



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

## Aspectos genéticos y genómicos de la interacción *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) - *Varroa destructor* (Acari: Varroidae)

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Licenciada Irina Muntaabski**

Directora de Tesis: Dra. Alejandra Carla Scannapieco

Co-directora de Tesis: Dra. Silvia Beatriz Lanzavecchia

Consejera de Estudios: Profesora Dra. María Isabel Remis

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insectos de Importancia Agronómica, Instituto de Genética (INTA) –  
g.v. IABIMO (CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Julio 2022

**TÍTULO:** Aspectos genéticos y genómicos de la interacción *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) - *Varroa destructor* (Acari: Varroidae).

## RESUMEN

*Apis mellifera* es el principal polinizador de especies vegetales de interés agronómico y constituye el mayor productor de miel del mundo. La supervivencia y la productividad de sus colonias se ven gravemente afectadas por *Varroa destructor*. Este ácaro ectoparásito afecta el estado nutricional e inmunológico de las abejas y el estado general de la colonia. El objetivo general de esta Tesis Doctoral es explorar la interacción entre *A. mellifera* y *V. destructor* para aportar conocimientos sobre genes y factores asociados a la reproducción del parásito sobre su hospedador. Para ello, se caracterizaron a nivel poblacional y genético colonias de *A. mellifera* establecidas en clima templado y las poblaciones del ácaro asociadas. La dinámica de las poblaciones de ambas especies es homogénea entre las temporadas analizadas y consistente con lo esperado para clima templado. Se identificaron dos haplotipos de la región intergénica COI-COII (C1/C2j) en abejas y un haplotipo del marcador *cox1* (K) para *V. destructor*. Asimismo, se caracterizó la variabilidad genética del ácaro en distintas poblaciones de nuestro país mediante marcadores mitocondriales (*cox1*, *nd4*, *nd4L* y *nd5*). Se identificó un nuevo sub-haplotipo (KArg-N2) y la presencia de heteroplasmia de sitio en *nd4*. Los análisis de variabilidad genética se complementaron con el análisis de genes potencialmente intervinientes en la reproducción de *V. destructor*. Se realizó un análisis de transcriptoma comparando tres grupos de ácaros: reproductivos (R), no reproductivos (NR) y foréticos (F). Se identificaron 45 genes diferencialmente expresados (GDE) entre R y NR, y se exploraron las vías metabólicas asociadas. Ensayos de qPCR y silenciamiento génico (RNAi) de seis genes candidatos permitieron detectar una asociación entre la expresión de tres de ellos (*vg1*, *ptch1* y *ap-1*) y el éxito reproductivo de *V. destructor*. Los resultados obtenidos proveen información clave sobre la interacción parásito-hospedador que contribuirá al desarrollo de técnicas integradas de control de la varroosis, permitiendo minimizar el impacto de esta enfermedad y promoviendo la sanidad de las colonias de *A. mellifera*.

**Palabras clave:** Ectoparásito, abeja melífera, transcriptoma, éxito reproductivo, silenciamiento génico.

**TITLE:** *Genetic and genomic aspects of the interaction Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) - Varroa destructor (Acari: Varroidae).*

## **ABSTRACT**

*Apis mellifera* is the main pollinator of plant species of agronomic interest and is the largest honey producer in the world. The survival and productivity of its colonies are severely affected by *Varroa destructor*. This ectoparasitic mite affects the nutritional and immunological status of the bees and the general condition of the colony. The overall objective of this PhD Thesis is to explore the interaction between *A. mellifera* and *V. destructor* to provide knowledge on genes and factors associated with the reproduction of the parasite on its host. For this purpose, *A. mellifera* colonies from temperate climates of Argentina, and the associated mite populations were characterized at the population and genetic level. The population dynamics of both species were homogenous among the two seasons analyzed and consistent with what is expected for a temperate climate. Two haplotypes were identified for the intergenic region COI-COII (C1/C2j) in honey bees and one haplotype for *cox1* marker (K) in *V. destructor*. In addition, the genetic variability of different mite populations from Argentina was characterized by using mitochondrial markers (*cox1*, *nd4*, *nd4L* and *nd5*). A new sub-haplotype (KArg-N2) and the presence of site heteroplasmy in *nd4* were identified. Genetic variability analyses were complemented with expression analysis of genes putatively involved in the reproduction of *V. destructor*. A transcriptome analysis was performed comparing three groups of mites: reproductive (R), non-reproductive (NR) and phoretic (F). Forty-five differentially expressed genes (DEG) were identified between R and NR mites, and associated metabolic pathways were explored. qPCR and gene silencing (RNAi) assays of six candidate genes evidenced an association between the gene expression of three of them (*vg1*, *ptch1* and *ap-1*) and the reproductive success in *V. destructor*. The results obtained provide key information on the parasite-host interaction that will contribute to the development of integrated varroosis control techniques, minimizing the impact of this disease and promoting the health of *A. mellifera* colonies.

**Keywords:** *Ectoparasitic mite, honey bee, transcriptome, mite reproductive success, gene silencing*

## AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis de Doctorado no habría sido posible sin la continua ayuda y dedicación de numerosas personas. Quiero agradecer en primer lugar al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por brindarme la beca doctoral que permitió que todo esto fuera posible. A los integrantes del Laboratorio de Insectos de Importancia Agronómica del Instituto de Genética “Ewald A. Favret”, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, por haberme abierto las puertas al mundo de la investigación en un primer lugar y por haberme acompañado todos estos años. A la Universidad de Buenos Aires por brindarme una educación de altísimo nivel.

Quiero agradecer especialmente a mi directora la Dra. Alejandra Scannapieco que me guió en cada paso que di a lo largo de todos estos años, creyendo siempre en mí y brindándome su entera confianza, dedicación y tiempo.

Al Dr. Jorge Cladera y todo el grupo de “Moscas” por su buena predisposición y por estar siempre presentes, especialmente a mi co-directora la Dra. Silvia Lanzavecchia; sin ella esta tesis no existiría de la manera que existe hoy. Quiero agradecer al grupo de abejas (Romina Russo, Clara Liendo y Lucas Landi), por su continua cooperación y apoyo. Estoy profundamente feliz de haber trabajado codo a codo con ustedes y formar parte de este equipo.

A mi consejera de estudios la Dra. María Isabel Remis por siempre estar disponible para mí.

A todos los integrantes del Programa Nacional de Apicultura por su constante predisposición al trabajo en equipo, especialmente a la Dra. María Alejandra Palacio y la Dra. Graciela Rodríguez, por su ayuda en mi formación profesional.

Agradezco a la Dra. Leonela Carabajal por haberme dado mi primera oportunidad, por acompañarme en todo momento, aún en la distancia.

Al Dr. Jose Manuel Latorre Estivalis, por su colaboración y continuo apoyo durante el análisis bioinformático. Además, agradezco al Dr. Juan Pedro Wulff y al Dr. Ricardo Salvador y su equipo por la colaboración, el apoyo moral y trabajo en el análisis de RNAi.

Agradezco profundamente a mis amigos “pececitos” por haberme acompañado en el proceso de doctorado. Estoy segura que sin ustedes no habría podido lograrlo. Siempre van a tener un lugar especial en mi corazón.

A mis amigos de siempre, los del barrio, del colegio, de danza, de inglés, de la universidad, de teatro y de la vida, por acompañarme en cada paso que doy, ustedes son mi motor. Especialmente a Soli por acompañarme siempre y darme uno de los regalos más grande de la vida, a Ale y Chaco por siempre recibirme en su casa cuando los días eran negros y a Damis, que aún lejos seguimos muy cerca.

A mis ex compañeros de la Universidad de Morón especialmente a Dani que me acompañó en todas y a Susy.

A mis amigas y ex compañeras del Laboratorio de Biología, Vane e Ita por ser mi familia y mi núcleo duro.

A mis segundas familias: Lera, Zamora, Arakelian, Barrios y Quadrana por cuidar siempre de mí.

A mi familia: mi abuela, mis tíos, mis padrinos y mis primos por brindarme absolutamente todo y siempre creer en mí, son maravillosos. A mis primas Celeste y Marilina por ser mi refugio y a mi hermano Leandro por ofrecerme siempre su ayuda, consejo y por el regalo hermoso que me dio.

Y a mis papás Cristina y Osvaldo por estar incondicionalmente para mí en todas las etapas de mi vida. Gracias por enseñarme absolutamente todo en la vida y especialmente por enseñarme a ser leal a mí misma, sin ustedes no sería quien soy hoy.

Y sobre todo gracias a Danna y Lulu.

## Índice

Introducción general	9
I.G. 1. <i>Apis mellifera</i>	10
I.G. 1.1. Biología y organización social	11
I.G. 1.2. Ciclo de Vida	13
I.G. 1.3. Taxonomía y origen de la especie	16
I.G. 1.4. Introducción de <i>A. mellifera</i> en América	18
I.G. 1.5. Importancia económica de la especie	19
I.G. 1.6. Sobre los patógenos de <i>A. mellifera</i> y su impacto	21
I.G. 2. <i>Varroa destructor</i>	23
I.G. 2.1. Ciclo de vida	23
I.G. 2.2. Origen y distribución de la especie	27
I.G. 2.3. Impacto de <i>V. destructor</i> sobre <i>A. mellifera</i>	28
I.G. 2.4. Control de la varroosis	30
I.G. 2.5. Relaciones de equilibrio entre <i>A. mellifera</i> y <i>V. destructor</i>	31
Objetivos e hipótesis	33
Objetivo general	34
Objetivos específicos	34
Hipótesis	34
Nota del Tesista	36
Capítulo 1. Caracterización genética y comportamental de colonias de <i>Apis mellifera</i> en condiciones de parasitación natural con <i>Varroa destructor</i>	38
1.1. INTRODUCCIÓN	39
1.1.1. Dinámica de poblaciones de abejas y ácaros en colonias de <i>A. mellifera</i>	39
1.1.2. Caracterización genética de poblaciones de <i>A. mellifera</i>	41
1.1.3. Comportamientos de higiene de las colonias	47
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	51
1.2.1. Materiales	51
1.2.2. Métodos	52
1.3. RESULTADOS	61
1.3.1. Evaluación de parámetros poblacionales de <i>A. mellifera</i>	61
1.3.2. Caracterización genética de las colmenas de <i>A. mellifera</i>	62
1.3.3. Evaluación de parámetros poblacionales de <i>V. destructor</i>	64
1.3.4. Caracterización del comportamiento de higiene hacia el ácaro en las colonias de <i>A. mellifera</i>	66

1.4. DISCUSIÓN	72
1.4.1 Dinámica poblacional de <i>A. mellifera</i> y <i>V. destructor</i>	72
1.4.2. Comportamiento higiénico de <i>A. mellifera</i> hacia celdas infestadas con <i>V. destructor</i>	72
1.4.3. Caracterización genética de las colonias de <i>A. mellifera</i>	74
Capítulo 2. Caracterización genética de <i>Varroa destructor</i> en colonias de Argentina	76
2.1. INTRODUCCIÓN	77
2.1.1. Detección y dispersión de <i>V. destructor</i> en Sudamérica	77
2.1.2. Variabilidad genética de <i>V. destructor</i>	77
2.1.3. Heteroplasmia	79
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	82
2.2.1. Colecta de muestras	82
2.2.2. Extracción individual de ADN total de <i>V. destructor</i>	82
2.2.3. Desarrollo de marcadores mitocondriales	82
2.2.4. Análisis de secuencia nucleotídica de regiones en el ADN mitocondrial	86
2.2.5. Verificación de la heteroplasmia	86
2.2.6. Análisis estadístico	90
2.3. RESULTADOS	91
2.3.1. Extracción individual de ADN total de <i>V. destructor</i>	91
2.3.2. Amplificación de marcadores del genoma mitocondrial de <i>V. destructor</i>	91
2.3.3. Análisis de secuencias e identificación de haplotipos	92
2.3.4. Análisis de la heteroplasmia	95
2.4. DISCUSIÓN	100
Capítulo 3. Transcriptoma de <i>Varroa destructor</i> : Identificación de transcritos potencialmente involucrados en el éxito reproductivo del ácaro	104
3.1. INTRODUCCIÓN	105
3.1.1. RNA-Seq	105
3.1.2. Estudios genómicos en <i>Varroa destructor</i>	106
3.1.3. Bases genéticas de la reproducción en <i>V. destructor</i>	107
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	109
3.2.1. Material	109
3.2.2. Obtención de muestras de <i>V. destructor</i> en estado reproductivo, no reproductivo y forético en su primer ciclo de vida	109
3.2.3. RNAseq, análisis del transcriptoma y elección de genes candidatos	111
3.3. RESULTADOS	119

3.3.1. Transcriptoma de <i>Varroa destructor</i>	119
3.4. DISCUSIÓN	136
3.4.1. Comparación entre la fase forética y la fase reproductiva de <i>V. destructor</i>	136
3.4.2. Comparación entre ácaros reproductivos y no reproductivos	137
3.4.3. Genes <i>Halloween</i>	140
3.4.4. Virus	141
Capítulo 4. Análisis de patrones de expresión y exploración funcional de genes candidatos a intervenir en el éxito reproductivo de <i>Varroa destructor</i>	143
4.1. INTRODUCCIÓN	144
4.1.1. Silenciamiento génico: Generalidades	144
4.1.2. Orígenes de la técnica de ARN de interferencia (ARNi)	144
4.1.3. Mecanismo de acción del silenciamiento de genes mediante RNAi	145
4.1.4. El RNAi como estrategia para inhibir la expresión de genes	147
4.1.5. Silenciamiento génico en artrópodos y Acari	148
4.1.6. Silenciamiento génico en <i>V. destructor</i> - Antecedentes	150
4.1.7. Aplicación de RNAi como método de control de la varroosis	151
4.2. MATERIALES y MÉTODOS	152
4.2.1. Selección de genes candidatos para el ensayo de silenciamiento	152
4.2.2. Análisis de patrones de expresión de los genes candidatos	152
4.2.3. Ensayo de silenciamiento génico	153
4.3. RESULTADOS	160
4.3.1. Patrones de expresión de los genes candidatos en <i>V. destructor</i> durante los primeros días dentro de la celda de cría	160
4.3.2. Silenciamiento de genes candidatos de <i>V. destructor</i>	161
4.4. DISCUSIÓN	166
4.4.1. Consideraciones sobre el método de administración del dsRNA	166
4.4.2. Efecto del silenciamiento génico en los ácaros en fase reproductiva	167
Discusión general y perspectivas	172
<i>Apis mellifera</i>	173
<i>Varroa destructor</i>	174
Interacción <i>A. mellifera</i> : <i>V. destructor</i>	175
BIBLIOGRAFÍA	178
MATERIAL SUPLEMENTARIO	219

# Introducción general

## **I.G. 1. *Apis mellifera***

*Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) es un insecto eusocial que vive en colonias y presenta una organización compleja, con división reproductiva del trabajo, cooperación en el cuidado de la cría y solapamiento de generaciones capaces de contribuir en la labor social (Wilson, 1971). Dentro de los nidos de estos insectos, denominados colonias, se realizan actividades con un alto grado de coordinación que involucran a un gran número de individuos. Así, 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 precisa transferencia 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 del comportamiento de comunicación de posicionamiento comúnmente conocido como "Danza de las Abejas" (von Frisch, 1967; Seeley, 1995; Thom et al., 2007). 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). 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 & Camazine, 2002; Naug, 2008), y los comportamientos de "inmunidad social" (Cremer et al., 2007; Stroeymeyt et al., 2014; Simone-Finstrom 2017; Cremer & Pull, 2018; Cotter et al., 2019), tales como la separación espacial de las abejas de alto riesgo de las abejas de bajo riesgo (Naug & Camazine 2002; Baracchi & Cini, 2014), la disminución de los contactos con abejas infectadas (Lecocq et al., 2016), y la eliminación de compañeros de nido infectados (Baracchi et al., 2012; Biganski et al., 2018), entre otros, minimizan la transmisión de enfermedades dentro de la colonia (Laomettachit et al., 2021).

