultural Research*, 37(1), 49-51.
- De Jaime Lorén, J. M. (2003). Sobre la primicia hispana en cuanto a los envíos de abejas europeas a América. *Llull: Revista de la Sociedad Española de Historia de las Ciencias y de las Técnicas*, 26(56), 595-612.
- de Jong, D., Gonçalves, L. S., y Morse, R. A. (1984). Dependence on climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. *Bee world*, 65(3), 117-121.
- De Jong, D., Roma, D. D. A., y Goncalves, L. S. (1982). A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. *Apidologie*, 13(3), 297-306.

- De Miranda, J. R., Cornman, R. S., Evans, J. D., Semberg, E., Haddad, N., Neumann, P., y Gauthier, L. (2015). Genome characterization, prevalence and distribution of a macula-like virus from *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Viruses*, 7(7), 3586-3602.
- de Miranda, J. R., Dainat, B., Locke, B., Cordoni, G., Berthoud, H., Gauthier, L., Neuman, P., Budge, G. E., Ball, B. V., y Stoltz, D. B. (2010). Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of General Virology*, 91(10), 2524-2530.
- De Miranda, J. R., y Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S48-S61.
- De Roode, J. C., y Lefèvre, T. (2012). Behavioral immunity in insects. *Insects*, 3(3), 789-820.
- Santis, L. D., y Cornejo, L. G. (1968). La abeja africana *Apis adansonii* en América del Sur. *Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de La Plata (Argentina)*, 44(1), 17-35.
- Dechatre, H., Michel, L., Soubeyrand, S., Maisonnasse, A., Moreau, P., Poquet, Y., Pioz, M., Vidau, C., Basso, B., y Kretzschmar, A. (2021). To treat or not to treat bees? handy varload: a predictive model for *Varroa destructor* load. *Pathogens*, 10(6), 678.
- DeJong, D., y Soares, A. E. E. (1997). An isolated population of Italian bees that has survived *Varroa jacobsoni* infestation without treatment for over 12 years. *American bee journal* 4, 742-745
- Delaplane, K. S., y Mayer, D. F. (2000). *Crop pollination by bees*. CABI publishing.
- Delaplane, K. S., y Hood, W. M. (1999). Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA. *Apidologie*, 30(5), 383-395.
- Delfinado-Baker, M. (1988). Variability and biotypes of *Varroa jacobsoni* Oudemans. *American bee journal* 128, 567-568
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., y Pennacchio, F. (2016). A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), 3203-3208.
- 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., y Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of apicultural research*, 52(1), 1-54.
- Dogantzis, K. A., Tiwari, T., Conflitti, I. M., Dey, A., Patch, H. M., Muli, E. M., Garnery, L., Whitfield, C.W., Stolle, Eckart., Alqarni, A. S., Allsopp, M. H., y Zayed, A. (2021). Thrice out of Asia and the adaptive radiation of the western honey bee. *Science Advances*, 7(49), eabj2151.
- Donzé, G., y Guerin, P. M. (1994). Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34, 305-319.
- Duay, P., De Jong, D., y Engels, W. (2003). Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 34(1), 61-65.
- Dubois, E., Dardouri, M., Schurr, F., Cougoule, N., Sircoulomb, F., y Thiéry, R. (2020). Outcomes of honeybee pupae inoculated with deformed wing virus genotypes A and B. *Apidologie*, 51, 18-34.

E

- Eguaras, M. (1993). Investigaciones sobre el ácaro parásito *Varroa jacobsoni* Oud.(Acari: Gamasida) y su hospedador *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata).
- Eguaras, M., Cora, D., Ruffinengo, S., Faverin, C., y Palacio, A. (2004). Efectividad del timol en el control de *Varroa destructor* en condiciones de laboratorio y en colonias de *Apis mellifera*. *Natura Neotropicalis*, 34, 27-32.
- Eguaras, M., Del Hoyo, M., Palacio, M. A., Ruffinengo, S., y Bedascarrasbure, E. L. (2001). A new product with formic acid for *Varroa jacobsoni* Oud. control in Argentina. I. Efficacy. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(1), 11-14.
- Eguaras, M., Marcangeli, J., Oppedisano, M., y Fernández, N. (1994). Seasonal changes in *Varroa jacobsoni* reproduction in temperate climates of Argentina. *Bee Science*, 3, 120-123.
- Eguaras, M., Ruffinengo, S. (2006) Estrategias para el control de Varroa. Editorial Martin. Mar del Plata, Argentina
- Elekonich, M. M., y Roberts, S. P. (2005). Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, 141(4), 362-371.
- Ellis, J. D., Evans, J. D., y Pettis, J. (2010). Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 134-136.
- Elzen, P. J., Eischen, F. A., Baxter, J. R., Elzen, G. W., y Wilson, W. T. (1999). Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie*, 30(1), 13-17.
- Elzen, P. J., y Westervelt, D. (2002). Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida. *American Bee Journal*, 142(4), 291-292.
- Emsen, B., Petukhova, T., y Guzman-Novoa, E. (2012). Factors limiting the growth of *Varroa destructor* populations in selected honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(24), 4519-4525.
- Erber, J., y Kloppenburg, P. (1995). The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honey bee (*Apis mellifera* L.) I. Behavioral analysis of the motion-sensitive antennal reflex. *Journal of Comparative Physiology A*, 176, 111-118.
- Es' kov, E. K., y Maslennikova, V. I. (2004). Geographic variation in the seasonal reproductive strategy of the mite *Varroa jacobsoni* in the honeybee nest. *Russian journal of ecology*, 35, 98-102.
- Espinosa, L., Guzman-Novoa, E., Sanchez, A., Leyva, N., Uribe, J. L., y Prieto, M. D. (2004). Determinación de la confiabilidad de un metodo directo para diferenciar el comportamiento de acicalamiento entre abejas de diferente genotipo. *Proccedings of 11 Congreso internacional de actualización apicola*, 79-86.
- Espinosa-Montaño, L. G., Guzmán-Novoa, E., Sánchez-Albarrán, A., Montaldo, H. H., y Correa-Benítez, A. (2008). Comparative study of three assays to evaluate hygienic behavior in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Veterinaria Mexico*, 39(1), 39-54.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., y Cornuet, J. M. (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, 140(2), 679-695.

Etherton, M. R., Blaiss, C. A., Powell, C. M., y Südhof, T. C. (2009). Mouse neurexin-1 α deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17998-18003.

Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., y Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology*, 15(5), 645-656.

Evans, J. D., y Cook, S. C. (2018). Genetics and physiology of *Varroa* mites. *Current opinion in insect science*, 26, 130-135.

Evans, J. D., y Spivak, M. (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S62-S72.

Evans, J. D., y Wheeler, D. E. (1999). Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5575-5580.

F

FAO. (2018). Why bees matter. The importance of bees and other pollinators for food and agriculture. FAO (ed.). 16 pp. <https://www.fao.org/3/i9527en/i9527en.pdf>

Farish, D. J. (1972). The evolutionary implications of qualitative variation in the grooming behaviour of the Hymenoptera (Insecta). *Animal Behaviour*, 20(4), 662-676.

Ferguson, S. M., y De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(2), 75-88.

Flores, J. M., Gámiz, V., Jiménez-Marín, Á., Flores-Cortés, A., Gil-Lebrero, S., Garrido, J. J., y Hernando, M. D. (2021). Impact of *Varroa destructor* and associated pathologies on the colony collapse disorder affecting honey bees. *Research in veterinary science*, 135, 85-95.

Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S5-S9.

Forsgren, E., Stevanovic, J., y Fries, I. (2008). Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus* larvae genotypes. *Veterinary microbiology*, 129(3-4), 342-349.

Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M., y Cornuet, J. M. (2000). Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*, 9(7), 907-921.

Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M., y Cornuet, J. M. (2001). Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86(4), 420-430.

Freitas, B. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Medina, L. M., Kleinert, A. D. M. P., Galetto, L., Nates-Parra, G., y Quezada-Euán, J. J. G. (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40(3), 332-346.

Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, 103, S73-S79.

Fries, I., Camazine, S., y Sneyd, J. (1994). Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee world*, 75(1), 5-28.

Fries, I., Imdorf, A., y Rosenkranz, P. (2006). Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie*, 37(5), 564-570.

Fries, I., Slemenda, S. B., da Silva, A., y Pieniasek, N. J. (2003). African honey bees (*Apis mellifera* scutellata) and nosema (*Nosema apis*) infections. *Journal of Apicultural Research*, 42(1-2), 13-15.

Fries, I., y Bommarco, R. (2007). Possible host-parasite adaptations in honey bees infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 38(6), 525-533.

Fries, I., y Camazine, S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 32(3), 199-214.

Fries, I., y Rosenkranz, P. (1996). Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental y applied acarology*, 20, 103-112.

Frumhoff, P. C., y Baker, J. (1988). A genetic component to division of labour within honey bee colonies. *Nature*, 333(6171), 358-361.

Fussnecker, B. L., Smith, B. H., y Mustard, J. A. (2006). Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect physiology*, 52(10), 1083-1092.

G

Galajda, R., Valenčáková, A., Sučík, M., y Kandráčová, P. (2021). Nosema Disease of European Honey Bees. *Journal of Fungi*, 7(9), 714.

Galindo-Cardona, A., Carolina Monmany, A., Moreno-Jackson, R., Rivera-Rivera, C., Huertas-Dones, C., Caicedo-Quiroga, L., y Giray, T. (2012). Landscape analysis of drone congregation areas of the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 12(1), 122.

Galindo-Cardona, A., Scannapieco, A. C., Russo, R., Escalante, K., Geria, M., Lepori, N., Ayup, M. M., Muntaabski, I., Liendo, M. C., Landi, Lucas., Tugrul, G., y Monmany-Garzia, A. C. (2020). *Varroa destructor* parasitism and genetic variability at honey bee (*Apis mellifera*) drone congregation areas and their associations with environmental variables in Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 590345.

Garcia-Fernandez, P., Rodriguez, R. B., y Orantes-Bermejo, F. J. (1995). Influence du climat sur le développement de la population de *Varroa jacobsoni* Oud dans des colonies d'*Apis mellifera* iberica (Goetze) dans le sud de l'Espagne. *Apidologie*, 26(5), 371-380.