*Apis mellifera* presenta actualmente una distribución cosmopolita, y dispone de una alta capacidad para explotar diversos ambientes, lo que la convierte en uno de los principales polinizadores 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 & Southwick, 1992). Así, el valor de los servicios ecosistémicos que brindan las abejas y su

rol en el mantenimiento 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 ampliamente utilizada como organismo modelo para investigación sobre fisiología y comportamiento animal (revisado en Elekonich & 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. Biología y 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) que cooperan en el cuidado de la cría. 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 & 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 organizacional 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* mostrando 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.



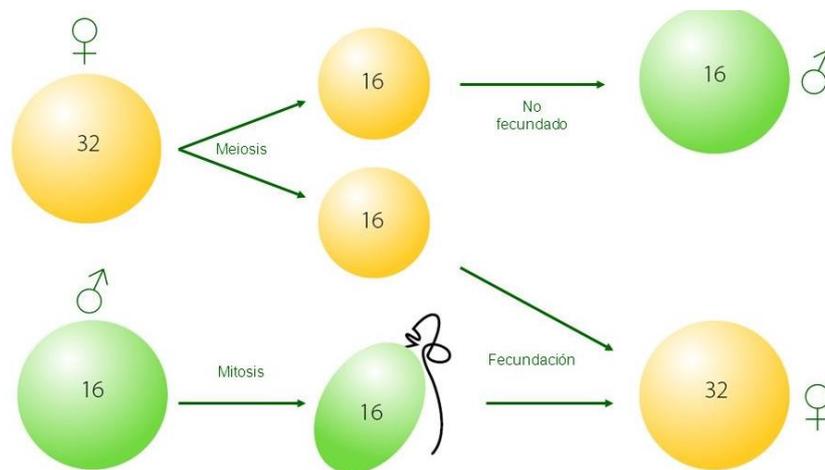
**Figura 2.** Fotografía de zánganos de *A. mellifera* (izquierda) y de celdas de cría de zánganos (derecha). Se observan las diferencias en la morfología externa entre zánganos y obreras y entre las celdas de cría de ambas castas.



**Figura 3.** Fotografía de una abeja obrera de *A. mellifera* sobre un panal con celdas de cría abierta (arriba, a la izquierda) y cría operculada.

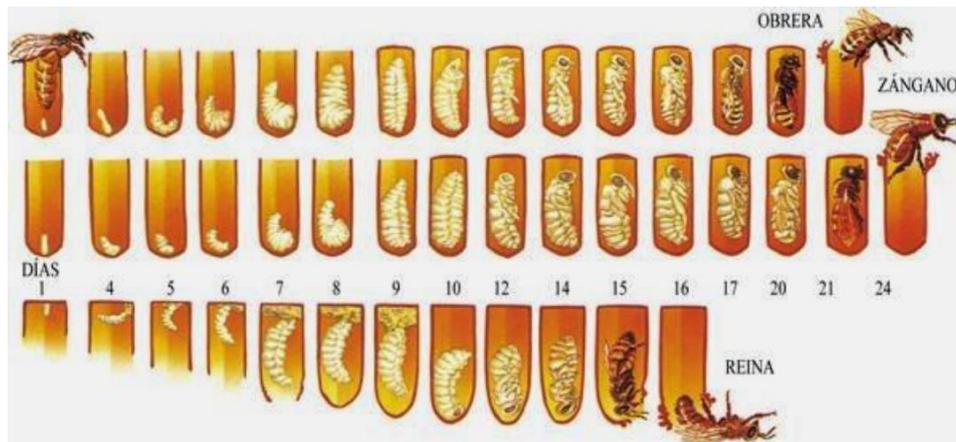
### I.G. 1.2. Ciclo de Vida

Como la mayoría de los himenópteros, *A. mellifera* presenta un ciclo de vida haplo-diploide y un sistema de determinación del sexo de único locus 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 & Kusanagi, 1978). Cuando la reina se aparea, almacena 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 & Kusanagi, 1978). La aparición de machos diploides ha sido previamente descrita 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 & 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 (Tabla 1; Figura 5).



**Figura 5.** Ciclo de vida de las tres castas de *A. mellifera*. Se indica la duración en días. Tomado de Winston (1991).

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 operculación (cerrado de la celda) en el día 8 del ciclo (Ulrich & Rembold, 1983; Evans & Wheeler, 1999) (Tabla 1). Esta alimentación propicia la fertilidad de la abeja reina y su mayor tamaño. Una vez que emerge, la reina virgen abandona la colmena y realiza los vuelos de fecundación (Brutscher et al., 2019). Estos eventos pueden durar varios días y tienen como finalidad el apareamiento de la reina con al menos 10 zánganos (Winston, 1991). La reina se aparea con los zánganos en las denominadas Áreas de Congregación de Zánganos (Withrow & 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 permiten evitar 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, 1991; Keeling et al., 2003).

**Tabla 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	Opérculo	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

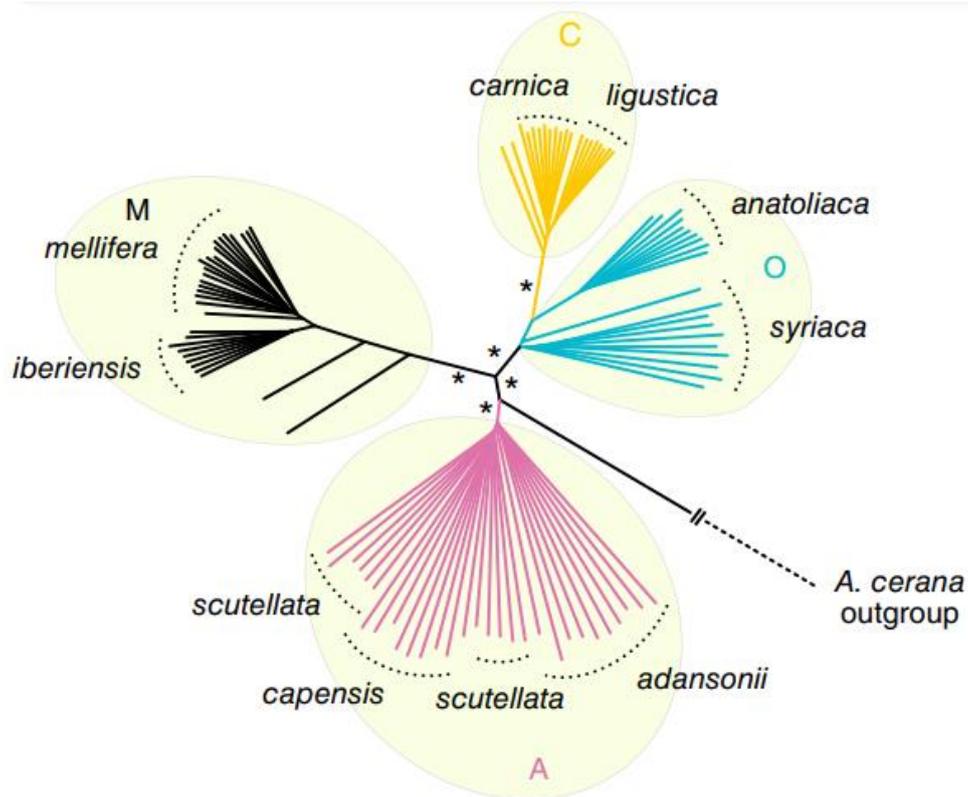
Las obreras constituyen la casta más numerosa dentro de la colonia (Hillyer, 2016; Jean-Prost, 1987). Desde la puesta del huevo fecundado, una obrera se desarrolla en 21 días (Tabla 1, Figura 5). La eclosión del huevo da lugar a una larva que es alimentada con jalea real por obreras nodrizas durante 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 (Tabla 1, Figura 5). 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 et al., 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. A partir de los 20 días de edad, las abejas obreras se especializan en el pecoreo de polen, néctar y propóleo (Calderone & 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 (Tabla 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 & Wheeler, 1999). La mayor esperanza de vida que se observa en las abejas de invierno se debe a que, durante esta época, la puesta 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 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 (Tabla 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 de la especie**

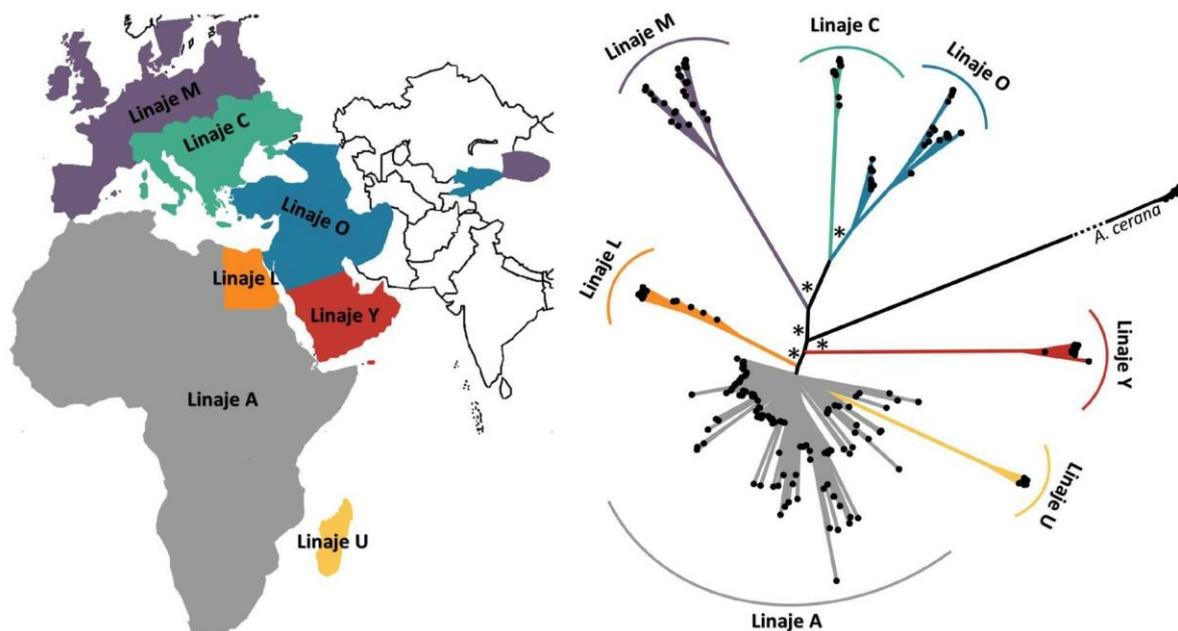
Las abejas melíferas se encuentran dentro del Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Hymenoptera, Familia Apidae y género *Apis*. Dicho género está conformado por otras 8 especies: *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. florea*, *A. nigrocincta*, *A. koschevnikovi*, *A. nuluensis*, *A. andreniformis* y *A. laboriosa* (Garnery et al., 1991; Koeniger & Koeniger, 2000; Franck et al., 2000; Le Conte & 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 de los cuatro linajes principales (A, C, M y O) y algunas subespecies de *A. mellifera*. 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 & 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 linajes evolutivos de *A. mellifera* propuesta por Dogantzis et al. (2021) (izquierda). Reconstrucción filogenética obtenida por estos autores a partir del análisis de muestras de 18 subespecies de *A. mellifera* (derecha).

#### I.G. 1.4. Introducción de *A. mellifera* 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 Domínicos 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 (Bierzychudek, 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 & 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 generar híbridos con abejas de origen europeo que estuvieran mejor adaptados al clima tropical-subtropical (Kerr et al., 1970, 1982; Bierzychudek, 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), dando lugar al proceso conocido como “africanización”, que continúa hasta la actualidad (Winston et al., 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 (De Santis & 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 de la especie**

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, el rendimiento de algunos cultivos de frutas, semillas y frutos secos disminuye en más de un 90% sin los servicios de polinización de las abejas melíferas (Southwick & 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 & 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 de miel como país productor y exportador de miel con altos estándares de calidad, dado que el destino principal de la producción es la exportación (SENASA, 2016; 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). Se cuenta en todo el país, 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 ha 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 & 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).

### I.G. 1.6. Sobre los patógenos de *A. mellifera* 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). Numerosas publicaciones científicas han demostrado una mayor presencia y carga de patógenos en colmenas colapsadas en relación a colmenas sobrevivientes (Cepero et al., 2014; Cox-Foster et al., 2007; vanEngelsdorp et al., 2009; Liggon, 2019; Flores et al., 2021). 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 la 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 & Genersch, 2010).

Dos enfermedades bacterianas de las abejas melíferas 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 al ingerir alimentos contaminados con esporas de *P. larvae*, y los restos de larvas infectadas muertas contienen miles de millones de esporas infecciosas que pueden permanecer en el medio ambiente durante décadas y servir como fuentes de nuevas infecciones (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. La bacteria se multiplica en el intestino medio y las larvas infectadas suelen morir después de cuatro o cinco días (Forsgren, 2010; Genersch, 2010b).

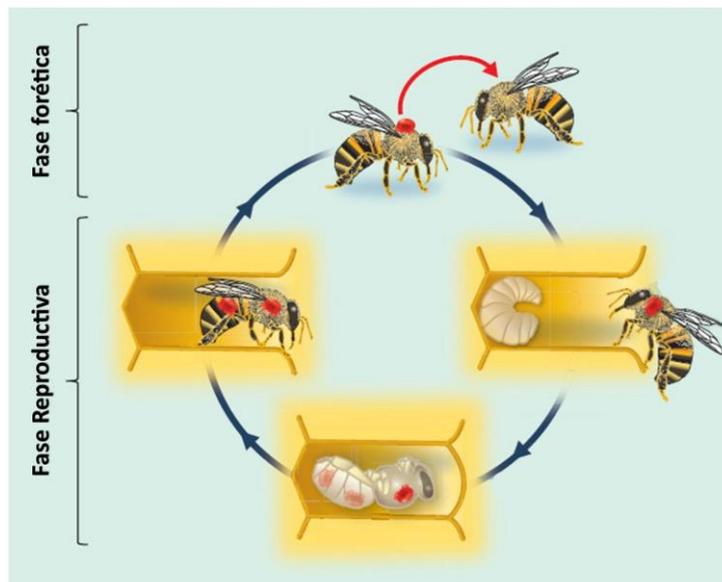
La nosemosis es también una grave enfermedad que afecta el tracto digestivo de todos los adultos de la colonia (reina, obreras y zánganos) (Fries, 2010; revisado por Galajda et al., 2021). Se presenta en casi todos los países con prácticas apícolas y disminuye negativamente la productividad y la supervivencia de las colonias de abejas melíferas, principalmente en climas templados (Higes et al., 2008; Botias et al., 2013; revisado por Marín-García et al., 2022). Dicha enfermedad genera disminución de los niveles de proteínas y ácidos grasos en la hemolinfa de las abejas (Chen et al., 2009; Gajger et al., 2009) y puede reducir la longevidad de las obreras entre un 22% y un 44% (Aydin et al., 2006; Lotfi et al., 2009). *Nosema apis* y *Nosema cerana* son considerados los agentes etiológicos de la enfermedad. Las formas infecciosas de estos parásitos intracelulares son las esporas, que son ingeridas por las abejas durante la alimentación de miel, polen o agua contaminada. El uso de medicamentos convencionales (ej. antibióticos) aplicados en la apicultura para controlar la enfermedad tiene una fuerte limitación debido a la generación de resistencia a los principios activos, la contaminación de los productos de la colmena con residuos y, en menor medida, el riesgo de

desequilibrio de la microbiota intestinal de las abejas (revisado por Formato et al., 2022). 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* (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. *Varroa destructor*

### I.G. 2.1. Ciclo de vida

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; Nazi & 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 Nazi & Le Conte (2016).



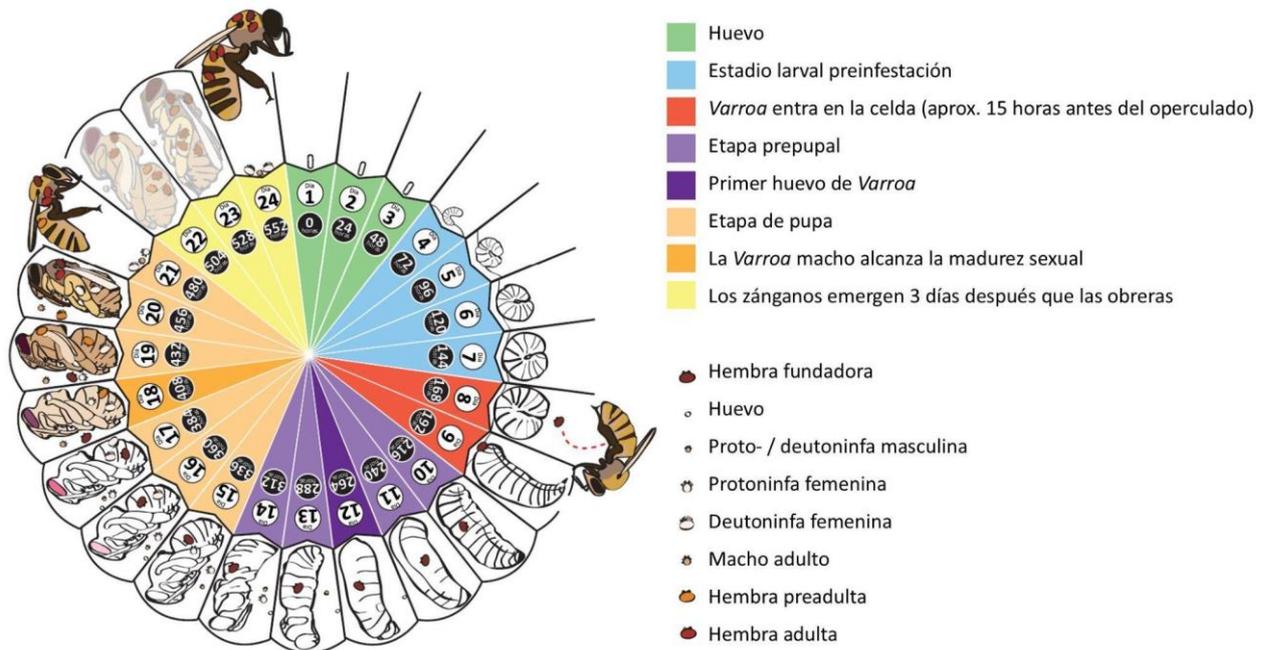
**Figura 10.** *V. destructor* en estado forético (izquierda). Morfología externa de hembras, machos y estadios inmaduros del ácaro (derecha): de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo: hija madura, madre o hembra fundadora, hija inmadura (deutoninfa) y macho maduro. Fotografía extraída de Rosenkranz et al. (2010).

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). Los ácaros muestran una tendencia a parasitar abejas nodrizas, que son reconocidas en base a diferentes hidrocarburos cuticulares (Le Conte et al., 1990; Kraus, 1993; Kuenen & Calderone, 1997; Aumeier et al., 2002). El reconocimiento y elección de las abejas nodrizas por parte de los ácaros constituiría una estrategia adaptativa que aumenta su éxito reproductivo, ya que son las abejas nodrizas quienes están en contacto permanente con las celdas de cría no operculada mediante su alimentación (Fernández et al., 1993; Kuenen & Calderone, 1997) y posibilitarían así, la entrada efectiva de las hembras fundadoras a estas celdas.

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), respirando a través de su peritrema, el órgano respiratorio de los ácaros Gamásidos (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.

Aproximadamente 5 horas después del operculado de la celda, la prepupa ya ha consumido el resto del alimento disponible (Ifantidis, 1988), se ha extendido a lo largo de la celda y ha formado un capullo (revisado en Rosenkranz et al., 2010). Durante esta etapa, el ácaro trepa por la prepupa y perfora un agujero relativamente grande (100  $\mu\text{m}$ ) en la cutícula del quinto segmento de la abeja para crear un

sitio de alimentación para ella y la futura descendencia (Donzé & Guerin, 1994; Kanbar & 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 & Cook (2018).

La alimentación de los cuerpos grasos de las larvas hospedadoras es un requisito para la reproducción de *V. destructor* (Ramsey et al., 2019). Además, las señales de la celda y la larva desencadenan la ovogénesis y luego la previtelogénesis, la vitelogénesis y la embriogénesis intraovárica en la hembra fundadora (Steiner & Diehl 1994; Steiner et al., 1994; 1995; Steiner 1995; Garrido et al., 2000). Iniciar la oviposición es una tarea energéticamente exigente, y las hembras fundadoras obtienen esta energía metabolizando este tejido consumido de las abejas. Recientemente, estudios proteómicos (McAfee et al., 2017) y transcriptómicos (Mondet et al., 2018) identificaron una caída en la expresión de las enzimas que metabolizan los carbohidratos durante la puesta de huevos y una regulación positiva antes y después de la esta etapa (Mondet et al., 2018). Este patrón de expresión coincide con los períodos de transferencia de nutrientes no metabolizados desde el huésped y la hembra fundadora al huevo (Tewarson, 1982; Dittmann & Steiner, 1997). En esencia, los huevos de *V. destructor* contienen proteínas de la abeja que evitaron la digestión y pasaron a través del ácaro sin ser metabolizadas por

las enzimas catalíticas. La hembra fundadora también requiere algunas proteínas y hormonas larvarias para iniciar la puesta de huevos (Tewarson, 1982; Conlon et al., 2019). Se especula que las hembras fundadoras secuestran moléculas del hospedador en sus huevos, mientras que la abundancia máxima de enzimas antes y después de la oviposición cubre las demandas energéticas de la producción de huevos. Estas observaciones indicarían que hay un complejo sistema de transporte y secuestro de nutrientes del tejido de las abejas a través de la hembra fundadora hasta sus huevos (revisado en Traynor et al., 2020).

La determinación del sexo en *V. destructor* se realiza mediante partenogénesis arrenótoca: los machos son haploides con siete cromosomas, mientras que las hembras son diploides con 14 cromosomas (revisado en Traynor et al., 2020). La hembra fundadora deposita el primer huevo haploide, que dará origen a un macho, aproximadamente 60-70 horas después de la invasión de la celda de cría (Donzé & Guerin, 1994). A partir de ese momento, la hembra fundadora pone un huevo diploide cada 30 horas, que dará origen a hembras hijas (Rehm & 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 & Ritter, 1989; Ifantidis, 1990; Martin, 1994; Donzé & Guerin, 1994). Ambos estadios ninfales se dividen en una fase móvil y otra inmóvil justo antes de la muda (Donzé & Guerin, 1994; Ifantidis, 1983; Laurent & Santas, 1987).

Los ácaros presentan un claro dimorfismo sexual (Ifantidis, 1983). Los machos son más pequeños que las hembras durante todo el desarrollo ontogenético y tienen patas más largas en relación con el tamaño del cuerpo (Figura 10). Las hembras cambian durante su desarrollo de una forma corporal oblonga a una elíptica transversal; las deutoninfas ya exhiben la forma final del cuerpo. En la etapa de deutoninfa, en la periferia del opistosoma, la coloración comienza a cambiar a un color marrón rojizo después de la muda de la hembra. En contraste, la forma del cuerpo del macho es triangular con un color amarillo claro (Figura 10; revisado en Rosenkranz et al., 2010).

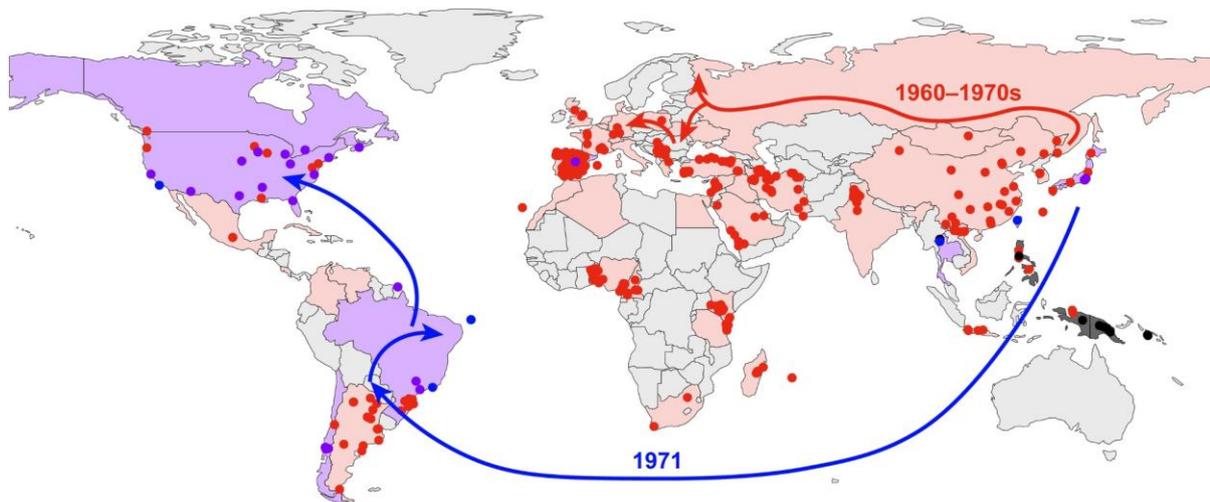
La progenie de *V. destructor* alcanza la madurez sexual inmediatamente después de la última muda. Los machos lo hacen antes que las hembras y permanecen en la pila fecal, esperando a la primera hembra adulta que mude y madure unas 20 horas después. Al comienzo del apareamiento, el macho toca a la hembra con su primer par de patas y asciende por su dorso. Luego examina el margen frontal del dorso de la hembra y se desliza hacia el lado ventral. Las hembras jóvenes facilitan esta acción levantando sus cuerpos. En esta posición, el macho busca los gonóporos (que están separados de la abertura genital donde se liberan los huevos) de la hembra que se encuentran transversalmente entre el tercer y cuarto par de patas (De Ruijter & Kaas, 1983; Alberti & Hänel, 1986). Luego saca el

espermatóforo de su abertura genital y lo transfiere al gonópodo de la hembra mediante el uso de los quelíceros. Los machos se aparean casi exclusivamente con hembras recién mudadas y dejan de aparearse con hembras mayores cuando una más joven termina su última muda adulta (Ziegelmann et al., 2013). Las hembras reciben de 30 a 40 espermatóforos a través de múltiples apareamientos con el macho dentro de la celda, que almacenan y utilizan durante su vida (Häußermann et al., 2016). 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). 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., 2019).

### **I.G. 2.2. Origen y distribución de la especie**

El ácaro *Varroa destructor* Anderson y Trueman (Acari: Varroidae) es un ectoparásito obligado de las abejas melíferas. Este ácaro, 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*, excepto por Australia, algunos territorios extremos del norte e islas remotas como los archipiélagos de Seychelles y Comoras (Figura 12) (revisado en Traynor et al., 2020).

Aún luego del cambio de hospedador, *V. destructor* era reconocido 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 & 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 & Rinderer, 1999; revisado en Navajas et al., 2010).



**Figura 12.** 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 del haplotipo J1 y K1, respectivamente. Modificado a partir de Traynor et al. (2020).

El haplotipo K alcanza actualmente una distribución prácticamente cosmopolita (Figura 12) 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 & Trueman, 2000; De Guzman et al., 1998; Garrido et al., 2003; Muñoz et al., 2008) (Figura 12).

### I.G. 2.3. Impacto de *V. destructor* 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; Nazi & Le Conte, 2016; revisado por Flores et al., 2021). Los síntomas más notables de la varroosis son debilidad de las colonias, distribución irregular de la cría operculada y 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 sanitario y nutricional de las abejas, sino que también actúa como vector biológico de patógenos virales y bacterianos (Sumpter & Martin, 2004; Antúnez et al., 2006; Martin et al., 2012; Brasco 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 y permite 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 parasitadas y activar infecciones virales (Yang & Cox-Foster, 2007).

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 & 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). En particular, la variante virulenta de DWV (tipo B) puede replicarse en ácaros (Requier & Antúnez, 2020), mientras que la transmisión de DWV tipo A ocurre de forma no propagativa (Posada-Florez 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 cree 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 & Camazine, 2001). Además, 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. 2.4. 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 & 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 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 cumafos, amitraz, flumetrina y fluvalinato (organofosforados y piretroides). Estos principios activos son aplicados tanto como productos comerciales aprobados y registrados, como productos caseros o artesanales (Eguaras & 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; Bajuk et al., 2017), constituyen 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 proceso de generación de resistencia por parte del parásito (Wallner & Fries, 2003; Maggi et al., 2009; 2010). En Italia, Francia, Israel y EE.UU 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 EE.UU también se hallaron ácaros resistentes a amitraz, cumafos y fluvalinato (Sammataro et al., 2000; 2005; Elzen & 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 del ácaro 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; 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 & 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. 2.5. Relaciones de equilibrio entre *A. mellifera* y *V. destructor***

El equilibrio en las relaciones 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 co-existencia entre ambas especies pueden ocurrir tanto en las abejas como en las poblaciones de ácaros (Fries & 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 que tienen las mismas 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 & Hänel, 1992; Boecking & Ritter, 1994).

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 a 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; Reams & 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 y conjunto de especies (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 impiden la aparición de 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 por parte del parásito (ácaros resistentes). Sin embargo, desde hace varios años, en diversas partes del mundo, se ha avanzado en la identificación y selección de líneas de abejas melíferas con rasgos de resistencia a *V. destructor*, que logran limitar el crecimiento poblacional del ácaro dentro de las colonias, o tolerancia a la parasitación, mediante una compleja relación hospedador-parásito que lleva al mantenimiento de altas cargas parasitarias sin desmedro de la salud de las abejas (Le Conte et al., 2007; Roberts et al., 2020; revisado en Mondet et al., 2020). En Argentina, tanto en climas templados como subtropicales se han caracterizado stock de abejas resistentes (Merke, 2016; Russo et al., 2020) y tolerantes (Bianchi et al., 2021) al ácaro que resultan insumos clave para los programas de mejoramiento apícola. Mientras muchos estudios están enfocados en la salud, mejoras de manejo apícola e impacto económico de la varroosis (revisado por Jack & Ellis, 2021), hay aún una gran necesidad de conocimiento sobre la historia de vida de *V. destructor* en las colonias de *A. mellifera* (Reams & Rangel, 2022). En este sentido, el estudio detallado de la dinámica de la interacción entre este parásito y su hospedador es fundamental para avanzar en el conocimiento de esta compleja relación y favorecer al desarrollo de un control integrado del ácaro en las colmenas de *A. mellifera*, que pueda ser adaptado a la particularidad de cada ambiente y región apícola.

# Objetivos e hipótesis

## **Objetivo general**

El presente plan de trabajo propone estudiar la interacción entre *Apis mellifera* y su principal patógeno, *Varroa destructor*, con el fin de aportar conocimientos sobre los factores que la modulan y los mecanismos genético-moleculares vinculados a la reproducción del ácaro sobre su hospedador. Dicha información permitirá profundizar el conocimiento sobre la relación parásito-hospedador y aportar al desarrollo de técnicas integradas de control no contaminantes que minimicen el impacto de la varroosis, contribuyendo a la sanidad de las colmenas de *A. mellifera* y al crecimiento de la apicultura local.