Garnery, L., Cornuet, J. M., y Solignac, M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular ecology*, 1(3), 145-154.

Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., y Cornuet, J. M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49, 1016-1021.

Garnery, L., Vautrin, D., Cornuet, J. M., y Solignac, M. (1991). Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*, 22(1), 87-92.

Garrido, C., Rosenkranz, P., Paxton, R. J., y Gonçalves, L. S. (2003). Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie*, 34(6), 535-541.

Genersch, E. (2010a). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S10-S19.

Genersch, E. (2010b). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 87-97.

Genersch, E., von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Muhlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., y Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3), 332-352.

Genersch, E., y Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary research*, 41(6).

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., y Merke, J. (2016). Varroa destructor and viruses association in honey bee colonies under different climatic conditions. *Environmental microbiology reports*, 8(3), 407-412.

Giacobino, A., Pacini, A., Molineri, A., Cagnolo, N. B., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., y Signorini, M. (2017). Environment or beekeeping management: What explains better the prevalence of honey bee colonies with high levels of *Varroa destructor*?. *Research in veterinary science*, 112, 1-6.

Giménez-Martínez, P., Ramirez, C., Mitton, G., Arcerito, F. M., Ramos, F., Cooley, H., Fuselli, S., y Maggi, M. (2022). Lethal concentrations of *Cymbopogon nardus* essential oils and their main component citronellal on *Varroa destructor* and *Apis mellifera*. *Experimental Parasitology*, 238, 108279.

Giray, T., Galindo-Cardona, A., y Oskay, D. (2007). Octopamine influences honey bee foraging preference. *Journal of insect physiology*, 53(7), 691-698.

Goulson, D., Lye, G. C., y Darvill, B. (2008). Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology*, 53, 191-208.

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., y Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957.

Grayton, H. M., Missler, M., Collier, D. A., y Fernandes, C. (2013). Altered social behaviours in neurexin 1 α knockout mice resemble core symptoms in neurodevelopmental disorders. *PLoS one*, 8(6), e67114.

Grindrod, I., y Martin, S. J. (2021). Parallel evolution of *Varroa* resistance in honey bees: a common mechanism across continents?. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1956), 20211375.

Grohmann, L., Blenau, W., Erber, J., Ebert, P. R., Strünker, T., y Baumann, A. (2003). Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Journal of neurochemistry*, 86(3), 725-735.

Grozinger, C. M., y Robinson, G. E. (2015). The power and promise of applying genomics to honey bee health. *Current opinion in insect science*, 10, 124-132.

Grüter, C., y Farina, W. M. (2009). The honeybee waggle dance: can we follow the steps?. *Trends in ecology y evolution*, 24(5), 242-247.

Guarna, M. M., Hoover, S. E., Huxter, E., Higo, H., Moon, K. M., Domanski, D., .Bixby M. E. F., Melathopoulos, A. P., Ibrahim, A., Peirson, M., Desai, S., Micholson, D., White, R., Borchers, C. H., Currie, R. W., Pernal, S. F., y Foster, L. J. (2017). Peptide biomarkers used for the selective breeding of a complex polygenic trait in honey bees. *Scientific reports*, 7(1), 8381.

Guichard, M., Neuditschko, M., Soland, G., Fried, P., Grandjean, M., Gerster, S., Dainat, B., Bijma, P., y Brascamp, E. W. (2020). Estimates of genetic parameters for production, behaviour, and health traits in two Swiss honey bee populations. *Apidologie*, 51, 876-891.

Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., MCGowan, J., Kelly, P. G., y 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.

Guzmán-Novoa, E., Emsen, B., Unger, P., Espinosa-Montaño, L. G., y Petukhova, T. (2012). Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of invertebrate pathology*, 110(3), 314-320.

Guzmán-Novoa, E., Vandame, R., y Arechavaleta, M. E. (1999). Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apidologie*, 30(2-3), 173-182.

H

Haberle, L., y Zarratea, A. (2014). Informe Internacional de la Miel-Quinquenio 2009-2013. Corrientes: Instituto de Fomento Empresarial. Recuperado de <http://www.mptt.gov.ar/site13/index.php/docum>.

Hall, H. G., y Smith, D. R. (1991). Distinguishing African and European honeybee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(10), 4548-4552.

Hammer, M., y Menzel, R. (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning y memory*, 5(1), 146-156.

Hammer, M. (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends in neurosciences*, 20(6), 245-252.

Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, 366(6450), 59-63.

Hamiduzzaman, M. M., Sinia, A., Guzman-Novoa, E., y Goodwin, P. H. (2012). Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of invertebrate pathology*, 111(3), 237-243.

Hamiduzzaman, M. M., Emsen, B., Hunt, G. J., Subramanyam, S., Williams, C. E., Tsuruda, J. M., y Guzman-Novoa, E. (2017). Differential gene expression associated with honey bee grooming behavior in response to *Varroa* mites. *Behavior genetics*, 47, 335-344.

Hampel, S., McKellar, C. E., Simpson, J. H., y Seeds, A. M. (2017). Simultaneous activation of parallel sensory pathways promotes a grooming sequence in *Drosophila*. *Elife*, 6, e28804.

Han, F., Wallberg, A., y Webster, M. T. (2012). From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate?. *Ecology and evolution*, 2(8), 1949-1957.

Harbo, J. R., & Harris, J. W. (2005). Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *Journal of Apicultural research*, 44(1), 21-23.

Harris, J. W. (2007). Bees with *Varroa* Sensitive Hygiene preferentially remove mite infested pupae aged ≤ five days post capping. *Journal of Apicultural Research*, 46(3), 134-139.

Harris, J. W., Danka, R. G., y Villa, J. D. (2010). Honey bees (Hymenoptera: Apidae) with the trait of *Varroa* sensitive hygiene remove brood with all reproductive stages of *Varroa* mites (Mesostigmata: Varroidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 103(2), 146-152.

Harris, J. W., y Woodring, J. (1992). Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. *Journal of Insect Physiology*, 38(1), 29-35.

Hartmann, U., Forsgren, E., Charrière, J. D., Neumann, P., y Gauthier, L. (2015). Dynamics of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) infections in honey bees and relationships with other parasites. *Viruses*, 7(5), 2654-2667.

Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page Jr, R. E., y Beye, M. (2001). Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insect molecular biology*, 10(6), 605-608.

Häußermann, C. K., Giacobino, A., Munz, R., Ziegelmann, B., Palacio, M. A., y Rosenkranz, P. (2020). Reproductive parameters of female *Varroa destructor* and the impact of mating in worker brood of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 51, 342-355.

Haydak, M. H. (1945). The language of the honeybees. *American Bee Journal*, 85, 316-317.

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., y Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), 1-14.

Hernández-Rodríguez, C. S., Marín, Ó., Calatayud, F., Mahiques, M. J., Mompó, A., Segura, I., Simó, E., y González-Cabrera, J. (2021). Large-scale monitoring of resistance to coumaphos, amitraz, and pyrethroids in *Varroa destructor*. *Insects*, 12(1), 27.

Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., García Palencia, P., y Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental microbiology*, 10(10), 2659-2669.

Hillyer, J. F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental y Comparative Immunology*, 58, 102-118.

Hoshiba, H., y Kusanagi, A. (1978). Karyological study of honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 17(3), 105-109.

Hu, Z., Miao, C., Di, N., Zhou, C., Zhang, Y., Yang, J., Xun, L., y Li, Y. (2023). Decoding the dance parameters of eastern honeybee, *Apis cerana*. *Apidologie*, 54(1), 10.

Hu, J., Shibata, Y., Zhu, P. P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W. A., Rapoport, T. A., y Blackstone, C. (2009). A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell*, 138(3), 549-561.

Hunt, G., Given, J. K., Tsuruda, J. M., y Andino, G. K. (2016). Breeding mite-biting bees to control *Varroa*. *Bee Culture*, 8, 41-47.

I

Ibacache Chía, A. P. (2018). Caracterización del rol de atlastina y sus modificadores genéticos en la unión neuromuscular y axones motores de adultos de *Drosophila melanogaster*.

Ibrahim, A., y Spivak, M. (2006). The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie*, 37(1), 31-40.

Ifantidis, M.D. (1990) Re-examination of some parameters concerning reproduction of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology*, Ghent, Belgium, pp. 20-26

Iglesias, A. E., Fuentes, G., Mitton, G., Ramos, F., Brasesco, C., Manzo, R., Orallo, D., Gende, L., Eguaras, M., Ramirez, C., Fanovich, A., y Maggi, M. (2022). Hydrolats from *Humulus lupulus* and Their Potential Activity as an Organic Control for *Varroa destructor*. *Plants*, 11(23), 3329.

Iglesias, A., Mitton, G., Szawarski, N., Cooley, H., Ramos, F., Arcerito, F. M., Brasesco, C., Ramirez, C., Gende, L., Eguaras, M., Fanovich, A., y Maggi, M. (2020). Essential oils from *Humulus lupulus* as novel control agents against *Varroa destructor*. *Industrial Crops and Products*, 158, 113043.

Invernizzi, C., Zefferino, I., Santos, E., Sánchez, L., y Mendoza, Y. (2016). Multilevel assessment of grooming behavior against *Varroa destructor* in Italian and Africanized honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 321-327.

Invernizzi, C. (2001). Resistencia a la enfermedad de cría yesificada por colonias de *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higiénico (Hymenoptera, Apidae). *Iheringia. Série Zoologia*, 108-114.

J

Jander, R. (1976). Grooming and pollen manipulation in bees (Apoidea): the nature and evolution of movements involving the foreleg. *Physiological Entomology*, 1(3), 179-194.

Jandt, J. M., Bengston, S., Pinter-Wollman, N., Pruitt, J. N., Raine, N. E., Dornhaus, A., y Sih, A. (2014). Behavioural syndromes and social insects: personality at multiple levels. *Biological Reviews*, 89(1), 48-67.

Jean-Prost, P., y Médori, P. (1994). *Apiculture: know the bee, manage the apiary* (No. Ed. 6). Intercept Limited.

Jean-Prost, P. (1987). *Apiculture; connaitre l'abeille, conduire le rucher*.

Jiang, S., Robertson, T., Mostajeran, M., Robertson, A. J., y Qiu, X. (2016). Differential gene expression of two extreme honey bee (*Apis mellifera*) colonies showing *Varroa* tolerance and susceptibility. *Insect molecular biology*, 25(3), 272-282.

Johnson, B. R., y Linksvayer, T. A. (2010). Deconstructing the superorganism: social physiology, groundplans, and sociogenomics. *The Quarterly Review of Biology*, 85(1), 57-79.

K

Kanbar, G., y Engels, W. J. P. R. (2003). Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology research*, 90, 349-354.

Parker, J., Bondy, B., Prilutsky, B. I., y Cymbalyuk, G. (2018). Control of transitions between locomotor-like and paw shake-like rhythms in a model of a multistable central pattern generator. *Journal of neurophysiology*, 120(3), 1074-1089.

Keeling, C. I., Slessor, K. N., Higo, H. A., y Winston, M. L. (2003). New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4486-4491.

Kendler, K. S., y Greenspan, R. J. (2006). The nature of genetic influences on behavior: Lessons from "simpler" organisms. *American Journal of Psychiatry*, 163(10), 1683-1694.

Kerr, W. E. (1957). Introdução de abelhas africanas no Brasil. *Brasil Apícola*, 3(5), 211-213.

Kerr, W. E., Del Rio, S. D. L., y Barrionuevo, M. D. (1982). The southern limits of the distribution of the Africanized honeybee in South America [*Apis mellifera adansonii*]. *American Bee Journal*.

Kerr, W. E., Gonçalves, L. S., Blotta, L. F., y Maciel, H. B. (1970). Biologia comparada entre as abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*) africana (*Apis mellifera adansonii*) e suas híbridas. In *Congresso Brasileiro de Apicultura* (Vol. 1, pp. 151-185).

Kirrane, M. J., De Guzman, L. I., Whelan, P. M., Frake, A. M., y Rinderer, T. E. (2018). Evaluations of the removal of *Varroa destructor* in Russian honey bee colonies that display different levels of Varroa sensitive hygienic activities. *Journal of insect behavior*, 31, 283-297.

Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., y Tscharrntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303-313.

Kocher, S. D., Mallarino, R., Rubin, B. E., Yu, D. W., Hoekstra, H. E., y Pierce, N. E. (2018). The genetic basis of a social polymorphism in halictid bees. *Nature Communications*, 9(1), 4338.

Koeniger, N., y Koeniger, G. (2000). Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. *Apidologie*, 31(2), 313-339.

Koleoglu, G., Goodwin, P. H., Reyes-Quintana, M., Hamiduzzaman, M. M., y Guzman-Novoa, E. (2017). Effect of *Varroa destructor*, wounding and Varroa homogenate on gene expression in brood and adult honey bees. *PloS one*, 12(1), e0169669.

Kolmes, S. A. (1989). Grooming specialists among worker honey bees, *Apis mellifera*. *Animal behaviour*.

Krebs, J. R., Davies, N. B., Ramalho, M., y Machado, C. P. (1996). *Introdução à ecologia comportamental*. Atheneu Editora.

Kruitwagen, A., van Langevelde, F., van Dooremalen, C., y Blacquièrre, T. (2017). Naturally selected honey bee (*Apis mellifera*) colonies resistant to *Varroa destructor* do not groom more intensively. *Journal of Apicultural Research*, 56(4), 354-365.

Kutsukake, M., Komatsu, A., Yamamoto, D., y Ishiwa-Chigusa, S. (2000). A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 245(1), 31-42.

L

Land, B. B., y Seeley, T. D. (2004). The grooming invitation dance of the honey bee. *Ethology*, 110(1), 1-10.

Laomettachit, T., Liangruksa, M., Termsaithong, T., Tangthanawatsakul, A., y Duangphakdee, O. (2021). A model of infection in honeybee colonies with social immunity. *PloS one*, 16(2), e0247294.

Le Conte, Y., De Vaublanc, G., Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J. C., y Bécard, J. M. (2007). Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie*, 38(6), 566-572.

Le Conte, Y., Ellis, M., y Ritter, W. (2010). Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41(3), 353-363.

Le Conte, Y., Huang, Z. Y., Roux, M., Zeng, Z. J., Christidès, J. P., y Bagnères, A. G. (2015). *Varroa destructor* changes its cuticular hydrocarbons to mimic new hosts. *Biology letters*, 11(6), 20150233.

Le Conte, Y., Meixner, M. D., Brandt, A., Carreck, N. L., Costa, C., Mondet, F., y Büchler, R. (2020). Geographical distribution and selection of European honey bees resistant to *Varroa destructor*. *Insects*, 11(12), 873.

Le Conte, Y., y Navajas, M. (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 27(2), 499-510.

Leclercq, G., Francis, F., Gengler, N., y Blacquièrre, T. (2018). Bioassays to quantify hygienic behavior in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies: a review. *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 663-673.

- Lecocq, A., Jensen, A. B., Kryger, P., y Nieh, J. C. (2016). Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Lemanski, N. J., Cook, C. N., Ozturk, C., Smith, B. H., y Pinter-Wollman, N. (2021). The effect of individual learning on collective foraging in honey bees in differently structured landscapes. *Animal Behaviour*, 179, 113-123.
- Levin, S., Galbraith, D., Sela, N., Erez, T., Grozinger, C. M., y Chejanovsky, N. (2017). Presence of *Apis rhabdovirus-1* in populations of pollinators and their parasites from two continents. *Frontiers in microbiology*, 8, 2482.
- Li, A. Y., Cook, S. C., Sonenshine, D. E., Posada-Florez, F., Noble, N. I., Mowery, J., Gulbranson, C. J., y Bauchan, G. R.. (2019). Insights into the feeding behaviors and biomechanics of *Varroa destructor* mites on honey bee pupae using electropenetrography and histology. *Journal of Insect Physiology*, 119, 103950.
- Linksvayer, T. A. (2015). The molecular and evolutionary genetic implications of being truly social for the social insects. In *Advances in insect physiology* (Vol. 48, pp. 271-292). Academic Press.
- Linn Jr, C. E., Poole, K. R., y Roelofs, W. L. (1994). Studies on biogenic amines and metabolites in nervous tissue and hemolymph of male cabbage looper moths—III. Fate of injected octopamine, 5-hydroxytryptamine and dopamine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 108(1), 99-106.
- Lindauer, M. (1952). Contribution to the question of division of labour in the honeybee colony. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 34, 299-345.
- Lipsitch, M., Siller, S., y Nowak, M. A. (1996). The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution*, 50(5), 1729-1741.
- Lobo Segura, J. A. (2000). Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica. *Genetics and Molecular Biology*, 23(2), 317-322.
- Locke, B. (2016). Inheritance of reduced *Varroa* mite reproductive success in reciprocal crosses of mite-resistant and mite-susceptible honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 47(4), 583-588.
- Locke, B., y Fries, I. (2011). Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie*, 42(4), 533-542.
- Lodesani, M., Colombo, M., y Spreafico, M. (1995). Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*, 26(1), 67-72.
- Lodesani, M., Vecchi, M. A., Tommasini, S., and Bigliardi, M. (1996). A study on different kinds of damage to *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* ligustica colonies. *Journal of Apicultural Research*. 35, 49–56.
- Lotfi, A., Jamshidi, R., Aghdam Shahryar, H., y Yousefkhani, M. (2009). The prevalence of nosemosis in honey bee colonies in Arasbaran region (Northwestern Iran). *American-Eurasian Journal of Agricultural y Environmental Sciences*, 5(2), 255-257.
- Lowther, C., Speevak, M., Armour, C. M., Goh, E. S., Graham, G. E., Li, C., Zeesman, S., Norwaczyk M. J. M., Schultz, L. A., Morra, A., Nicolson, R., Bilangaga, P., Samdup, D., Zaazuou, M., Boyd, K., Jung, J. h., Siu, V., Rajguru, M., Gobbie, S., tarnopolsky, M., Prasad, C., Dick, P. T., Hussain, A. S., Walinga, M., Reijenga, R.G., Gazzellone, Lionel, A.C., Marshall, C.R., Scherer, S. W., Stavropoulos, McCreedy, E., y Bassett, A. S. (2017). Molecular characterization of NRXN1 deletions from 19,263 clinical microarray cases identifies exons important for neurodevelopmental disease expression. *Genetics in Medicine*, 19(1), 53-61.