## **Objetivos específicos**

- 1) Caracterizar a nivel genético, poblacional y comportamental colonias de *A. mellifera* establecidas en clima templado y en condiciones de parasitación natural con *V. destructor*.
- 2) Caracterizar la genética y la dinámica poblacional de *V. destructor* presente en dichas colonias.
- 3) Analizar la variabilidad genética de poblaciones de *V. destructor* presente en colmenas de *A. mellifera* de distintas regiones apícolas de Argentina.
- 4) Identificar y analizar los patrones de expresión de genes potencialmente involucrados en el éxito reproductivo de *V. destructor* dentro de las celdas de cría de *A. mellifera*.
- 5) Evaluar el impacto del silenciamiento de genes candidatos sobre la reproducción y mortalidad de *V. destructor* en celdas de cría de *A. mellifera*.

## **Hipótesis**

- 1) Las colonias de *A. mellifera* bajo estudio presentan variación fenotípica en el comportamiento de higiene hacia celdas de cría parasitadas con *V. destructor*.
- 2) La dinámica poblacional y reproductiva de *V. destructor* es similar en las colonias de *A. mellifera* bajo estudio y presenta variación estacional acorde a lo esperado para climas templados.
- 3) Es posible analizar los principales factores involucrados en la interacción *A. mellifera* - *V. destructor* mediante la caracterización de la dinámica poblacional de las colonias y del ácaro presente en las mismas.
- 4) Las poblaciones de *V. destructor* que infestan colonias de *A. mellifera* establecidas en distintas regiones de Argentina presentan variabilidad genética detectable mediante el análisis de marcadores mitocondriales.

5) Existen genes de *V. destructor* que se expresan diferencialmente entre ácaros reproductivos y no reproductivos, que están involucrados en su éxito reproductivo y que es posible identificarlos mediante un análisis de transcriptoma.

6) El silenciamiento por RNAi de genes candidatos asociados a la reproducción de *V. destructor* interfiere en la capacidad reproductiva del ácaro.

## Nota del Tesista

La concepción de la presente Tesis Doctoral resulta de la búsqueda de antecedentes y visualización de vacancias del conocimiento sobre la relación hospedador-parásito en el modelo *Apis mellifera: Varroa destructor*. En función de estos conceptos organicé la presentación de los resultados en diferentes secciones. En los capítulos que se desarrollan a continuación, y en función de los objetivos propuestos, presentaré los antecedentes, explicaré las aproximaciones utilizadas y metodologías aplicadas, y analizaré los principales resultados obtenidos. En el primer capítulo, comenzaré analizando y discutiendo los resultados de la caracterización poblacional, genética y comportamental de colonias de abejas melíferas establecidas en clima templado, y analizaré la dinámica de las poblaciones de *V. destructor* asociadas. Esta información es relevante para profundizar el conocimiento de la interacción entre el parásito y su hospedador, para determinar si las colonias se comportan de forma homogénea frente a la parasitación y si el ácaro presenta variación en su comportamiento reproductivo dentro de las celdas de cría de las abejas en esta región agroecológica. Estas colonias y las poblaciones de *V. destructor* asociadas serán el material que analizaré en los capítulos tres y cuatro de la Tesis. En el capítulo dos, me concentraré en el análisis de la variabilidad genética de *V. destructor* en la población de clima templado mencionada y en otras 9 poblaciones localizadas en diferentes regiones agroecológicas de Argentina dedicadas a la actividad apícola. Principalmente analizaré poblaciones del ácaro asociadas a colonias de abejas establecidas en regiones de climas subtropical y templado. Mediante la aplicación del marcador mitocondrial *cox1*, ampliamente usado para la determinación del haplotipo de *V. destructor* en poblaciones de todo el mundo, y el desarrollo de nuevos marcadores (*nd4*, *nd4L* y *nd5*), determinaré el linaje mitocondrial y evaluaré la existencia de posibles polimorfismos presentes en nuestras poblaciones, información clave para iniciar el estudio del impacto de dicha variación sobre fenotipos de interés como el éxito reproductivo o la virulencia del ácaro. Los análisis de variabilidad genética se complementarán con estudios de genes intervinientes en la reproducción de *V. destructor* dentro de las celdas de cría de abejas. Presentaré en el capítulo tres, los principales resultados del análisis transcriptómico de grupos de ácaros reproductivos, no reproductivos y foréticos, identificando genes diferencialmente expresados entre estas condiciones y rutas metabólicas involucradas tanto en la reproducción como en la transición de fases del ciclo de vida de *V. destructor*. La información generada en este capítulo será el insumo fundamental para los ensayos de qPCR y silenciamiento génico que presentaré en el cuarto y último capítulo. En éste detallaré la metodología de silenciamiento génico mediante RNA de interferencia aplicada para disminuir la expresión de seis genes candidatos asociados al éxito reproductivo del ácaro y evaluar el efecto fenotípico del mismo. Los resultados de este capítulo sentarán las bases para iniciar estudios funcionales de estos genes, y explorar las vías metabólicas involucradas en la reproducción exitosa de

*V. destructor* dentro de la celda de cría de la abeja. Hacia el final de la tesis, presentaré 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. Espero que la información aquí generada contribuya a aumentar nuestro conocimiento sobre este complejo sistema de estudio y en un futuro, a minimizar el impacto de la infestación en las colonias de *A. mellifera* en clima templado y promover el desarrollo apícola en nuestro país.

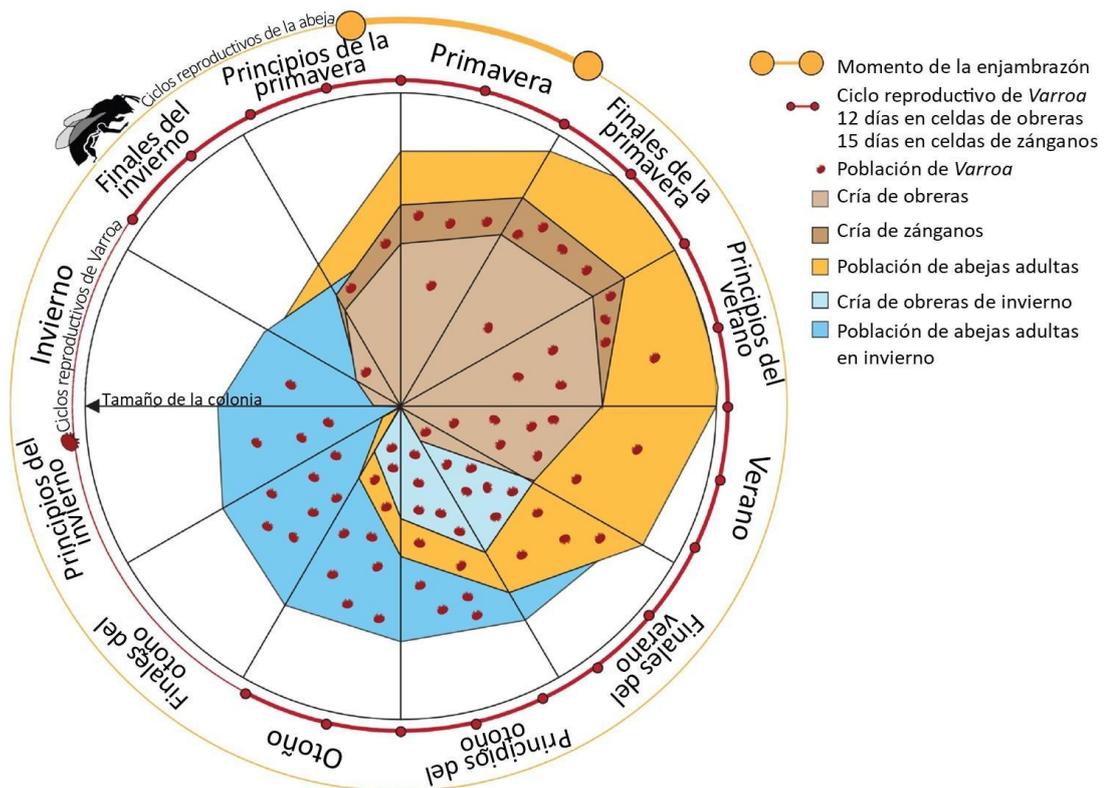
Capítulo 1. Caracterización genética y  
comportamental de colonias de *Apis mellifera*  
en condiciones de parasitación natural con  
*Varroa destructor*

## 1.1. INTRODUCCIÓN

### 1.1.1. Dinámica de poblaciones de abejas y ácaros 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 & Otero Colina, 1995; Fries & Rosenkranz, 1996; Wilkinson & Smith, 2002; Russo et al., 2020; 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 & García Fernández, 1994; Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020), y las variaciones en el microambiente de la colonia pueden influir en su reproducción y así en el crecimiento de sus poblaciones (Eguaras & 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 & 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 13). Sin embargo, esta tendencia, puede cambiar de acuerdo a 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 & Engels, 1994; Guzman-Novoa et al., 1999; Mondragon 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, Garcia Fernández et al., 1995, Moretto et al., 1991; Rosenkranz et al., 2006).



**Figura 13.** 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 medida que aumentan los niveles de ácaros, una sola celda puede ser co-infestada por múltiples hembras fundadoras, con lo que la tasa de reproducción de cada una se reduce, pero la tasa de producción de hembras hijas fecundadas aumenta. 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 13). 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 and Genersch, 2008; Neumann et al., 2012; Van Dooremalen et al., 2012). El impacto negativo se profundiza si la presencia del parásito en las colonias hacia el final del otoño es elevada, afectando en última instancia a las poblaciones de 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 nocivo 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).

### **1.1.2. Caracterización genética de poblaciones de *A. mellifera***

Los estudios morfológicos, particularmente sobre la morfometría alar, realizados en *A. mellifera* han permitido estudiar la diversidad en la especie, que ha sido profundizada con el uso de las herramientas moleculares. Estas últimas han resultado útiles para realizar estudios detallados sobre la variabilidad genética, origen geográfico y patrones de dispersión de la especie. 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 & Cornuet, 1994) y han permitido confirmar la presencia de distintos linajes evolutivos (Arias & 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 estructura poblacional de las colonias de *A. mellifera* en América. Si bien originalmente las abejas que ingresaron al continente americano eran europeas (Hall & 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 & Sheppard, 1993; Sheppard et al., 1999; Agra, 2018; Agra et al., 2018; Calfee et al., 2020), evidenciado mediante la aplicación de estas herramientas.

En los últimos años se han comenzado a utilizar herramientas genómicas que han permitido obtener una mejor comprensión de la diversidad genética de las distintas subespecies de *A. mellifera* y abren las puertas a una nueva era de estudio de genes y genomas en la especie. Desde la publicación del genoma completo de *A. mellifera* (Weinstock et al., 2006) hasta la utilización de cambios puntuales en el ADN, el desarrollo de marcadores SNPs (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) (Whitfield et al., 2006; Chavez-Galarza et al., 2013) y la secuenciación de nueva generación, se ha incrementado mucho la cantidad de herramientas disponibles para estudios genómicos y evolutivos en este organismo modelo (Hunt et al., 2006; Wallberg et al., 2014; Harpur et al., 2013; 2014; Grozinger & Robinson, 2015).

### **1.1.2.1 Marcadores moleculares del ADN mitocondrial**

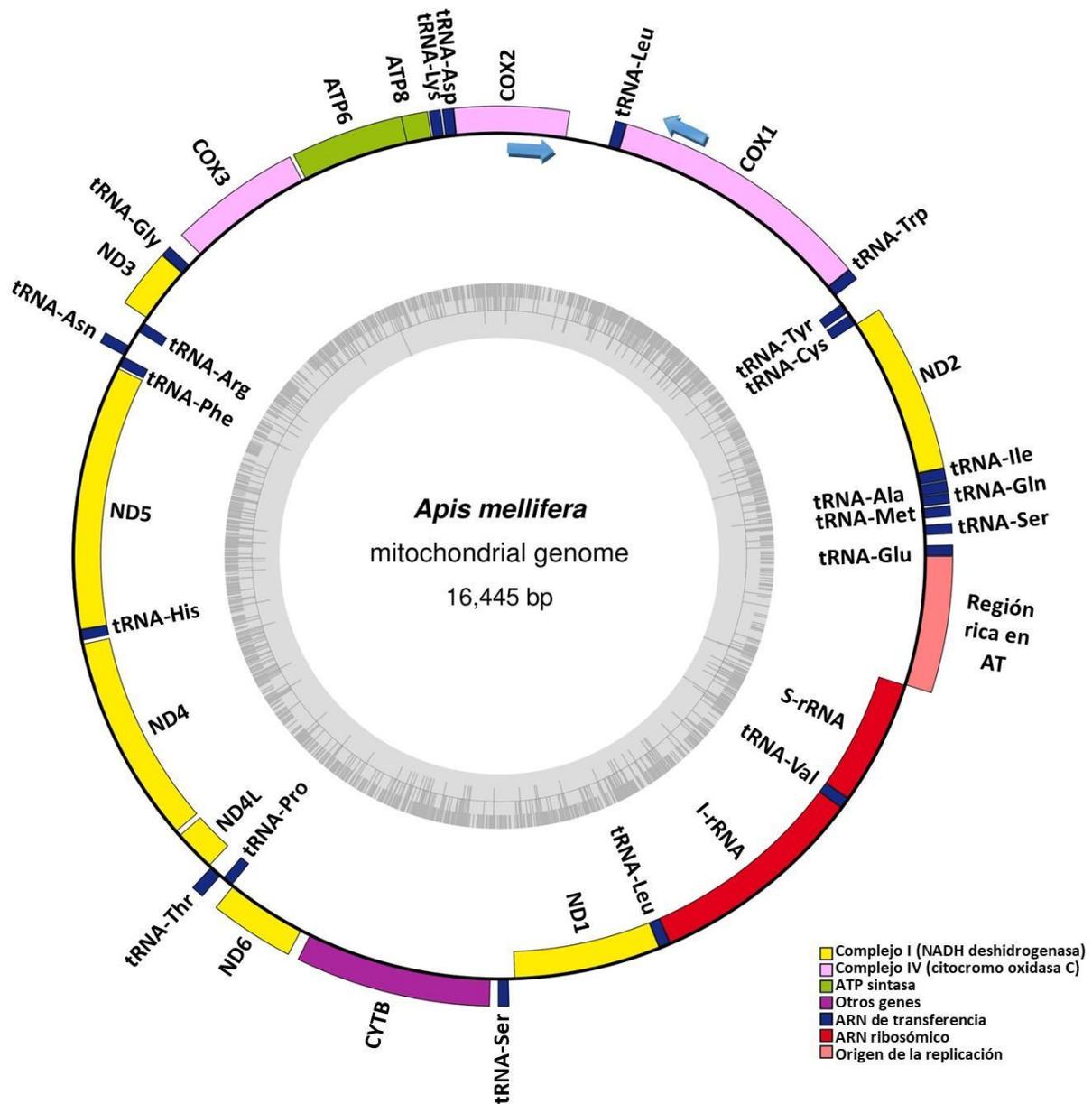
El genoma mitocondrial es una molécula circular de ADN de aproximadamente 16.000 pares de bases presente en las mitocondrias de la mayor parte de las células de los organismos animales eucariotas. Posee herencia materna, genes de copia única, ausencia de recombinación y una alta tasa de evolución (Avice et al., 1984; Simon et al., 1994). Estas características, sumadas a la gran cantidad de mitocondrias por célula, y al número de copias de genomas por mitocondria (varía entre 1000 y 10.000) facilitan su estudio desde el punto de vista metodológico y experimental. En particular para *A. mellifera*, la variabilidad genética presente en las regiones intergénicas del ADN mitocondrial (ADNmt) ha permitido detectar diferencias a nivel de subespecies (Smith et al., 1991; Arias et al., 2006).