M

- Macri, I. N., Vázquez, D. E., Pagano, E. A., Zavala, J. A., y Farina, W. M. (2021). Evaluating the impact of post-emergence weed control in honeybee colonies located in different agricultural surroundings. *Insects*, 12(2), 163.
- Maggi, M. D., Ruffinengo, S. R., Damiani, N., Sardella, N. H., y Eguaras, M. J. (2009). First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*, 47(4), 317-320.
- Maggi, M. D., Ruffinengo, S. R., Negri, P., y Eguaras, M. J. (2010). Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitology research*, 107(5), 1189-1192.
- Maggi, M., Medici, S., Quintana, S., Ruffinengo, S., Marcángeli, J., Gimenez Martinez, P., Fuselli, S., y Eguaras, M. (2012). Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*, 56(4), 309-318.
- Maggi, M., Tourn, E., Negri, P., Szawarski, N., Marconi, A., Gallez, L., Medici, S., Ruffinengo, S., Brasesco, C., De Feudis, L., Quintana, S., Sammataro, D., y Eguaras, M. (2016). A new formulation of oxalic acid for *Varroa destructor* control applied in *Apis mellifera* colonies in the presence of brood. *Apidologie*, 47(4), 596-605.
- Magrach, A., González-Varo, J. P., Boiffier, M., Vilà, M., y Bartomeus, I. (2017). Honeybee spillover reshuffles pollinator diets and affects plant reproductive success. *Nature Ecology y Evolution*, 1(9), 1299-1307.
- Magrach, A., Molina, F. P., y Bartomeus, I. (2021). Niche complementarity among pollinators increases community-level plant reproductive success. *Peer Community Journal*, 1.
- MAGYP. (2021). Estimaciones Agrícolas. Subsecretaria de Agricultura, Dirección Nacional de Agricultura, Dirección de Estimaciones Agrícolas.
- Manjon, C., Troczka, B. J., Zaworra, M., Beadle, K., Randall, E., Hertlein, G., Singh, K. S., Zimmer, C. T., Homem, R. A., Lueke, B., Reid, R., Kor, L., Kohler, M., Benting, J., Williamson, M. S., Emyr Davies, T. G., Field, L. M., Bass, C., y Nauen, R. (2018). Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Current biology*, 28(7), 1137-1143.
- Mao, W., Schuler, M. A., y Berenbaum, M. R. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12657-12662.
- Marder, E., Bucher, D., Schulz, D. J., y Taylor, A. L. (2005). Invertebrate central pattern generation moves along. *Current Biology*, 15(17), R685-R699.
- Marder, E., y Bucher, D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current biology*, 11(23), R986-R996.
- Mariani, F., Maggi, M., Porrini, M., Fuselli, S., Caraballo, G., Brasesco, C., Barrios, C., Principal, J., y Eguaras, M. (2012). Parasitic interactions between *Nosema spp.* and *Varroa destructor* in *Apis mellifera* colonies. *Zootecnia Tropical*, 30(1), 081-090.
- Marín-García, P. J., Peyre, Y., Ahuir-Baraja, A. E., Garijo, M. M., y Llobat, L. (2022). The Role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in Honey Bee Colony Losses and Current Insights on Treatment. *Veterinary Sciences*, 9(3), 130.
- Martin, J. R., Ernst, R., y Heisenberg, M. (1998). Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learning y Memory*, 5(1), 179-191.
- Martin, S. J. (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental y applied acarology*, 18(2), 87-100.

- Martin, S. J., y Medina, L. M. (2004). Africanized honeybees have unique tolerance to *Varroa* mites. *Trends in Parasitology*, 20(3), 112-114.
- Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., Nikaido, S., y Schroeder, D. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086), 1304-1306.
- Martínez Fhürer, C., y López, G. (2018). El uso de acaricidas orgánicos como estrategia para el control de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Mather, J. A., y Alupay, J. S. (2016). An ethogram for Benthic Octopods (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Comparative Psychology*, 130(2), 109.
- McDonnell, C. M., Alaux, C., Parrinello, H., Desvignes, J. P., Crauser, D., Durbesson, E., Beslay, D., y Le Conte, Y. (2013). Ecto-and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC ecology*, 13(1), 1-15.
- Medici, S. K., Maggi, M. D., Sarlo, E. G., Ruffinengo, S., Marioli, J. M., y Eguaras, M. J. (2015). The presence of synthetic acaricides in beeswax and its influence on the development of resistance in *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, 54(3), 267-274.
- Meixner, M. D., Francis, R. M., Gajda, A., Kryger, P., Andonov, S., Uzunov, A., Topolska, G., Costa, C., Amiri, E., Berg, S., Bienkowska, M., Bouga, M., Büchler, R., Dyrba, W., Gurgulova, K., Hatjina, F., Ivanova, E., Janes, M., Kezic, N., Korpela, S., Le Conte, Y., Panasiuk, B., Pechhacker, H., Tsoktouridis, G., Vaccar, G., y Wilde, J. (2014). Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. *Journal of Apicultural Research*. 53, 215–229.
- Mendoza, Y., Tomasco, I. H., Antúnez, K., Castelli, L., Branchiccela, B., Santos, E., y Invernizzi, C. (2020). Unraveling honey bee–*Varroa destructor* interaction: Multiple factors involved in differential resistance between two Uruguayan populations. *Veterinary sciences*, 7(3), 116.
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology*, 185(4), 323-340.
- Merke, J., Rodriguez, G., Lanzavecchia, S. B, Carcia Paoloni, S., Pietronave, H., Fain, H., Agra, M., Martinez, A., Camacho, B., Figini, E., Scannapieco, A., Fondevila, N., Palacio, M. A. (2014). Red Nacional de Apiarios de Tolerancia en Argentina. XI Congreso Latinoamericano de Apicultura (Puerto Iguazú, Provincia de Misiones, Argentina).
- Merke, J. (2016). Dinámica poblacional de *Varroa destructor* y *Apis mellifera* L. como herramienta para la selección de abejas tolerantes (Doctoral dissertation, PhD thesis, Universidad Nacional de Mar del Plata).
- Merke, J.; Scannapieco, A.; Agra, M.; Martinez, A; Aignasse, A; Lanzavecchia, S.; Rodriguez, G; Figini, E; Palacio, M.A. 2017. Red de evaluación de tolerancia a Varroosis (MeGA-PROAPI). <https://inta.gov.ar/documentos/red-de-evaluacion-de-tolerancia-a-varroosis-mega-proapi>
- Micholson, D. (2022). Understanding the mechanisms of honey bee (*Apis mellifera* L.) grooming behaviour in relation to its effectiveness as a defence against *Varroa destructor* (Master's thesis).
- Milum, V. G. 1955: Honey bee communication. *American Bee Journal*. 95, 97— 104.
- Missler, M., y Südhof, T. C. (1998). Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends in Genetics*, 14(1), 20-26.
- Mitton, G. A., Meroi Arcerito, F., Cooley, H., Fernández de Landa, G., Eguaras, M. J., Ruffinengo, S. R., y Maggi, M. D. (2022). More than sixty years living with *Varroa destructor*: a review of acaricide resistance. *International Journal of Pest Management*, 1-18.
- Mondet F, Alaux C, Severac D, Rohmer M, Mercer A, Le Conte Y (2015) Antennae hold a key to *Varroa* sensitive hygiene behaviour in honey bees. *Sci Rep* 5:10454.

Mondet, F., Beaufrepaire, A., McAfee, A., Locke, B., Alaux, C., Blanchard, S., Danka, B., y Le Conte, Y. (2020). Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal for Parasitology*, 50(6-7), 433-447.

Mondragón, L., Spivak, M., y Vandame, R. (2005). A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Apidologie*, 36(3), 345-358.

Montiel, J. C., y Piola, G. A. (1976). A new enemy of bees. varroosis, a honey bee disease. Apimondia Publishing House, Bucharest, 36-38.

Moore, D., Angel, J. E., Cheeseman, I. M., Robinson, G. E., y Fahrbach, S. E. (1995). A highly specialized social grooming honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of insect behavior*.

Moosbeckhofer, R. (1997). Observations on reproduction rate of *Varroa jacobsoni* and the occurrence of mutilated mites in *Apis mellifera carnica* colonies. *Apidologie* 28, 193–195.

Moretto, G., Goncalves, L. S., y Jong, D. D. (1997). Relationship between food availability and the reproductive ability of the mite *Varroa jacobsoni* in Africanized bee colonies. *American Bee Journal*.

Moretto, G., Gonçalves, L.S. and De Jong, D. (1993). Heritability of Africanized and European honeybee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. *Revista Brasileira de Genetica*, 16(1), 71-77.

Moretto, G., Gonçalves, L. S., y Jong, D. D. (1991). Africanized bees are more efficient at removing *Varroa jacobsoni*: Preliminary data. *American Bee Journal* (USA).

Morfin, N., Espinosa-Montaño, L. G., y Guzman-Novoa, E. (2020). A direct assay to assess self-grooming behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 51, 892-897.

Morfin, N., Given, K., Evans, M., Guzman-Novoa, E., y Hunt, G. J. (2020). Grooming behavior and gene expression of the Indiana “mite-biter” honey bee stock. *Apidologie*, 51, 267-275.

Morse, R. A., Miksa, D., and Masenheimer, J. A. (1991). Varroa resistance in US honey bees. *American Bee Journal*. 131, 433–434

Muñoz, I., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Meana, A., Higes, M., y De la Rúa, P. (2008). Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies. *Journal of apicultural research*, 47(4), 310-313.

Munoz-Torres, M. C., Reese, J. T., Childers, C. P., Bennett, A. K., Sundaram, J. P., Childs, K. L., Anzola, J. M., Milshina, N., y Elisk, C. G. (2010). Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic acids research*, 39(suppl_1), D658-D662.

Murilhas, A. M. (2002). *Varroa destructor* infestation impact on *Apis mellifera carnica* capped worker brood production, bee population and honey storage in a Mediterranean climate. *Apidologie*, 33(3), 271-281.

N

Nagaya, Y., Kutsukake, M., Chigusa, S. I., y Komatsu, A. (2002). A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience letters*, 329(3), 324-328.

Naug, D. (2008). Structure of the social network and its influence on transmission dynamics in a honeybee colony. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(11), 1719-1725.

Naug, D., y Camazine, S. (2002). The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *Journal of theoretical Biology*, 215(4), 427-439.

Navajas, M., Anderson, D. L., De Guzman, L. I., Huang, Z. Y., Clement, J., Zhou, T., y Le Conte, Y. (2010). New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie*, 41(2), 181-193.

Navajas, M., Migeon, A., Alaux, C., Martin-Magniette, M. L., Robinson, G. E., Evans, J. D., Cros-Arteil, S., Crauser, D., y Le Conte, Y. (2008). Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC genomics*, 9, 1-11.

Nazzi, F., y 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.

Neumann, P., Yañez, O., Fries, I., y de Miranda, J. R. (2012). *Varroa* invasion and virus adaptation. *Trends in parasitology*, 28(9), 353-354.

Newton, D. C., y Ostasiewski Jr, N. J. (1986). A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees. *American Bee Journal*. 1986; 126:278–81.

Nganso, B. T., Fombong, A. T., Yusuf, A. A., Pirk, C. W., Stuhl, C., and Torto, B. (2017). Hygienic and grooming behaviors in African and European honeybees New damage categories in *Varroa destructor*. *PLoS One* 12: e0179329.

Noël, A., Le Conte, Y., y Mondet, F. (2020). *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it?. *Emerging Topics in Life Sciences*, 4(1), 45-57.

Núñez, J. A. (1982). Honeybee foraging strategies at a food source in relation to its distance from the hive and the rate of sugar flow. *Journal of Apicultural Research*, 21(3), 139-150.

O

O'Sullivan, N.C., Dräger, N. y O'Kane, C.J., 2013. Characterization of the *Drosophila* Atlastin Interactome Reveals VCP as a Functionally Related Interactor. *Journal of Genetics and Genomics*, 40, pp.297–306.

Oddie, M., Büchler, R., Dahle, B., Kovacic, M., Le Conte, Y., Locke, B., De Miranda, J. R., Mondet, F., y Neumann, P. (2018). Rapid parallel evolution overcomes global honey bee parasite. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.

Oldroyd BP, Rinderer TE, Bucu SM, Beaman LD (1993) Genetic variance in honey bees for preferred foraging distance. *Animal Behaviour*, 45:323–332

Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology y Evolution*, 14(8), 312-315.

Oldroyd, B. P., Rinderer, T. E., Harbo, J. R., y Bucu, S. M. (1992). Effects of intracolony genetic diversity on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony performance. *Annals of the Entomological Society of America*, 85(3), 335-343.

Orantes Bermejo, F., Garcia Fernandez, P., y Benitez Rodriguez, R. (1994). Population change of *Varroa* in bee colonies in Southern Spain. *Vida Apicola (España)*.

Ortiz Lira, G. (2016). Rastreo de genes implicados en las paraplejias espásticas hereditarias asociadas a atlastina en *Drosophila melanogaster*. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/146978>

Oudemans, A. C. (1904). On a new genus and species of parasitic acari. *Notes from the Leyden Museum*, 24(4), 216-222.

- Page Jr, R. E., Fondrk, M. K., Hunt, G. J., Guzman-Novoa, E., Humphries, M. A., Nguyen, K., y Greene, A. S. (2000). Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *Journal of Heredity*, 91(6), 474-479.
- Page R.E., Robinson G.E. (1991). The genetics of division of labour in honey bee colonies. *Advance Insect Physiology*. 23:118–169.
- Palacio, A. y Bedascarrasbure, E. (1998). Orígenes de las abejas. *Revista Super Campo*, 4(45): 23-24.
- Palacio, M. A., Figini, E. E., Ruffinengo, S. R., Rodriguez, E. M., del Hoyo, M. L., and Bedascarrasbure, E. L. (2000). Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* 31, 471–478.
- Palacio, M. A., Rodriguez, E., Goncalves, L., Bedascarrasbure, E., y Spivak, M. (2010). Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. *Apidologie*, 41(6), 602-612.
- Panasiuk B, Skowronek W, Bieńkowska M, Gerula D, Węgrzynowicz P (2010) Age of worker bees performing hygienic behaviour in honeybee colony. *Journal of Apicultural Science*, 54:109–115.
- Panini, M., Reguzzi, M. C., Chiesa, O., Cominelli, F., Lupi, D., Moores, G., y Mazzoni, E. (2019). Pyrethroid resistance in Italian populations of the mite *Varroa destructor*: a focus on the Lombardy region. *Bulletin of Insectology*, 72(2), 227-232
- Panziera, D., van Langevelde, F., y Blacquièrre, T. (2017). *Varroa* sensitive hygiene contributes to naturally selected *varroa* resistance in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 635-642.
- Parra, G. N. (2011). GENÉTICA DEL COMPORTAMIENTO: ABEJAS, un ejemplo. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 213-230.
- Pawar, S., Ungricht, R., Tiefenboeck, P., Leroux, J. C., y Kutay, U. (2017). Efficient protein targeting to the inner nuclear membrane requires Atlantin-dependent maintenance of ER topology. *Elife*, 6, e28202.
- Peng YS (1988) The resistance mechanism of the Asian honey bee *Apis cerana* to the mite *Varroa jacobsoni*. In: Africanized Honeybees and Bee Mites. (Needham GR, Page RE, elfinado-Baker M, Bowman CE, ed) Ellis Horwood, Chichester, 426-429
- Peng, Y. S., Fang, Y., Xu, S., y Ge, L. (1987). The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49(1), 54-60.
- Pernal, S. F., Baird, D. S., Birmingham, A. L., Higo, H. A., Slessor, K. N., y Winston, M. L. (2005). Semiochemicals influencing the host-finding behaviour of *Varroa destructor*. *Experimentally Applied Acarology*, 37(1), 1-26.
- Pettis, J. S. (2004). A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie*, 35(1), 91-92.
- Pettis, J. S., y Pankiw, T. (1998). Grooming behavior by *Apis mellifera* L. in the presence of *Acarapis woodi* (Rennie)(Acari: Tarsonemidae). *Apidologie*, 29(3), 241-253.
- Pfaffl, M. W., Lange, I. G., Daxenberger, A., y Meyer, H. H. D. (2001). Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): Quantification of ER α and ER β mRNA with real-time RT-PCR. *Apmis*, 109(S103), S540-S550.

Porrini, L. P., Quintana, S., Brasesco, C., Porrini, M. P., Garrido, P. M., Eguaras, M. J., Müller, F. y Iriarte, P. F. (2020). Southern limit of Africanized honey bees in Argentina inferred by mtDNA and wing geometric morphometric analysis. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 648-657.

Posada-Florez, F., Childers, A. K., Heerman, M. C., Egekwu, N. I., Cook, S. C., Chen, Y., Evans, J. D., y Ryabov, E. V. (2019). Deformed wing virus type A, a major honey bee pathogen, is vectored by the mite *Varroa destructor* in a non-propagative manner. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., y Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology y evolution*, 25(6), 345-353.

Poulin, R. (2007). The structure of parasite communities in fish hosts: ecology meets geography and climate. *Parassitologia*, 49(3), 169.

Premrov Bajuk, B., Babnik, K., Snoj, T., Milčinski, L., Pislak Ocepek, M., Škof, M., Jenčič, V., Filazi, A., Štajnbaher., D., y Kobal, S. (2017). Coumaphos residues in honey, bee brood, and beeswax after *Varroa* treatment. *Apidologie*, 48(5), 588-598.

Pritchard, D. J. (2016). Grooming by honey bees as a component of varroa resistant behavior. *Journal of Apicultural Research*, 55(1), 38-48.

R

Råberg, L., Sim, D., y Read, A. F. (2007). Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science*, 318(5851), 812-814.

Ramirez, W. C. G., Thomas, N. K., Muktar, I. J., y Riabinina, O. (2023). The neuroecology of olfaction in bees. *Current Opinion in Insect Science*, 101018.

Rath, W., y Drescher, W. (1990). Response of *Apis cerana* Fabr towards brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie*, 21(4), 311-321.

Reams, T., y Rangel, J. (2022). Understanding the Enemy: A Review of the Genetics, Behavior and Chemical Ecology of *Varroa destructor*, the Parasitic Mite of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 22(1), 18.

Rehm, S. M., y Ritter, W. (1989). Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie*, 20(4), 339-343.

Remnant, E. J., Shi, M., Buchmann, G., Blacquièrre, T., Holmes, E. C., Beekman, M., y Ashe, A. (2017). A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *Journal of virology*, 91(16), e00158-17.

Richards, E. H., Jones, B., y Bowman, A. (2011). Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology*, 138(5), 602-608.

Ridgel, A.L., Ritzmann, R.E., 2005. Effects of neck and circumoesopha-geal connective lesions on posture and locomotion in the cockroach. *Journal of Comparative Physiology*, 191A, 559–573

Rinderer, T. E., de Guzman, L. I., Delatte, G. T., Stelzer, J. A., Lancaster, V. A., Kuznetsov, V., Beaman, L., Watts, R. y Harris, J. W. (2001). Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees from far-eastern Russia. *Apidologie*, 32(4), 381-394.

Rinkevich, F. D. (2020). Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the Varroa Mite, *Varroa destructor*, within commercial beekeeping operations. *PloS one*, 15(1), e0227264.

- Rivera-Marchand, B., Oskay, D., y Giray, T. (2012). Gentle Africanized bees on an oceanic island. *Evolutionary applications*, 5(7), 746-756.
- Robinson GE, Page RE (1989) Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 24:317–323
- Robinson, G. E. (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 637-665.
- Robinson, G. E., y Page Jr, R. E. (1988). Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature*, 333(6171), 356-358.
- Robinson, G.E., Heuser, L.M., Le Conte, Y., Lenquette, F., Hollingworth, R.M., 1999. Neurochemicals aid bee nestmate recognition. *Nature*, 399, 534–535.
- Roeder, T., Seifert, M., Kähler, C., y Gewecke, M. (2003). Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 54(1), 1-13.
- Rosenkranz, P. (1999). Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie*, 30(2-3), 159-172.
- Rosenkranz, P., y Engels, W. (1994). Infertility of *Varroa jacobsoni* females after invasion into *Apis mellifera* worker brood as a tolerance factor against varroaosis. *Apidologie*, 25(4), 402-411.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., y Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S96-S119.
- Rosenkranz, P., Fries, I., Boecking, O., y Stürmer, M. (1997). Damaged *Varroa* mites in the debris of honey bee (*Apis mellifera* L) colonies with and without hatching brood. *Apidologie*, 28(6), 427-437.
- Rosenkranz, P., Kirsch, R., y Renz, R. (2006). Population dynamics of honey bee colonies and *Varroa* tolerance: a comparison between Uruguay and Germany In: Santana, Lobo, Hartfelder. *Proceedings 7th Encontro Sobre Abelhas*, USP, Ribeirão Preto, Brazil.
- Rothenbuhler, W. C. (1964). Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F 1 and backcross generations to disease-killed brood. *American Zoologist*, 4(2), 111-123.
- Rozen Jr, J. G. (1991). Evolution of cleptoparasitism in anthophorid bees as revealed by their mode of parasitism and first instars (Hymenoptera, Apoidea). *American Museum Novitates*; no. 3029
- Ruffinengo, S. (2010). Actividad Biológica de Aceites Esenciales sobre el Ácaro Parásito *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Ruffinengo, S. R., Maggi, M. D., Marcangeli, J. A., Eguaras, M. J., Principal, J., Barrios, C., de Piano, F. G., y Mitton, G. (2014). Integrated Pest Management to control *Varroa destructor* and its implications to *Apis mellifera* colonies. *Zootecnia Tropical*, 32(2), 149-168.
- Russo, R. M., Merke, J., Landi, L., Pietronave, H., Fain, H., Liendo, M. C., Scannapieco, A. C. (2018). The Grooming Behavior as a *Varroa*-Tolerance Mechanism in *Apis mellifera* Colonies from Argentina. *Guarujá: IUSSI*.
- Ruttner, F. (1988). Morphometric Analysis and Classification. In *Biogeography and Taxonomy of Honeybees* (pp. 66-78). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ruttner, F. (1992). *Naturgeschichte der Honigbienen*, Ehrenwirth Verlag, München.