Los principales marcadores moleculares utilizados para el análisis de variaciones en el ADNmt en abejas son: RFLP (del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), PCR-RFLP (del inglés, *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) y secuenciación directa. Las variaciones RFLP se revelan mediante la digestión de todo el genoma mitocondrial con endonucleasas de restricción. Los primeros trabajos realizados con distintas subespecies de *A. mellifera* en su lugar de origen (Smith et al., 1991; Garnery et al., 1992; Arias et al., 2006) o donde fueron introducidas (Smith & Brown, 1988; Hall & Muralidharan, 1989; Smith et al., 1989) mostraron el poder discriminativo de esta técnica y confirmaron la presencia de los tres linajes (A, C, M) previamente descritos por Ruttner (1978; 1988) mediante el uso de la morfometría. Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular modernas, el método de RFLP se ha sustituido por la técnica de PCR-RFLP, principalmente porque para implementar el primero se necesita una considerable cantidad de ADNmt no degradado y además requiere mayor tiempo de procesamiento. En ambos métodos, los haplotipos se determinan mediante el empleo de enzimas de restricción. Sin embargo, a diferencia de

la técnica de RFLP, que analiza todo el genoma mitocondrial, la variación que detecta la técnica de PCR-RFLP se revela dentro de una región específica amplificada por PCR.

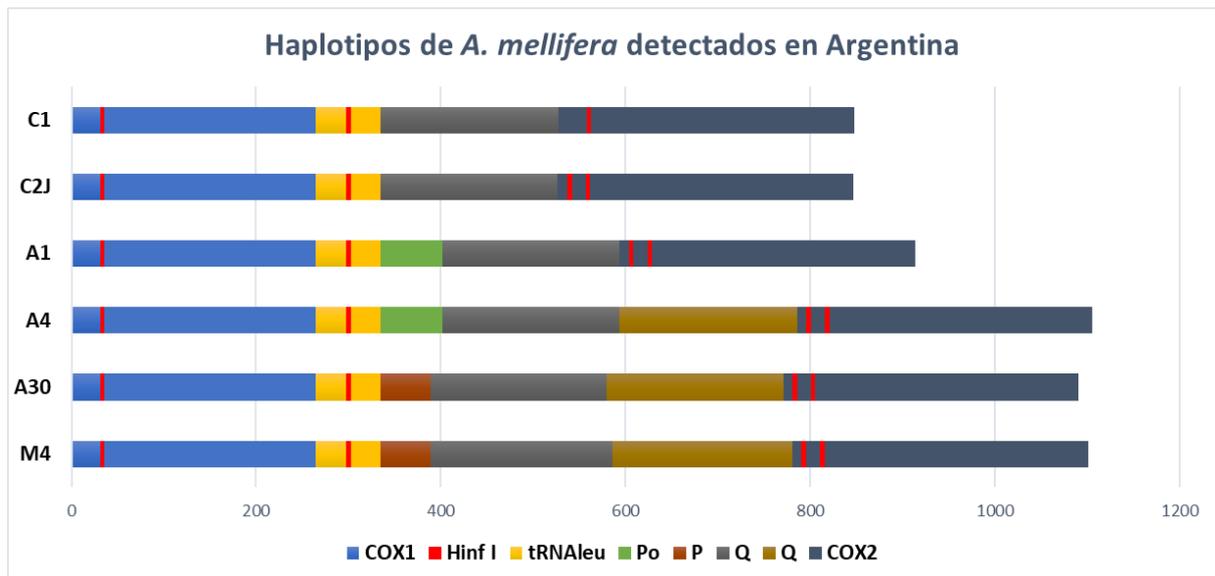
En los primeros trabajos realizados con esta técnica se utilizaron varias regiones específicas de ADN, tanto para determinar africanización en poblaciones de *A. mellifera* en América (Hall & Smith, 1991; Clarke et al., 2002; Pinto et al., 2003; 2004) o subespecies en poblaciones de *A. mellifera* de Europa del Este (Smith et al, 1997; Bouga et al., 2005; Ivanova et al., 2010; Stevanovic et al., 2010). Uno de los primeros marcadores desarrollados fue el gen *citocromo b* (*cyt b*) amplificado con cebadores que flanquean un amplicón de 485 pares de bases (pb) de longitud, junto con el uso de la enzima de restricción *Bgl* II. Este marcador determina si la muestra analizada es de origen europeo o africano, pero no discrimina las distintas subespecies y haplotipos a los que pertenecen las abejas analizadas. Este marcador se ha utilizado para determinar el grado de africanización en América (Pinto et al., 2003).

Uno de los marcadores 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*) (Figura 14). 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).



**Figura 14.** Esquema del genoma mitocondrial completo de *A. mellifera*. Con flechas azules se muestra el par de cebadores usado para amplificar la región intergénica entre los genes *citocromo oxidasa I* y *citocromo oxidasa II* (*cox1-cox2*). Para realizar el gráfico se utilizó el programa OGDRAW (Lohse et al., 2013) en base a la secuencia del genoma mitocondrial de la especie NC\_051932 (GenBank).

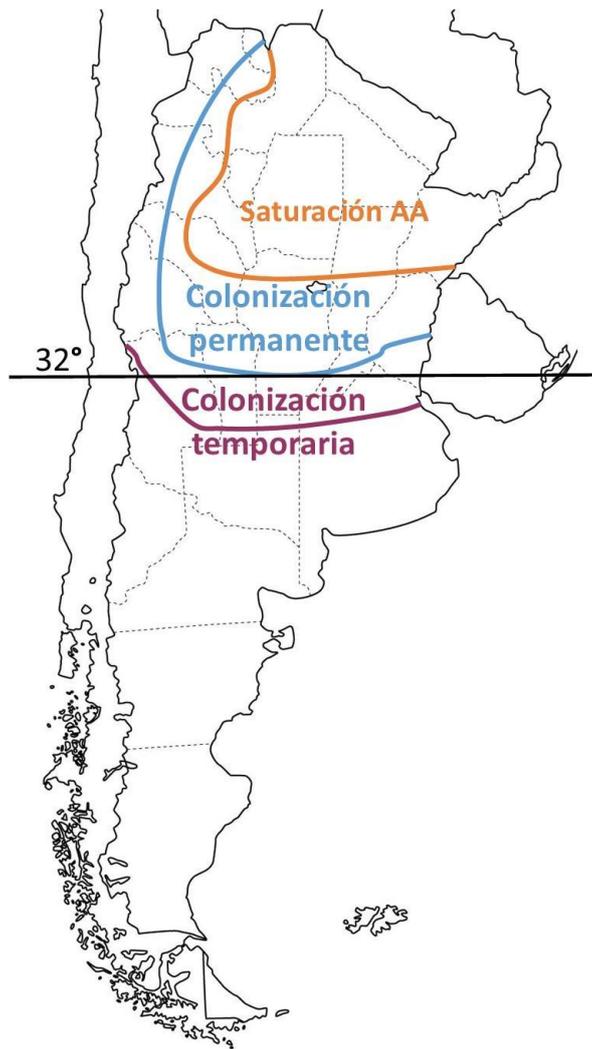
Estas secuencias acumulan gran cantidad de mutaciones, deleciones e inserciones que generan polimorfismos evidenciados en forma rápida y sencilla por medio de enzimas de restricción, entre ellas, la más utilizada es *Dra I*, pero también *Hinf I* y *EcoR1* sirven para la determinación de diferentes haplotipos.



**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*.

### 1.1.2.2 Antecedentes de caracterización genética de *A. mellifera* de Argentina

En el año 1991, Sheppard y colaboradores realizaron los primeros trabajos de caracterización molecular con el análisis del ADN mitocondrial total de abejas mediante la técnica de RFLP. Los autores analizaron muestras de abejas de la zona noreste de nuestro país, con epicentro en la provincia de Tucumán, realizando transectas en dirección sur y oeste para confirmar la presencia de africanización. 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).



**Figura 16.** 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 violeta, el límite de colonización temporaria de las AA. El paralelo 32° de latitud sur es el límite de africanización según Kerr et al. (1982).

En el año 2007, Abrahamovich y colaboradores realizaron un muestreo exhaustivo en la provincia de Buenos Aires y determinaron los haplotipos mitocondriales mediante la técnica PCR-RFLP, analizando la región *cox1-cox2* con la enzima de restricción *Dra* I. Estos autores reportaron que el 92% de las colonias muestreadas pertenecían al linaje C (principalmente el haplotipo C1, descripto para *A. m. ligustica*) y el 2,86% al linaje M (identificando los haplotipos M2, M3 y M6), lo que indicaría la presencia de las subespecies *A.m. melifera* y *A. m. iberiensis*, esta última proveniente del norte de la península ibérica. Por último, los autores detectaron que un 5,02% de las muestras correspondía al linaje A, con 4 haplotipos descriptos: A1 y A4, que son típicos de *A. m. scutellata* (especialmente A4) y A8 y A11,

que indican la presencia de *A. m. iberiensis* (del sur de la península ibérica) y subespecies del norte africano. Si bien todos estos hallazgos fueron fundamentales para una primera caracterización de las poblaciones de *A. mellifera* de nuestro país, no fue hasta el año 2018, en que 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 y colaboradores (2018) 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), que se distribuyen en diferentes frecuencias de acuerdo a la región analizada. 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).

### 1.1.3. 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 & 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 comportamental, y la recolección y uso de las resinas con capacidad antimicrobiana dentro la colmena (Cremer et al., 2007; Evans & Spivak, 2010; Simone et al., 2009; Wilson -Rich et al., 2009; de Roode & Lefèvre, 2012).

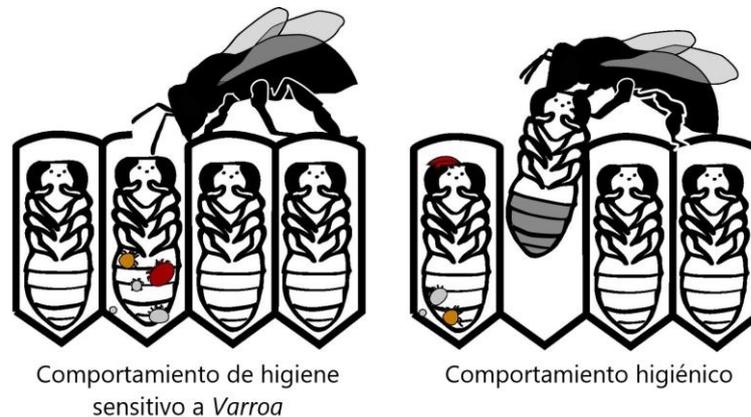
El **comportamiento higiénico (CH)** se refiere a la capacidad de las abejas obreras para detectar y eliminar la cría enferma o muerta de la colmena (Figura 17), limitando de esta manera la transmisión de la enfermedad (Rothenbuhler, 1964; Spivak, 1996; Spivak & Gilliam, 1998 a, b; Boecking & Spivak, 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 & Gilliam, 1998a, b; Spivak & Reuter, 2001a) y varroosis (Rath & Drescher, 1990; Spivak, 1996; Spivak & Gilliam, 1998). En efecto, representa

el principal carácter utilizado para la cría selectiva de abejas europeas resistentes a *Varroa* (Spivak & Reuter, 1998; Ibrahim & Spivak, 2006; Harris, 2007; revisado en Mondet et al., 2020).

Las colonias de abejas muestran variabilidad en la expresión de este comportamiento (Pérez-Sato et al., 2009; Bigio et al., 2014). Estas diferencias pueden explicarse por la rapidez con la que las abejas de una colonia detectan la presencia de crías enfermas en el nido (Palacio et al., 2010). Aunque todas las abejas obreras de la colonia son capaces de detectar y eliminar la cría enferma (revisado por Cremer, Armitage & Schmidt-Hempel, 2007; Wilson-Rich et al., 2009), sólo las colonias con abejas que lo hacen de forma rápida y, por tanto, eficiente, limitan la transmisión de la enfermedad (Gramacho & Spivak, 2003). En efecto, una colonia tiene un fenotipo higiénico cuando más del 50% de las abejas son higiénicas, y un mayor porcentaje de estas abejas en la colonia resulta en una mayor eficiencia en el desempeño del comportamiento (Arathi & Spivak, 2001; Palacio et al., 2010). Además, las abejas higiénicas de colmenas de alto CH muestran una mayor eficiencia, precocidad y persistencia temporal en la limpieza de celdas con cría anormal (Scannapieco et al., 2016), y pueden modular el grado de realización del comportamiento dependiendo de la composición genética de la colonia (Arathi & Spivak, 2001; Borsuk, 2009). Así, los efectos combinados e interactivos de abejas individuales con diversas propensiones genéticas para detectar y eliminar la cría enferma afectan a la expresión del comportamiento higiénico a nivel de la colonia (Pérez-Santo et al., 2009).

En relación a las bases genéticas del CH, Lapidge et al. (2002) mediante un trabajo pionero de mapeo de QTL (loci de carácter cuantitativo) encontraron que dicho comportamiento tendría una herencia cuantitativa multigénica y que casi el 80% de la variación en el mismo podía ser explicada por el efecto combinado de siete loci. Por su parte, Oxley et al. (2010) encontraron tres QTL que explican parte de la variación del CH y propusieron varios genes candidatos a participar en la percepción olfativa, el comportamiento de aprendizaje y el ritmo circadiano de locomoción. Posteriormente Tsuruda et al. (2012) no confirmó una asociación entre abejas con alto CH y los QTL previamente identificados (Oxley et al., 2010), sin embargo, identificó 39 genes diferencialmente expresados entre abejas de alto y bajo CH. En línea con estos resultados, Guarna et al. (2015) detectaron marcadores proteicos involucrados en la percepción de los estímulos químicos y en la transmisión nerviosa que estarían asociados al CH hacia el ácaro. Más recientemente, se identificaron cinco genes involucrados en la percepción y procesamiento olfativo que se expresan diferencialmente entre abejas de alto y bajo CH de colmenas argentinas usadas en apicultura (Scannapieco et al., 2017). Todos estos avances evidencian que genes asociados a la olfacción poseen un rol central en la regulación del CH y apoyan el estatus de este carácter como blanco de selección clave en programas de mejoramiento genético que buscan contar

con líneas de abejas resistentes a *V. destructor* y otras enfermedades de la cría (revisado en Guichard et al., 2020).



**Figura 17.** Representación esquemática del comportamiento higiénico, mecanismo general de higiene hacia enfermedades de la cría de *A. mellifera* y del comportamiento de higiene sensitivo a *Varroa* (VSH, del inglés *Varroa Sensitive Hygiene*). Modificado a partir de Traynor et al. (2020).

La conducta higiénica de las abejas, más allá de estar determinada genéticamente, puede ser modulada por diversos factores, que influyen aisladamente o integrados en dicho mecanismo, permitiendo diferentes niveles de eficiencia en la detección y remoción de crías “anormales”. Los factores ambientales influyen significativamente en la respuesta higiénica de las abejas. Al respecto, Momot y Rothenbuhler (1971) observaron que ante la falta de entrada de néctar se reduce la respuesta higiénica en colmenas de *A. mellifera*. Otros factores ambientales como la temperatura y la humedad también resultan relevantes en la eficiencia de este comportamiento (Message & Gonçalves, 1980, citado por Sanabria, 2007). Asimismo, la expresión del CH higiénico depende de la fortaleza poblacional y la composición de las obreras dentro de la colonia (Spivak & Gilliam, 1993; Scannapieco et al., 2016; ver Spivak & Danka, 2021 para una revisión).