Ruttner, F., y Hänel, H. (1992). Active defense against Varroa mites in a Carniolan strain of honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie*, 23(2), 173-187.

S

Sachs, B. D. (1988). The development of grooming and its expression in adult animals. *Annals of the New York Academy of Sciences journal*, 525(1), 1-17.

Salina, M. D., Garcia, M. L. G., Bais, B., Bravi, M. E., Brasesco, C., Maggi, M., Pecoraro, M., Larsen, A., Sguazza, H. G., y Reynaldi, F.J. (2021). Viruses that affect Argentinian honey bees (*Apis mellifera*). *Archives of Virology*, 166(6), 1533-1545.

Salizzi, E. (2014). Reestructuración económica y transformaciones en el agro pampeano: la expansión del cultivo de la soja y sus efectos sobre la apicultura bonaerense en los inicios del siglo XXI. *Estudios Socioterritoriales*, 16(1), 0-0.

Salvy, M., Martin, C., Bagnères, A. G., Provost, E., Roux, M., Le Conte, Y., y Clement, J. L. (2001). Modifications of the cuticular hydrocarbon profile of *Apis mellifera* worker bees in the presence of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in brood cells. *Parasitology*, 122(2), 145-159.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sammataro, D., Gerson, U., y Needham, G. (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annual review of entomology*, 45(1), 519-548.

Sammataro, D., Untalan, P., Guerrero, F., y Finley, J. (2005). The resistance of varroa mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology*, 31(1), 67-74.

Sánchez, C., Castignani, H., y Rabaglio, M. D. (2018). El mercado apícola internacional. <https://inta.gob.ar/documentos/el-mercado-apicola-internacional>

Santillán-Galicia, M. T., Ball, B. V., Clark, S. J., y Alderson, P. G. (2010). Transmission of deformed wing virus and slow paralysis virus to adult bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. *Journal of apicultural research*, 49(2), 141-148.

Santis, L. D., y Cornejo, L. G. (1968). La abeja africana *Apis adansonii* en América del Sur. *Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de La Plata (Argentina)*, 44(1), 17-35.

Savard, J., Tautz, D., Richards, S., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Werren, J. H., Tettelin, H. y Lercher, M. J. (2006). Phylogenomic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of Holometabolous insects. *Genome research*, 16(11), 1334-1338.

Scannapieco, A. C., Lanzavecchia, S. B., Parreño, M. A., Liendo, M. C., Cladera, J. L., Spivak, M., y Palacio, M. A. (2016). Individual precocity, temporal persistence and taskspecialization of hygienic bees from selected colonies of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Science*, 60(1), 63-74

Scannapieco, A. C., Mannino, M. C., Soto, G., Palacio, M. A., Cladera, J. L., y Lanzavecchia, S. B. (2017). Expression analysis of genes putatively associated with hygienic behavior in selected stocks of *Apis mellifera* L. from Argentina. *Insectes Sociaux*, 64(4), 485-494.

Scheiner, R., Plückhahn, S., Öney, B., Blenau, W., y Erber, J. (2002). Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behavioural Brain Research*, 136(2), 545-553.

Schiff, N. M., y Sheppard, W. S. (1993). Mitochondrial DNA evidence for the 19th century introduction of African honey bees into the United States. *Experientia*, 49(6), 530-532.

- Schmid-Hempel, P. y Reber Funk, C. (2004). The distribution of genotypes of the trypanosome parasite, *Crithidia bombi*, in populations of its host, *Bombus terrestris*. *Parasitology*, 129, 147–158.
- Schulz, D. J., y Robinson, G. E. (1999). Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *Journal of Comparative Physiology A*, 184, 481-488.
- Scott Schneider, S., DeGrandi-Hoffman, G., y Smith, D. R. (2004). The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion." *Annual Reviews in Entomology*, 49(1), 351-376.
- Seeley, T.D. (1995). *The wisdom of the hive*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Servián Morilla, E. (2012). Regulación de la función sináptica de neurexinas por presenilinas: Implicaciones en la enfermedad de alzheimer. (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Sheppard, W. S., Soares, A. E. E., DeJong, D., y Shimanuki, H. (1991). Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie*, 22(6), 643-652.
- Simone, M., Evans, J. D., y Spivak, M. (2009). Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(11), 3016-3022.
- Simone-Finstrom, M. (2017). Social immunity and the superorganism: Behavioral defenses protecting honey bee colonies from pathogens and parasites. *Bee World*, 94(1), 21-29.
- Smith, B. H. (1991). The olfactory memory of the honeybee *Apis mellifera*: I. Odorant modulation of short-and intermediate-term memory after single-trial conditioning. *Journal of Experimental Biology*, 161(1), 367-382.
- Smith, J., Cleare, X. L., Given, K., y Li-Byarlay, H. (2021). Morphological changes in the mandibles accompany the defensive behavior of Indiana mite biting honey bees against *Varroa destructor*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 243.
- Southwick, E. E., y Southwick Jr, L. (1992). Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *Journal of Economic Entomology*, 85(3), 621-633.
- Spivak, M. (1996). Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 27(4), 245-260.
- Spivak, M., Fletcher, D. J., y Breed, M. D. (2019). *The African honey bee*. CRC Press.
- Spivak, M., y Danka, R. G. (2021). Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. *Apidologie*, 52(1), 1-16.
- Spivak, M., y Gilliam, M. (1993). Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research*, 32(3-4), 147-157.
- Spivak, M., y Gilliam, M. (1998). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and Varroa: Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee world*, 79(4), 169-186.
- Spivak, M., y Reuter, G. S. (1998). Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie*, 29(3), 291-302.
- Spivak, M., y Reuter, G. S. (2001a). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 32(6), 555-565.

Spivak, M., y Reuter, G. S. (2001b). *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology*, 94(2), 326-331.

Spivak, M., Masterman, R., Ross, R., y Mesce, K. A. (2003). Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *Journal of neurobiology*, 55(3), 341-354.

Spruijt, B. M., Van Hooff, J. A., y Gispen, W. H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological reviews*, 72(3), 825-852.

Stanimirović, Z., Glavinić, U., Ristanić, M., Aleksić, N., Jovanović, N., Vejnović, B., y Stevanović, J. (2019). Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. *Acta Veterinaria*, 69(1), 1-31.

Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., and Cirkovic, D. (2003). Investigations of reproductive, productive, hygienic and grooming features of SyenichkoPeshterski honey bee ecotype. *Apidologie* 34, 487–488

Stern, P. C. (2000). New environmental theories: toward a coherent theory of environmentally significant behavior. *Journal of social issues*, 56(3), 407-424.

Strauss, R., y Heisenberg, M. (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *Journal of Neuroscience*, 13(5), 1852-1861.

Stroeymeyt, N., Casillas-Pérez, B., y Cremer, S. (2014). Organisational immunity in social insects. *Current Opinion in Insect Science*, 5, 1-15.

Sumpter, D. J., y Martin, S. J. (2004). The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 73(1), 51-63.

T

Taylor Jr, O. R. (1977). The past and possible future spread of Africanized honeybees in the Americas. *Bee World*, 58(1), 19-30.

Tarek, H., Hamiduzzaman, M. M., Morfin, N., y Guzman-Novoa, E. (2018). Sub-lethal doses of neonicotinoid and carbamate insecticides reduce the lifespan and alter the expression of immune health and detoxification related genes of honey bees (*Apis mellifera*). *Genetics and Molecular Research*, 17(2).

Thakur, R. K., Bienefeld, K., y Keller, R. (1997). *Varroa* defense behavior in *A. mellifera* carnica. *American Bee Journal* (USA).

Thom, C., Gilley, D. C., Hooper, J., y Esch, H. E. (2007). The scent of the waggle dance. *PLoS biology*, 5(9), e228.

Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A., Chantawannakul, P., y McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends in parasitology*, 36(7), 592-606.

Tremolada, P., Bernardinelli, I., Colombo, M., Spreafico, M., y Vighi, M. (2004). Coumaphos distribution in the hive ecosystem: Case study for modeling applications. *Ecotoxicology*, 13(6), 589-601.

Tromp, A., Mowry, B., y Giacomotto, J. (2021). Neurexins in autism and schizophrenia—a review of patient mutations, mouse models and potential future directions. *Molecular Psychiatry*, 26(3), 747-760.

U

Uboni, A., Bagnères, A. G., Christidès, J. P., y Lorenzi, M. C. (2012). Cleptoparasites, social parasites and a common host: chemical insignificance for visiting host nests, chemical mimicry for living in. *Journal of Insect Physiology*, 58(9), 1259-1264.

Ulrich, G. M., y Rembold, H. (1983). Caste-specific maturation of the endocrine system in the female honey bee larva. *Cell and tissue research*, 230, 49-55.

Ushkaryov, Y. A., Petrenko, A. G., Geppert, M., y Südhof, T. C. (1992). Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the α -latrotoxin receptor and laminin. *Science*, 257(5066), 50-56.

V

Van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J. J., van Langevelde, F., y Blacquiere, T. (2012). Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PloS one*, 7(4), e36285.

van Engelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpay, D. R., y Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*, 4(8), e6481.

Vandame R, Morand S, Colin ME, Belzunces L (2002) Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa* mites. *Apidologie* 33:433–445

Vandame, R., Otero-Colina, G., y Colin, M. (1994). Dinámica comparativa de las poblaciones de *Varroa jacobsoni* en colmenas de abejas europeas y africanizadas en Córdoba, Ver. IX Seminario Americano de Apicultura, 61-62.

Vandame, R., y Palacio, M. A. (2010). Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping?. *Apidologie*, 41(3), 243-255.

Vannette, R. L., Mohamed, A., y Johnson, B. R. (2015). Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Scientific Reports*, 5(1), 1-9.

Vilarem, C., Piou, V., Vogelweith, F., y Vétillard, A. (2021). *Varroa destructor* from the laboratory to the field: Control, biocontrol and ipm perspectives—A review. *Insects*, 12(9), 800.

Villa, J. D., Danka, R. G., y Harris, J. W. (2009). Simplified methods of evaluating colonies for levels of *Varroa Sensitive Hygiene* (VSH). *Journal of apicultural research*, 48(3), 162-167.

Vincent, C.M.; Bertram, S.M. Crickets groom to avoid lethal parasitoids. *Animal Behaviour*. 2010, 79, 51–56.

Visintini, M. G. (2018). Factores Relacionados con la Tolerancia Frente a *Varroa Destructor* de Colmenas de *Apis mellifera* en Climas Templados. Bach. Thesis degree, Universidad Nacional del Litoral: Argentina

Visintini, M., Pacini, A., Merke, J., Scannapieco, A., Molineri, A., Orellano, E., Bedascarburre, B., Miotti, Camila., Ceccotti, M. P., Bulacio Cagnolo, N. V., Signorini Porchietto, M. L., y Giacobino, A. (2021). Field evaluation of *Varroa*-resistance traits in surviving *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Parasitology Research*, 120(12), 4013-4021.

Von Frisch, K. (1967). The dance language and orientation of bees. Harvard University Press, 566.

W

Wagener-Hulme, C., Kuehn, J. C., Schulz, D. J., y Robinson, G. E. (1999). Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology A*, 184, 471-479.

Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., Kawata, M., Haddad, N., Paulino Simões, Z. L., Allsopp, M. H., Kandemir, I., De la Rúa, P., Pirk, C. W., y Webster, M. T.. (2014). A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, 46(10), 1081-1088.

- Wallner, K., y Fries, I. (2003). Control of the mite *Varroa destructor* in honey bee colonies. *Pesticide Outlook*, 14(2), 80-84.
- Wang, S., Wagner, E. J., y Mattox, W. (2013). Half Pint/Puf68 is required for negative regulation of splicing by the SR factor Transformer2. *RNA Biology*, 10(8), 1396-1406.
- Warner, M. R., Qiu, L., Holmes, M. J., Mikheyev, A. S., y Linksvayer, T. A. (2019). Convergent eusocial evolution is based on a shared reproductive groundplan plus lineage-specific plastic genes. *Nature Communications*, 10(1), 2651.
- Watanabe, M. E. (1994). Pollination worries rise as honey bees decline. *Science*, 265(5176), 1170-1170.
- Wegener, J., Ruhnke, H., Scheller, K., Mispagel, S., Knollmann, U., Kamp, G., y Bienefeld, K. (2016). Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Journal of Insect Physiology*, 91, 1-9.
- Widmer, A., Höger, U., Meisner, S., French, A. S., y Torkkeli, P. H. (2005). Spider peripheral mechanosensory neurons are directly innervated and modulated by octopaminergic efferents. *Journal of Neuroscience*, 25(6), 1588-1598.
- Wilde, J., Bratkowski, J., and Siuda, M. (2003). Defensive behavior of three breeds of *Apis mellifera* L. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Sect. EE Zootech.* 21, 87–93
- Wilkinson, D., y Smith, G. C. (2002). A model of the mite parasite, *Varroa destructor*, on honeybees (*Apis mellifera*) to investigate parameters important to mite population growth. *Ecological Modelling*, 148(3), 263-275.
- Wilson, W. T. (1971). Resistance to American foulbrood in honey bees. XI: Fate of *Bacillus* larvae spores ingested by adults. *Journal of invertebrate Pathology*, 17(2), 247-255.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N. H., y Starks, P. T. (2009). Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual review of entomology*, 54(1), 405-423.
- Winston, M. L. (1979). Intra-colony demography and reproductive rate of the Africanized honeybee in South America. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 4(3), 279-292.
- Winston, M. L. (1987). *The biology of the honey bee*. Harvard University Press.
- Winston, M. L. (1992). The biology and management of Africanized honey bees. *Annual Review of Entomology*, 37, 173-193.
- Winston, M. L., y Punnett, E. N. (1982). Factors determining temporal division of labor in honeybees. *Canadian Journal of Zoology*, 60(11), 2947-2952.
- Winston, M. L., Higo, H. A., Colley, S. J., Pankiw, T., y Slessor, K. N. (1991). The role of queen mandibular pheromone and colony congestion in honey bee (*Apis mellifera* L.) reproductive swarming (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 4, 649-660
- Wirtz, P. (1973). Differentiation in the honeybee larva: a histological, electron-microscopical and physiological study of caste induction in *Apis mellifera mellifera* L (Doctoral dissertation, Veenman).
- Withrow, J. M., y Tarpy, D. R. (2018, November). Sharing the throne: Polygynous honey bee (*Apis mellifera*) colonies. In *Entomology 2018*. ESA.
- Woyke, J. (1962). Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World*, 43(1), 21-25.

Y

Yanagawa, A.; Shimizu, S. Resistance of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki to *Metarhizium anisopliae* due to grooming. *BioControl* 2007, 52, 75–85.

Yang, X., y Cox-Foster, D. (2007). Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*, 134(3), 405-412.

Yañez, O., Piot, N., Dalmon, A., De Miranda, J. R., Chantawannakul, P., Panziera, D., Amiri, E., Smagghe, G., Schroeder, D. y Chejanovsky, No. (2020). Bee viruses: Routes of infection in Hymenoptera. *Frontiers in Microbiology*, 11, 943.

York, R. A. (2018). Assessing the genetic landscape of animal behavior. *Genetics*, 209(1), 223-232.

Z

Zabala, J.M., Exner, E., Cerino, C., Buyatti, M., Cuffia, C., Marinoni, L., Kern, V., Pensiero, J.F. (2021). Recursos fitogenéticos forestales, forrajeros, de interés apícola y paisajístico nativos de la provincia de Santa Fe (Argentina). *FAVE - Ciencias Agrarias* 20 (1), 99-131. CC BY-NC-SA 4.0.

Zefferino, I. (2012). Evaluación del comportamiento de grooming en dos razas de abejas melíferas (*Apis mellifera*) como mecanismo de resistencia al ácaro ectoparásito *Varroa destructor*. Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

Zeng, X., Sun, M., Liu, L., Chen, F., Wei, L., y Xie, W. (2007). Neurexin-1 is required for synapse formation and larvae associative learning in *Drosophila*. *FEBS letters*, 581(13), 2509-2516.

Zhao, Y., Heerman, M., Peng, W., Evans, J. D., Rose, R., DeGrandi-Hoffman, G., Simone-Finstrom, M., Li, J., Li, Z., Cook, S. C., Su, S., Rodriguez –Garcia, C., Banmeke, O., Hamilton, M. y Chen, Y. (2019). The dynamics of deformed wing virus concentration and host defensive gene expression after *Varroa* mite parasitism in honey bees, *Apis mellifera*. *Insects*, 10(1), 16.

Zheng, H. Q., Gong, H. R., Huang, S. K., Sohr, A., Hu, F. L., y Chen, Y. P. (2015). Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus. *Veterinary Microbiology*, 177(1-2), 1-6.

Zhukovskaya, M.; Yanagawa, A.; Forschler, B.T. Grooming Behavior as a Mechanism of Insect Disease Defense. *Insects* 2013, 4, 609-630.

APÉNDICE

S1. *Odds ratios (O.R.)* que predicen qué grupos de abejas tienen más probabilidades de usar todas sus patas en presencia del ácaro *V. destructor* o del tratamiento control, a diferentes edades (6, 10 y 14 días). **(a)** Comparaciones entre tratamientos. **(b)** Comparaciones entre stocks. **(c)** Comparaciones entre edades. I.C.: intervalo de confianza; %: porcentaje de incremento de probabilidad. Los valores P que resultaron significativos están en negrita.

a.

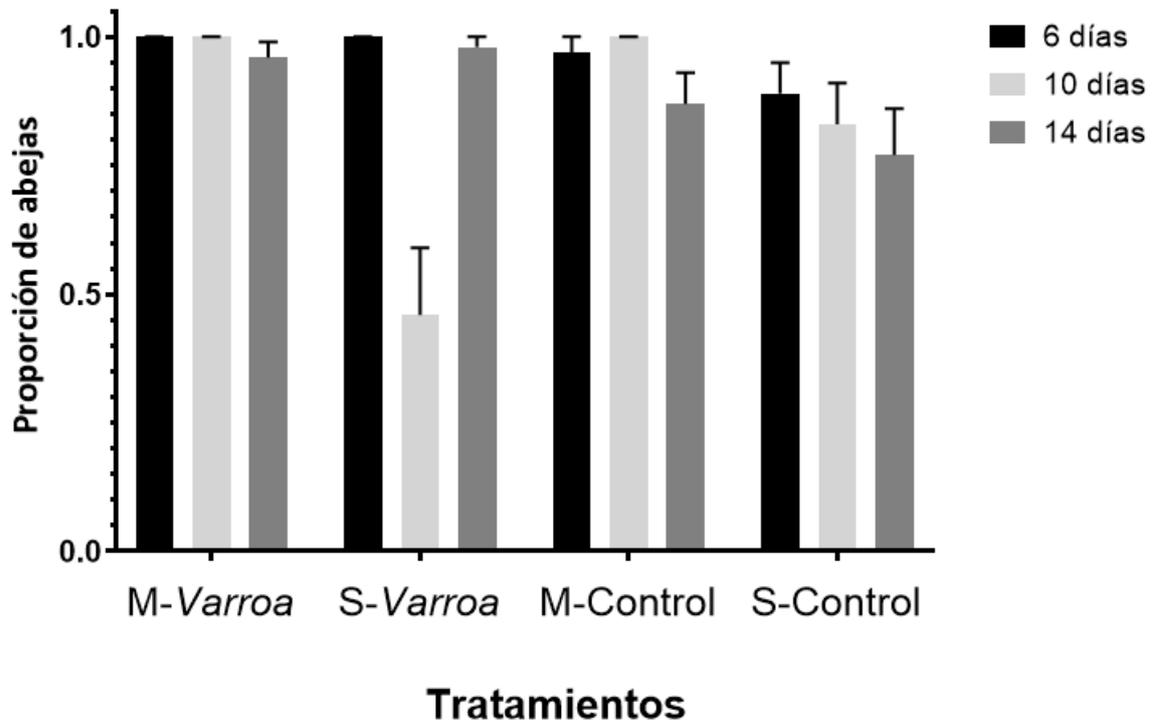
Comparación entre tratamientos	Edades	Stock	O.R.	I.C.	%	P-valor
Control/ <i>V. destructor</i>	6	Susceptible	0.24	0.17-0.35	-75.51	0.0001
		Resistente	0.004	0.0009-0.018	-99.59	0.0001
	10	Susceptible	0.19	0.13-0.27	-81.17	0.0001
		Resistente	0.020	0.0095-0.044	-97.94	0.0001
	14	Susceptible	0.22	0.16-0.31	-77.73	0.0001
		Resistente	0.16	0.098-0.249	-84.34	0.0001

b.