El **comportamiento VSH** (de sus siglas en inglés, *Varroa Sensitive Hygiene*) es un comportamiento higiénico específico hacia *V. destructor*, que resulta en una disminución del éxito reproductivo del ácaro en las celdas de cría de las abejas. Se ha planteado que el mecanismo por el cual las colmenas VSH limitan la reproducción de *V. destructor* sería un tipo de comportamiento higiénico dirigido específicamente hacia celdas de cría que contienen ácaros reproductivos, obviando las celdas de cría parasitadas con ácaros no reproductivos (Harris, 2007; Harbo & Harris, 2009; Villa et al., 2009; 2016) (Figura 17). La posible asociación entre el CH y el VSH ha sido discutida en estos últimos años, con

evidencias no concluyentes. Mientras que algunos autores encontraron una correlación positiva entre los caracteres, otros autores describieron que colonias seleccionadas para un alto CH no necesariamente exhiben un alto VSH (revisado en Spivak & Danka, 2020). Hasta el momento, se considera que la evaluación de los niveles de CH (medido tradicionalmente como la remoción de crías muertas artificialmente por congelamiento o pinchado), es un punto de partida para detectar o preseleccionar colmenas con características de resistencia a *Varroa*, aspecto fundamental para avanzar en la cría selectiva de materiales apícolas promisorios y así en un control integrado de la varroosis.

En este Capítulo se presenta la caracterización genética, poblacional y comportamental de las colonias de *A. mellifera* establecidas en clima templado y de las poblaciones de ácaros asociadas. Estos materiales representan los insumos biológicos para el desarrollo de los experimentos de laboratorio, campo y semi-campo presentados en los restantes capítulos de la Tesis.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Materiales

Para la evaluación de parámetros poblacionales de *A. mellifera* y *V. destructor*, y la caracterización genética y comportamental de las colonias, se trabajó con 25 colmenas de *A. mellifera* establecidas en el apiario experimental del Instituto de Genética “E. A. Favret”, INTA (coordenadas: 34°36' 57,6"S 58°39' 26,5"O; Figura 18). Las mismas provienen de la localidad de Maciá (Entre Ríos) y fueron originalmente utilizadas con fines comerciales. Una vez establecidas en el apiario experimental, se implementó el Protocolo de Buenas Prácticas de Manejo Apícola (PROAPI - INTA) para su manejo y mantenimiento. Las colmenas mostraron una rápida adaptación al clima y a los recursos alimenticios de la zona. El apiario se encuentra ubicado en clima templado y su paisaje corresponde a una zona periurbana (Figura 18).



**Figura 18.** Fotografía del Apiario Experimental del Instituto de Genética de INTA (Hurlingham, provincia de Buenos Aires) (arriba). Imagen satelital con la ubicación del apiario y los alrededores (abajo).

## 1.2.2. Métodos

### 1.2.2.1. Evaluación de parámetros poblacionales de *A. mellifera*

Se evaluó la evolución poblacional de las 25 colonias de *A. mellifera* durante dos temporadas consecutivas (2016-2018). Durante este período, se registró mensualmente (septiembre-mayo) la cantidad de cuadros cubiertos con abejas (estimador del tamaño poblacional o fortaleza de las colonias). Dichas estimaciones se realizaron por observación directa inmediatamente después de la apertura de la colmena, evitando de esta manera que las abejas se dispersaran. Cada colmena se categorizó de acuerdo a 3 condiciones poblacionales: categoría I (8 a 10 cuadros cubiertos con abejas), categoría II (5 a 7 cuadros cubiertos con abejas) y categoría III (1 a 4 cuadros cubiertos con abejas) (Figura 19).

Los datos de fortaleza poblacional (medidos en categorías) se analizaron mediante el uso de un modelo lineal mixto general (GLMM) con una función binomial o de distribución y enlace logit (con cota en 3) considerando la temporada y el mes como factores fijos, y la colonia como factor aleatorio. Se utilizaron razones de probabilidad (*odds ratios*) para comparar las categorías. Una razón de probabilidades mide la asociación entre un conjunto de condiciones (factores o niveles de un factor) y un resultado al dividir las probabilidades logarítmicas de una condición por las otras (Szumilas, 2010). Se realizaron múltiples comparaciones usando la prueba de Fisher LSD ( $\alpha = 0,05$ ). En todos los casos se ensayó y analizó la dispersión de los residuos. Los residuos aleatorios se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks. Para obtener la estructura de varianza más adecuada, se utilizó el criterio de información de Akaike. Todos los análisis se realizaron utilizando la función `glmer` en el paquete R "lme4" (Bates, 2015; R Core Team, 2017).



**Figura 19.** Categorización de las colonias en función de su población de abejas adultas. La categoría I representa una estimación de la fortaleza de la colonia. Categoría I (izquierda), categoría II (centro) y categoría III (derecha).

### **1.2.2.2. Caracterización genética de las colonias de *A. mellifera***

La caracterización genética de las colonias de *A. mellifera* se realizó en dos momentos; la primera al principio del estudio (2016) y la segunda antes de iniciar los ensayos de transcriptómica y silenciamiento (2018) presentados en los capítulos 3 y 4. Se muestrearon dos abejas obreras del interior de cada colonia. 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 según el protocolo descrito por Baruffi et al. (1995) y posterior amplificación por la técnica de PCR-RFLP.

#### **1.2.2.2.1. 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 fue puesto en un microtubo de 1,5 mL, y mantenido 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 homogenización de los tejidos y se adicionó a cada tubo 200 µL más de buffer de extracción. Los tubos fueron incubados a 65 °C durante 30 minutos mediante el uso de un *heat block*. Posteriormente, se añadió 50 µL de KAc 8M a cada tubo y se mezclaron por inversión. Los tubos fueron mantenidos en hielo durante 30 minutos (incubación en frío) y luego fueron centrifugados durante 15 minutos a 14.000 rpm. Se transfirió el sobrenadante de cada tubo a otro limpio y se realizó una nueva centrifugación durante 10 minutos a 14.000 rpm. 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 a cada tubo 50 µL de NaAc 3M y 800 µL de etanol absoluto (frío), y se centrifugaron durante 10 minutos a 14.000 rpm. Luego de la centrifugación, se descartaron los sobrenadantes 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 30 µL de TE (10:1). Los tubos fueron conservados 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 bromuro de etidio (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).

#### 1.2.2.2. 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 & Smith (1991) y 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  $\mu$ L de ADN, 4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 15 $\mu$ L de mezcla de PCR. La mezcla de PCR consistió en *buffer* Idaho 1X (500 mM tris-HCl pH 8,3; 20% Sacarosa; 30 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mg/mL BSA); dNTPs 200  $\mu$ M; cebador *forward*: MTHSF 0,5  $\mu$ M; cebador *reverse*: MT2 0,5  $\mu$ M; *taq* polimerasa (Inbio Highway) 0,04 U/ $\mu$ L y H<sub>2</sub>O bidestilada hasta completar el volumen final (20  $\mu$ L). 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, las imágenes fueron capturadas con un fotodocumentador de luz UV (Syngene) y analizadas con Photoshop (Adobe Microsoft).

#### 1.2.2.3. Análisis de patrones de restricción (PCR-RFLP)

Se realizó la digestión de los productos de PCR obtenidos utilizando la enzima *HinfI* (Promega) durante 4 horas a 37 °C. Para ello se utilizaron 10  $\mu$ L de templado; 2  $\mu$ L Buffer B 10X; 0,2  $\mu$ L BSA 10 ng/mL; 0,1  $\mu$ L enzima *HinfI* (10U/ $\mu$ L) y 7,7  $\mu$ L 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, las imágenes fueron capturadas 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).

### 1.2.2.3. 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 25 colmenas de *A. mellifera* mencionadas. Dichas estimaciones se realizaron mensualmente (septiembre-mayo) durante dos temporadas consecutivas (2016-2018). De forma similar, la carga parasitaria en celdas de cría se estimó mensualmente en los momentos de la temporada con disponibilidad de cría cerrada (septiembre-marzo) durante las mismas dos temporadas. Para garantizar la supervivencia de las colmenas, se las trató anualmente (mes de mayo) con acaricidas de síntesis, según el calendario apícola (Giacobino 2015).

#### 1.2.2.3.1. Dinámica temporal de las poblaciones de *V. destructor* en abejas adultas (*Varroa* forética)

De cada colmena, se tomaron 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:  $(N^{\circ} \text{ de ácaros desprendidos} / N^{\circ} \text{ de abejas de la muestra}) \times 100$  (De Jong et al., 1982 modificada por Marcangeli, 2000; Dietemann et al., 2013).



**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 (*Varroa* en cría)

De cada colonia, se tomaron cuadros que contenían planchas homogéneas de cría operculada, de aproximadamente 16 días de edad (pupas de ojos rosados). Se abrieron, mediante el uso de una pinza de punta fina, 200 celdas de cría en forma diagonal a ambos lados del cuadro 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 (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).

### 1.2.2.3.3. Análisis estadístico

Los datos de VF y VC se analizaron mediante el uso de un modelo lineal mixto general (GLMM) con una función binomial o de distribución y enlace logit (Nº de abejas con ácaros vs. Nº de abejas sin ácaros; Nº de celdas con ácaros vs. Nº de celdas sin ácaros) considerando el mes y la temporada como factores fijos y la colonia como factor aleatorio. Se utilizó la razón de probabilidades (*odds ratio*) para comparar los datos de VF y VC entre condiciones (factores o niveles de un factor). Se realizaron múltiples comparaciones usando la prueba de Fisher LSD ( $\alpha = 0,05$ ). En todos los casos se ensayó y analizó la dispersión de los residuos. Los residuos aleatorios se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks. Para obtener la estructura de varianza más adecuada, se utilizó el criterio de información de Akaike. Todos los análisis se realizaron utilizando la función glmer en el paquete R "lme4" (Bates, 2015; R Core Team, 2017).

#### 1.2.2.4. Caracterización del comportamiento de higiene hacia el ácaro en las colonias de *A. mellifera*

Se midió el comportamiento higiénico de las abejas hacia celdas artificialmente infestadas con *V. destructor* en un subconjunto de 12 colmenas del apiario experimental del Instituto de Genética, en los meses de diciembre, febrero, marzo y abril durante dos temporadas consecutivas (2016-2018). Las mediciones del comportamiento se realizaron dos veces por mes.

##### 1.2.2.4.1. Obtención de *V. destructor* e infestaciones artificiales

Utilizando la metodología descrita en la sección 1.2.2.3.1., se analizó la carga forética de *V. destructor* en colonias establecidas en el apiario experimental del Instituto de Investigación en Tecnología de Alimentos, INTA (coordenadas: 34° 35' 56,2"S 58° 41' 00,2"O). Las colonias que presentaron una alta carga parasitaria (< 5%) fueron seleccionadas y utilizadas como dadoras de ácaros foréticos, los cuales se recolectaron mediante el método del azúcar impalpable (Dietemann et al., 2013) (Figura 22).

Brevemente, las abejas se recogieron de los panales de cría y se colocaron en un recipiente de plástico con una malla que deja pasar a los ácaros, pero no a las abejas (Figura 22). En el laboratorio, los ácaros foréticos fueron limpiados y acondicionados uno a uno con la ayuda de un pincel fino y agua destilada. Los ácaros colectados se conservaron en cajas de petri con papel de filtro húmedo y algunas larvas de *A. mellifera* (L5) sin superar la hora de tiempo (Figura 22). Los ácaros que no se podían separar a las cerdas del pincel fueron considerados insalubres y se descartaron.



Figura 22. Fotografías de la recolección de ácaros foréticos.



**Figura 22.** (Continuación) Fotografías de la recolección de ácaros foréticos mediante el método del azúcar impalpable (arriba). Ácaros acondicionados para su uso en las infestaciones artificiales (abajo).

De cada colonia se eligió un cuadro con abundante cantidad de celdas de cría (larvas L5) no operculada. Estas celdas se marcaron en una hoja de acetato transparente (mapa) para identificarlas de las celdas ya operculadas (Figura 23). Una vez obtenidos los mapas, los cuadros se volvieron a colocar en las colonias de origen. Cinco horas más tarde, se identificaron las celdas de cría recientemente operculadas y se infestaron artificialmente con un ácaro (Figura 23). Para ello, se abrió el opérculo de cada celda de cría con un bisturí y se introdujo una hembra fundadora mediante el uso de un pincel fino. Posteriormente, las celdas se cerraron empujando suavemente el opérculo y cubriendo todos los bordes de la celda. Los cuadros que contenían las celdas de cría infestadas artificialmente se colocaron nuevamente en la colonia.



**Figura 23.** Fotografía sobre el procedimiento de infestación artificial de celdas de cría de *A. mellifera* con hembras fundadoras de *V. destructor*.

#### 1.2.2.4.2. Evaluación de la remoción de celdas de cría y parámetros reproductivos de los ácaros

Once días después de la infestación artificial, se revisó cada celda y se realizó el recuento del número de celdas con cría removida. Se estimó el comportamiento higiénico hacia el ácaro mediante el cálculo del porcentaje de remoción de las celdas (número de celdas removidas sobre el total de celdas infestadas). Adicionalmente, se revisaron una a una las celdas no removidas y siguiendo la metodología descrita por Merke (2016) y Häußermann et al. (2020) se midieron los parámetros reproductivos de los ácaros: fertilidad (proporción de ácaros hembra con al menos una cría); descendencia no viable (DNV, proporción de ácaros hembra con descendencia pero sin hijas maduras); y reproducción anormal (RA, suma de la proporción de ácaros sin cría y DNV).

#### 1.2.2.4.3. Análisis estadístico

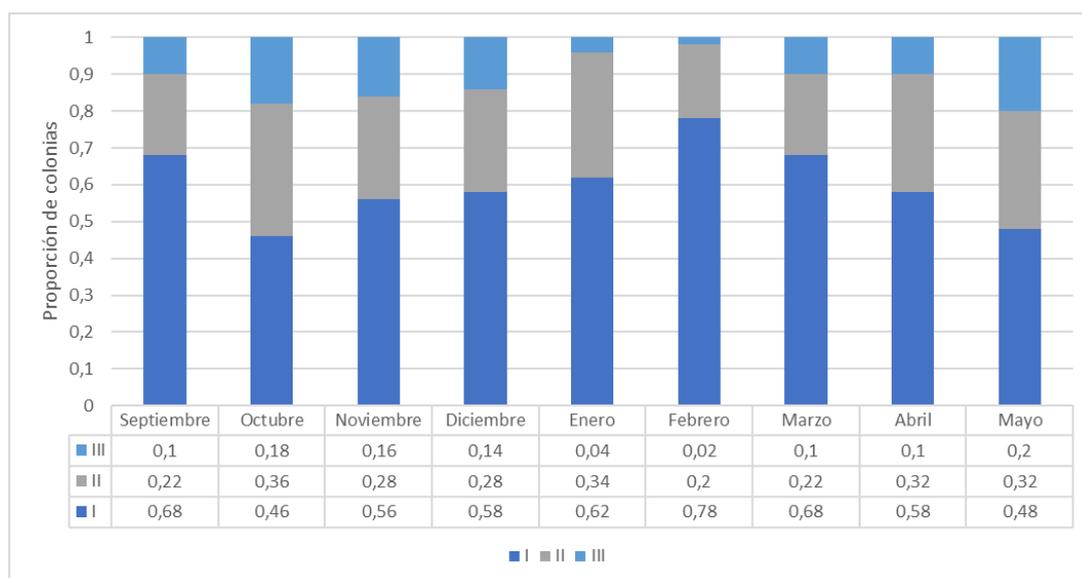
Los datos se analizaron mediante el uso de un modelo lineal mixto general (GLMM) con una función binomial o de distribución y enlace logit (celda con cría removida vs. celda con cría no removida, ácaros fértiles y ácaros sin cría, DNV vs. ácaros vivos sin DNV (ácaros sin cría + ácaros con reproducción normal) y RA (ácaros sin cría + DNV) vs. ácaros con reproducción normal) considerando la colonia y el mes como factores fijos, la categoría como una covariable y la temporada como factor aleatorio. Se utilizaron razones de probabilidad (*odds ratios*) para comparar los datos de remoción de celdas y de

reproducción del ácaro. Se realizaron múltiples comparaciones usando el test Fisher LSD ( $\alpha = 0,05$ ). En todos los casos se ensayó y analizó la dispersión de los residuos. Los residuos aleatorios se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks. Para obtener la estructura de varianza más adecuada, se utilizó el criterio de información de Akaike. Todos los análisis se realizaron utilizando la función glmer en el paquete R "lme4" (Bates, 2015; R Core Team, 2017).

### 1.3. RESULTADOS

#### 1.3.1. Evaluación de parámetros poblacionales de *A. mellifera*

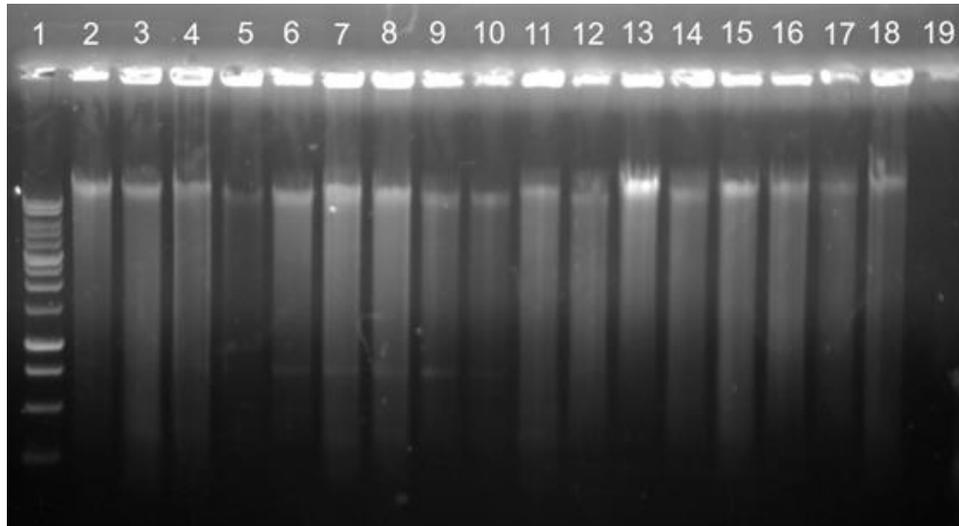
La dinámica poblacional de las colonias de *A. mellifera* estudiadas mostró un patrón similar en ambas temporadas analizadas, sin diferencias significativas entre éstas (Test de *Chi*-cuadrado;  $P=0,9396$ ; Figura Suplementaria 1). Sin embargo, fue posible detectar una variación estacional significativa en la población de abejas obreras de las colonias (Test de *Chi*-cuadrado;  $P=0,0026$ ; Figura 24). Estos resultados son concordantes con lo esperado para la dinámica estacional de las poblaciones de abejas melíferas en clima templado, donde el número de abejas obreras dentro de la colonia aumenta durante la primavera (30-55% de las colonias se encuentran en categoría II y III), llega a ser máximo en el verano (60-80% de las colonias alcanzan su máximo tamaño poblacional, categoría I), específicamente en febrero, siendo el tamaño poblacional significativamente diferente en este mes respecto de los meses de octubre y mayo ( $P=0,0055$ ; Tabla Suplementaria 1). En efecto, la probabilidad de encontrar una colonia en categoría I (altamente poblada) es máxima en el mes de febrero. Hacia el otoño, la cantidad de abejas obreras comienza a reducirse, con el 48-58% de las colonias del apiario en categoría I (Figura 24; Tabla Suplementaria 1).



**Figura 24.** Proporción de colonias de *A. mellifera* según su tamaño poblacional para cada mes evaluado. En colores se muestran las categorías de población: I (alta población), II (población media) y III (baja población). Dichas categorías son indicadoras de la fortaleza de la colonia. Se presentan los resultados de ambas temporadas en conjunto.

### 1.3.2. Caracterización genética de las colmenas de *A. mellifera*

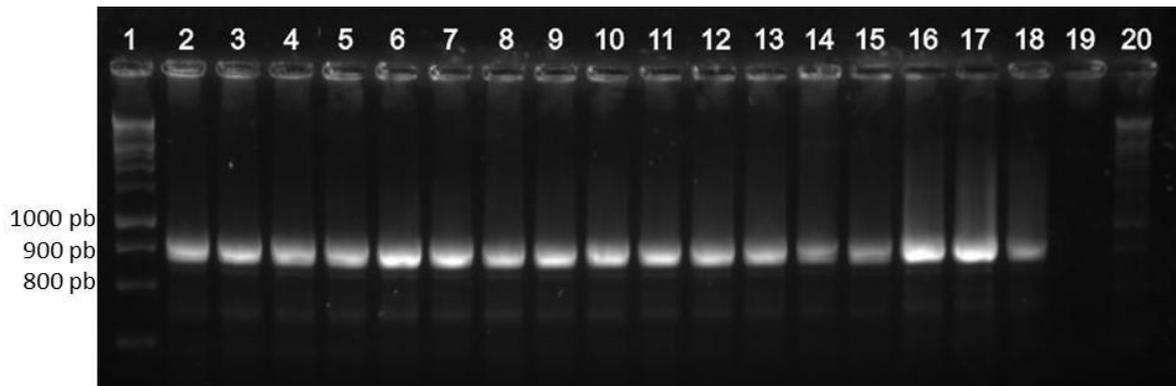
Se obtuvieron 100 muestras (dos abejas de cada una de las 25 colonias, para ambas temporadas analizadas) de ADN de abejas obreras de *A. mellifera* de calidad y cantidad óptima para los análisis de caracterización genética. Estos parámetros fueron evaluados mediante corridas en gel de agarosa 0,8% p/v (Figura 25), y la medición de la concentración e índices de calidad realizada con Nanodrop 1000 (Tabla Suplementaria 2).



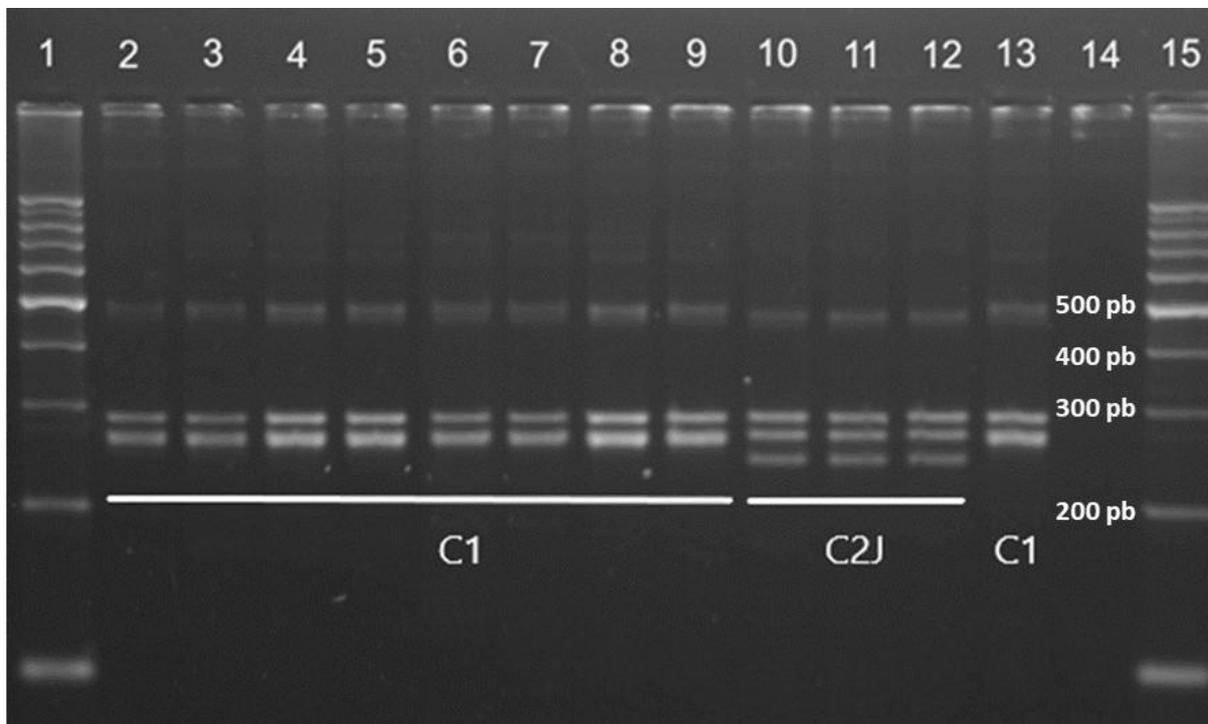
**Figura 25.** Corrida electroforética en gel de agarosa 0,8% p/v de muestras de ADN total de abejas obreras de las colonias de *A. mellifera* analizadas. Calle 1: marcador de peso molecular *DNA Ladder Solis Biodyne 100 bp* (100 pb a 3000 pb); Calles 2-18: ADN total de las muestras pertenecientes a las colonias analizadas; calle 19: Control negativo.

A partir del ADN extraído, se obtuvieron los productos de PCR correspondientes a la región intergénica *cox1-cox2*. Todas las muestras analizadas evidenciaron los fragmentos esperados de 848 y 847 pares de bases descripto para el linaje C (Figura 26), según los autores Lobo-Segura (2000) y Hall & Smith (1991).

Los patrones de bandas obtenidos luego de la digestión evidenciaron la presencia de diferente cantidad de sitios de reconocimiento de la enzima *HinfI* entre las muestras. Puntualmente se identificó la presencia de tres bandas para las muestras de las colonias 15, 16 y 17, consistentes con los tamaños de bandas esperados para el haplotipo C2J (288, 267 y 239 pares de bases), y dos bandas en las colonias 1-14 y 18-25, consistentes con los tamaños de bandas esperados para el haplotipo C1 (288 y 267-260 pares de bases) (Figura 27). Estos haplotipos fueron idénticos entre el primer análisis (temporada 2016) y el segundo (temporada 2018), indicando estabilidad en la genética del apiario.

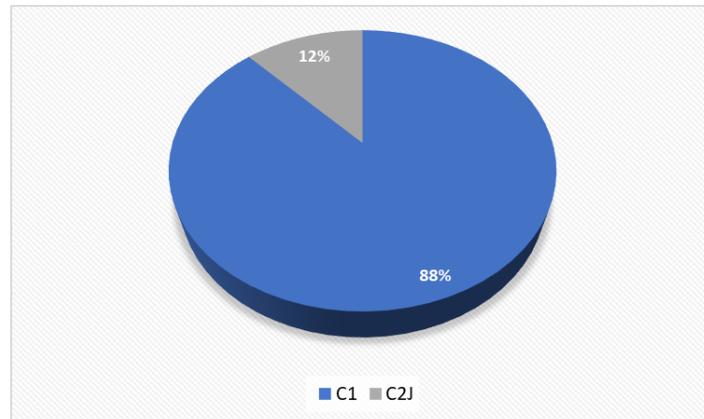


**Figura 26.** Productos de amplificación por PCR para la región mitocondrial *cox1-cox2* de muestras de abejas obreras pertenecientes a las colonias de *A. mellifera* analizadas. La fotografía corresponde a una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% p/v de los productos de PCR. Calles 1 y 20: marcador de peso molecular *DNA Ladder Solis Biodyne 100 bp* (100 pb a 3000 pb); Calles 2-18: Productos de PCR correspondientes a algunas de las colonias analizadas; calle 19: Control negativo.



**Figura 27.** 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*. Calles 1 y 15: marcador de peso molecular *DNA Ladder Solis Biodyne 100 bp* (100 pb a 1500 pb); Calles 2-9 y 13: productos de restricción de muestras pertenecientes a colonias de haplotipo C1; Calles 10, 11 y 12: productos de restricción de muestras pertenecientes a colonias de haplotipo C2J; calle 14: C-.

Del análisis de los datos obtenidos por PCR-RFLP se puede desprender que la totalidad de las colonias analizadas presentan un haplotipo mitocondrial de origen europeo. En particular, el 88% de las colonias (N=22) exhibieron haplotipo C1 y solo el 12% de las colonias (N=3) de *A. mellifera* establecidas en el apiario analizado presentaron haplotipo C2J (Figura 28).



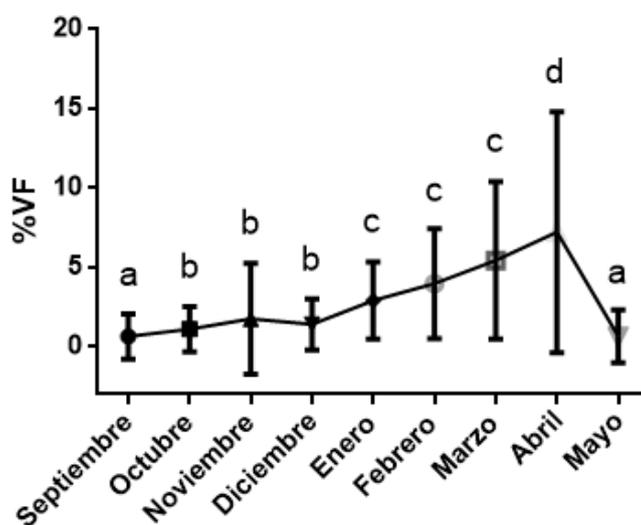
**Figura 28.** Porcentaje de haplotipos mitocondriales de *Apis mellifera* detectados en el apiario experimental analizado.

### 1.3.3. Evaluación de parámetros poblacionales de *V. destructor*

#### 1.3.3.1. *V. destructor* en abejas adultas (*Varroa forética*)

No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de parasitación entre las colonias ni entre las temporadas analizadas (Test de *Chi*-cuadrado;  $P=0,2218$ ), evidenciando una relativa homogeneidad en los niveles de parasitación dentro del apiario y entre años (Figura Suplementaria 2). De forma consistente a lo observado para la población de abejas, el patrón obtenido para las cargas foréticas del parásito en las colonias evidenció una variación estacional significativa (Test de *Chi*-cuadrado,  $P<0,001$ ) (Figura 29). En particular, durante la primavera (septiembre, octubre, noviembre) y el principio del verano (diciembre) las colonias presentaron bajos niveles de parasitación forética (con valores promedio por debajo del 1,5%). Hacia mediados y finales del verano (enero, febrero y marzo), las cargas parasitarias fueron mayores (con valores promedio de 3,82%) (Figura 29). En el principio del otoño (abril), las colonias presentaron los picos más altos de parasitación (con un valor promedio de 6,46%) (Figura 29). En efecto, la probabilidad de encontrar una abeja obrera parasitada es máxima en los meses de marzo y abril, con valores de probabilidad de 0,0407 y 0,0527, respectivamente (Tabla Suplementaria 3). El porcentaje de parasitación se vio disminuido hacia

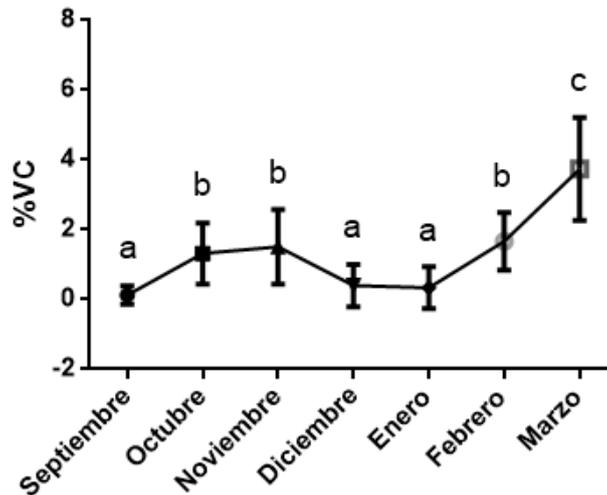
mediados del otoño (mes de mayo, con un valor promedio de 0,50%) (Figura 29), ya que en ese momento se realizaron las curas estacionales en todas las colonias.