Comparación entre stocks	Edades	Tratamientos	O.R.	I.C.	%	P-valor
Susceptible/ Resistente	6	Control	1.40	0.66-2.99	40.10	0.38
		<i>V. destructor</i>	0.02	0.004-0.11	-97.66	<0.0001
	10	Control	0.75	0.36-1.55	-24.78	0.44
		<i>V. destructor</i>	0.08	0.03-0.21	-91.76	<0.0001
	14	Control	0.76	0.38-1.52	-24.14	0.44
		<i>V. destructor</i>	0.53	0.26-1.10	-46.66	0.09

c.

Comparación entre edades	Stocks	Tratamiento	O.R.	I.C.	%	P-valor
6/10	Susceptible	Control	2.34	0.96-5.72	134	0.066
		<i>V. destructor</i>	1.80	0.72-4.5	79.9	0.29
	Resistente	Control	1.26	0.58-2.73	26.5	0.77
		<i>V. destructor</i>	6.32	0.93-43.12	531.9	0.063
6/14	Susceptible	Control	1.68	0.69-4.08	67.7	0.36
		<i>V. destructor</i>	1.52	0.61-3.81	52.5	0.53
	Resistente	Control	0.91	0.42-1.95	-9.2	0.95
		<i>V. destructor</i>	34.69	5.75- 209.14	3369.3	0.0001
10/14	Susceptible	Control	0.72	0.29-1.75	-28.3	0.65
		<i>V. destructor</i>	0.85	0.34-2.08	-15.2	0.90
	Resistente	Control	0.72	0.38-1.37	-27.7	0.46
		<i>V. destructor</i>	5.49	2.08-14.46	449	0.0001



S2. Proporción media de abejas que expresaron una alta intensidad de limpieza en respuesta al tratamiento con *Varroa* (infestación con un ácaro) o al tratamiento control (toque de pincel). Los valores se muestran para abejas de diferentes edades de las poblaciones de *A. mellifera* resistentes (M) y susceptibles (S).

S3. Análisis de componentes principales (CP) de abejas obreras de las colonias de *A. mellifera* resistentes (M) y susceptibles (S) a los ácaros para las variables de *grooming* (tiempo de la primera respuesta, número de intentos, número de patas involucradas en el primer intento y nivel de ansiedad). Se muestran los autovalores y autovectores.

Datos estandarizados	
Casos leídos	291
Casos omitidos	2

Variables de clasificación

Genética

Autovalores

Lambda	Valor	Proporción	Prop. Acumulada
1	2,47	0,62	0,62
2	0,62	0,15	0,77
3	0,56	0,14	0,91
4	0,36	0,09	1

Autovectores

	e1	e2
Tiempo	-0,51	0,33
Intentos	0,48	-0,26
Patas	0,54	-0,20
Ansiedad	0,46	0,89

S4. Concentración e índices de calidad del ARN de *A. mellifera*. Se muestran las concentraciones de ARN (ng/ul) extraídas para cada individuo analizado, por tejido y stock (M y S). Como parámetro de pureza se muestran las relaciones 260/280 (que óptimamente debe estar entre 1,8 y 2,1) y 260/230 (que óptimamente debe ser superior a 2).

Stock	Tejido	Tratamiento	ng/ul	260/280	260/230
M	Varroa	Cabeza	115,3	1,94	1,66
M	Varroa	Cabeza	27,8	2,06	1,85
M	Varroa	Cabeza	57,7	1,84	1,41
M	Varroa	Cabeza	29,2	2,15	2,09
M	Varroa	Cabeza	83,2	1,83	1,09
M	Varroa	Cabeza	84,2	1,98	1,42
M	Varroa	Cabeza	109,9	1,78	1,18
M	Varroa	Cabeza	127,8	1,83	1,25
M	Varroa	Cabeza	91,3	1,95	1,45
M	Varroa	Cabeza	107,5	1,8	1,11
M	Varroa	Cabeza	90,5	1,87	1,63
M	Varroa	Cabeza	98,8	1,93	1,45
M	Varroa	Cabeza	84,9	1,91	1,32
M	Varroa	Cuerpo	221,8	2,02	2,33
M	Varroa	Cuerpo	230,6	2	2,3
M	Varroa	Cuerpo	248,7	2,02	2,27
M	Varroa	Cuerpo	200,2	2,03	2,39
M	Varroa	Cuerpo	172,9	2	2,33
M	Varroa	Cuerpo	210,3	2,01	2,42
M	Varroa	Cuerpo	199,7	1,98	2,35
M	Varroa	Cuerpo	197,1	1,96	2,32
M	Varroa	Cuerpo	204,8	1,97	2,3
M	Varroa	Cuerpo	304,9	2,02	2,32
M	Varroa	Cuerpo	220,2	2,01	2,46
M	Varroa	Cuerpo	211,5	2,04	2,25
M	Varroa	Cuerpo	197,5	2,03	2,38
M	Control	Cabeza	115	1,98	1,47
M	Control	Cabeza	87,8	1,85	1,45
M	Control	Cabeza	46,5	1,83	1,14
M	Control	Cabeza	191,1	1,92	1,65
M	Control	Cabeza	59	1,81	1,21
M	Control	Cabeza	255,5	1,91	1,5
M	Control	Cabeza	119,1	1,89	1,55
M	Control	Cabeza	99,4	1,88	1,52

Stock	Tejido	Tratamiento	ng/ul	260/280	260/230
M	Control	Cabeza	64,7	1,7	0,99
M	Control	Cabeza	158,6	1,82	1,26
M	Control	Cuerpo	100,1	2	2,38
M	Control	Cuerpo	147,8	1,99	2,41
M	Control	Cuerpo	139,9	2,02	2,45
M	Control	Cuerpo	214,4	1,98	2,48
M	Control	Cuerpo	173,3	2	2,5
M	Control	Cuerpo	165,7	1,98	2,51
M	Control	Cuerpo	193,6	1,9	2,32
M	Control	Cuerpo	195,7	1,89	2,14
M	Control	Cuerpo	143,4	1,85	2,32
M	Control	Cuerpo	226,3	1,97	2,32
S	Varroa	Cabeza	123,6	1,88	1,46
S	Varroa	Cabeza	104,8	1,98	1,51
S	Varroa	Cabeza	122,4	1,84	1,29
S	Varroa	Cabeza	72,4	1,92	1,45
S	Varroa	Cabeza	116,9	1,89	1,61
S	Varroa	Cabeza	111,7	1,95	1,29
S	Varroa	Cabeza	87,5	1,92	1,46
S	Varroa	Cabeza	71,4	2,04	1,35
S	Varroa	Cabeza	111,1	1,91	1,62
S	Varroa	Cabeza	75,8	1,9	1,4
S	Varroa	Cabeza	98,4	1,9	1,51
S	Varroa	Cabeza	80,9	1,99	1,52
S	Varroa	Cabeza	60,3	1,96	1,35
S	Varroa	Cuerpo	236,5	2,02	2,32
S	Varroa	Cuerpo	233,5	1,99	2,41
S	Varroa	Cuerpo	236,6	2	2,38
S	Varroa	Cuerpo	220,1	2,03	2,16
S	Varroa	Cuerpo	250,5	2,07	2,4
S	Varroa	Cuerpo	274,1	2,04	2,39
S	Varroa	Cuerpo	293,4	2,02	2,43
S	Varroa	Cuerpo	304,8	2,04	2,45
S	Varroa	Cuerpo	347,9	2,03	2,34
S	Varroa	Cuerpo	317,5	2,03	2,41
S	Varroa	Cuerpo	269,2	2,05	2,31
S	Varroa	Cuerpo	217,7	2,01	2,38
S	Varroa	Cuerpo	208,8	2,01	2,36

Stock	Tejido	Tratamiento	ng/ul	260/280	260/230
S	Control	Cabeza	165,8	1,86	1,3
S	Control	Cabeza	20,8	1,75	1,17
S	Control	Cabeza	161,2	1,89	1,41
S	Control	Cabeza	110,1	1,88	1,62
S	Control	Cabeza	161,2	1,86	1,49
S	Control	Cabeza	98,3	1,86	1,54
S	Control	Cabeza	120	1,88	1,56
S	Control	Cabeza	87	1,86	1,62
S	Control	Cabeza	102,2	1,86	1,29
S	Control	Cabeza	128,5	1,89	1,62
S	Control	Cuerpo	300,3	2,03	2,48
S	Control	Cuerpo	240,1	1,91	2,17
S	Control	Cuerpo	451,7	2,03	2,4
S	Control	Cuerpo	280	2,02	2,42
S	Control	Cuerpo	241,2	2,01	2,46
S	Control	Cuerpo	275,1	2,04	2,46
S	Control	Cuerpo	212,3	2,01	2,26
S	Control	Cuerpo	500,2	2,1	2,24
S	Control	Cuerpo	339,3	2,04	2,49
S	Control	Cuerpo	220,2	2,02	2,41