**Figura 29.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de *V. destructor* en estado forético (%VF) en las colonias de *A. mellifera* evaluadas en función de los meses de la temporada apícola. Se muestran los promedios de ambas temporadas. Distintas letras indican diferencias significativas entre los meses de acuerdo a los resultados del GLMM ( $P < 0,05$ ).

### 1.3.3.2. *V. destructor* en celdas de cría (*Varroa* en cría)

No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de parasitación en la cría de las abejas entre las colonias ni entre las temporadas evaluadas (Test de *Chi*-cuadrado;  $P = 0,4704$ ), evidenciando una relativa homogeneidad en los niveles de parasitación dentro del apiario y entre años (Figura Suplementaria 3). Sin embargo, las cargas del parásito en las celdas de cría evidencian una variación estacional significativa (Test de *Chi*-cuadrado;  $P < 0,001$  - Tabla Suplementaria 4) (Figura 30). En particular, durante la primavera (septiembre, octubre y noviembre) y el principio del verano (diciembre y enero), las colonias presentaron bajos niveles de parasitación en cría (con valores promedio de 0,93% para primavera y 0,23% para diciembre y enero) (Figura 30). Hacia mediados del verano (febrero), las cargas parasitarias en la cría fueron mayores (con valores promedio de 1,48%) y a fines del verano (marzo) se evidenciaron los picos más altos de parasitación en celdas de cría (con un valor promedio de 3,51%) (Figura 30). En efecto, la probabilidad de encontrar una celda de obrera parasitada con *Varroa* es alta en el mes de febrero y máxima en marzo, con valores de probabilidad de 0,014 y 0,033, respectivamente (Tabla Suplementaria 4)

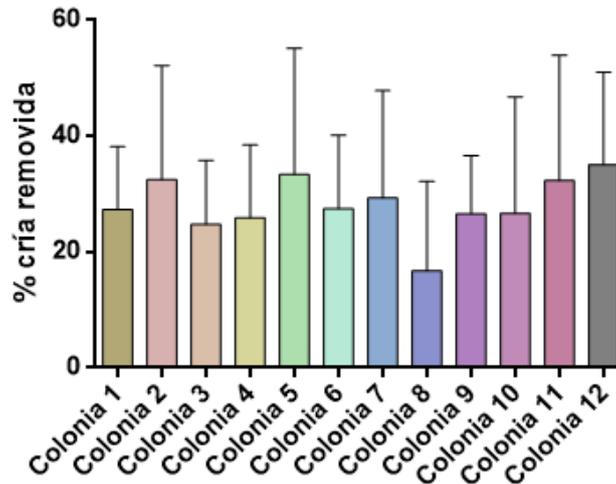


**Figura 30.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de *V. destructor* en celdas de cría (%VC) de las colonias de *A. mellifera* evaluadas en función de los meses de la temporada apícola. Se muestran los promedios de ambas temporadas. Distintas letras indican diferencias significativas entre los meses de acuerdo a los resultados del GLMM ( $P < 0,05$ ).

#### 1.3.4. Caracterización del comportamiento de higiene hacia el ácaro en las colonias de *A. mellifera*

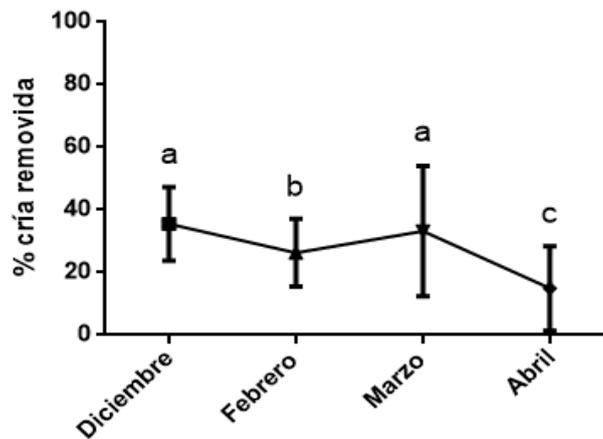
A pesar de la variación observada, no se encontraron diferencias significativas en el comportamiento de higiene hacia celdas de cría parasitadas con *V. destructor* entre las colonias analizadas ni al considerar la fortaleza (categoría) de las mismas (Test de *Chi-cuadrado*;  $P > 0,05$ ), sugiriendo que el nivel de comportamiento higiénico sería independiente del estatus poblacional de la colonia. El porcentaje de remoción de las celdas parasitadas varió entre 16,70% y 35,05% entre las colonias, con un valor medio de 28,27% (Figura 31). No se detectaron diferencias significativas entre las dos temporadas analizadas (Test de *Chi-cuadrado*,  $P = 0,3282$ ), evidenciando que el nivel de comportamiento higiénico sería estable de un año a otro (Figuras Suplementarias 4 y 5).

En cuanto a la dinámica estacional, se encontraron diferencias significativas en el comportamiento hacia el ácaro entre los meses de la temporada (Test de *Chi-cuadrado*;  $P < 0,001$ ), observándose un descenso en la remoción de las celdas parasitadas en febrero y abril en comparación con diciembre y marzo (Figura 32; Figuras Suplementarias 4 y 5; Tabla Suplementaria 5).



**Figura 31.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de celdas de cría parasitada con *V. destructor* que fueron removidas por las abejas de cada colonia analizada. Las barras muestran el promedio de las dos temporadas estudiadas (2016-2017 y 2017-2018).

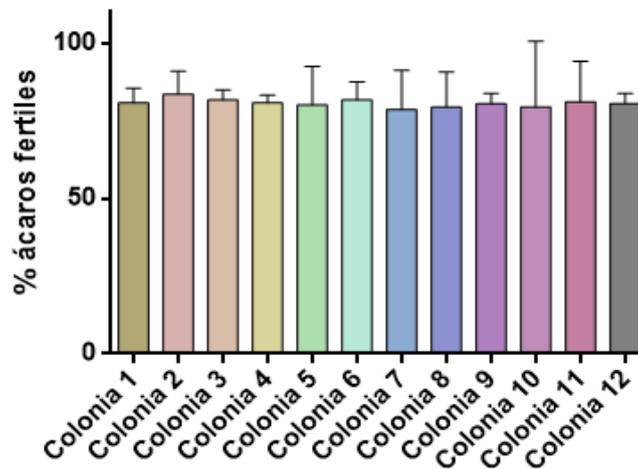
En efecto, la probabilidad de que una celda parasitada con *V. destructor* sea removida por las abejas al día 11 post-infestación es máxima en diciembre y marzo (Tabla Suplementaria 5).



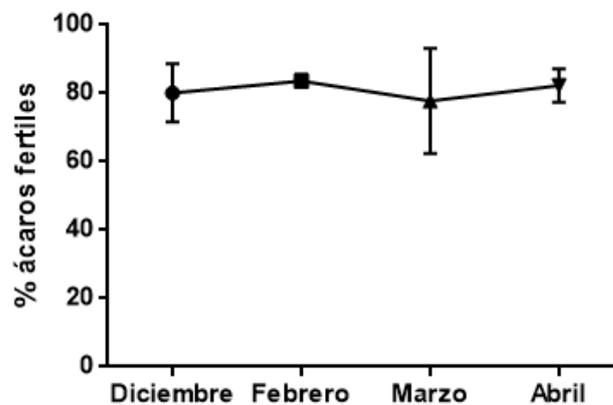
**Figura 32.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de celdas de cría parasitada con *V. destructor* removidas por las abejas en función de los meses de la temporada apícola. Se muestran los valores sobre todas las colonias evaluadas en ambas temporadas (2016-2017 y 2017-2018). Distintas letras indican diferencias significativas entre los meses GLMM ( $P < 0,05$ ).

El análisis del estatus reproductivo de *V. destructor* presente en las celdas de cría que no fueron removidas por las abejas evidencia que la fertilidad de los ácaros fue similar entre las colonias analizadas (Figura 33), sin diferencias significativas entre éstas (Test de *Chi-cuadrado*,  $P = 0,9340$ ).

Dicho parámetro reproductivo varió entre 78,61% y 83,56%, con un valor medio de 80,57% (Figura 33). Tampoco se detectaron diferencias significativas en la fertilidad del ácaro al considerar la fortaleza poblacional de las colonias, las temporadas o los meses de la temporada (Tests de *Chi*-cuadrado,  $P>0.05$ ) (Figura 33 y 34; Figuras Suplementarias 6 y 7).

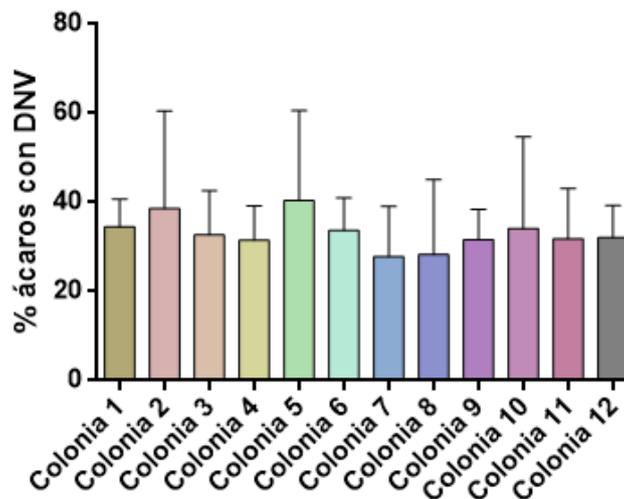


**Figura 33.** Porcentaje medio ( $\pm$  error estándar) de ácaros fértiles presentes en las celdas de cría no removidas por las abejas. Cada barra se obtuvo de los múltiples registros realizados en cada colonia para las dos temporadas analizadas (2016-2017 y 2017-2018).



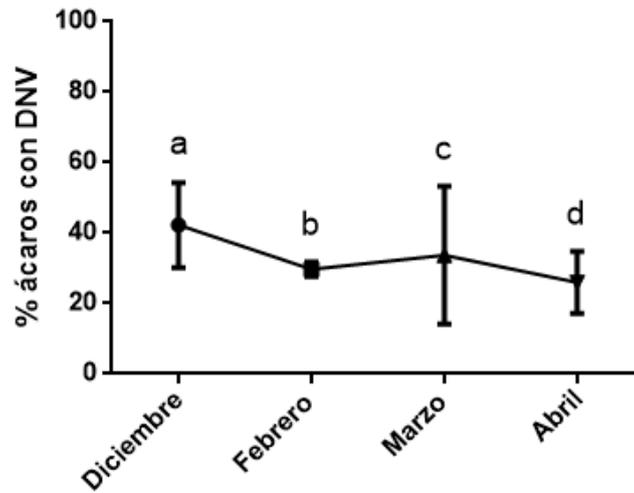
**Figura 34.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de ácaros fértiles presentes en las celdas de cría no removidas por las abejas para los meses analizados. Cada punto se obtuvo de los múltiples registros realizados sobre las colonias y para ambas temporadas (2016-2017 y 2017-2018).

En la Figura 35 se muestran los resultados del análisis de la descendencia no viable (DNV) de *V. destructor* en las celdas de cría de todas las colonias de *A. mellifera* analizadas. El porcentaje de ácaros con DNV varió entre 27,85 y 40,41%, con un valor medio de 33,37%, sin diferencias significativas entre colonias ni al considerar la fortaleza poblacional de las mismas (Test de Chi-cuadrado,  $P > 0,05$  - Figura Suplementaria 8). Tampoco se detectaron diferencias entre las temporadas analizadas. En cuanto a la dinámica estacional, se encontraron diferencias significativas entre los meses de la temporada (Test de Chi-cuadrado,  $P < 0,001$ - Tabla Suplementaria 7) observándose un descenso en la DNV del ácaro en los meses de febrero y abril en comparación con diciembre y marzo (Figura 36; Figura Suplementaria 9; Tabla Suplementaria 6).

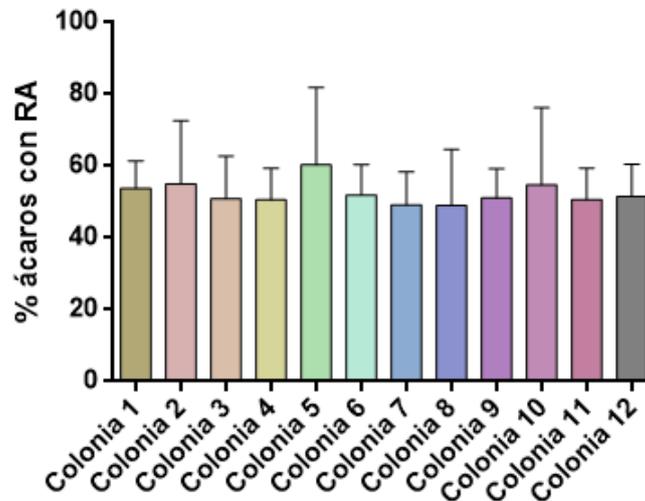


**Figura 35.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de ácaros con descendencia no viable (DNV) presentes en las celdas de cría no removida por las abejas. Cada barra se obtuvo de los múltiples registros realizados en cada colonia para las dos temporadas analizadas (2016-2017 y 2017-2018).

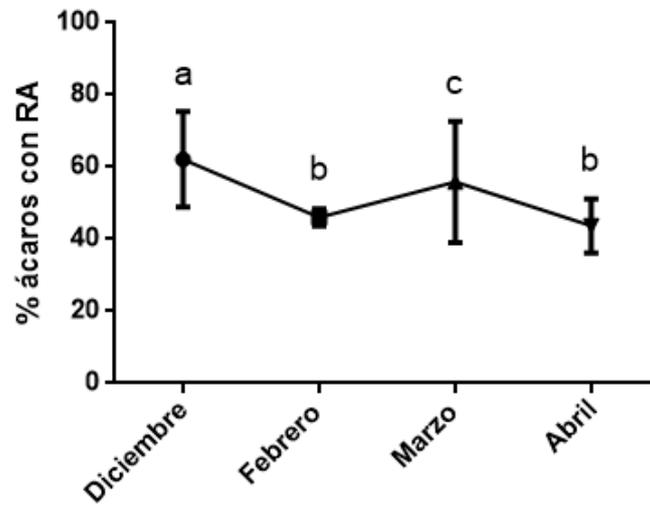
En la Figura 37 se muestran los resultados del análisis de la reproducción anormal (RA) de *V. destructor* en las celdas de cría de todas las colonias de *A. mellifera* analizadas. El porcentaje de ácaros con RA varió entre 49,03% y 60,34%, con un valor medio de 52,78%, sin diferencias significativas entre colonias ni al considerar la fortaleza poblacional de las mismas (Test de Chi-cuadrado;  $P > 0,05$ ). Tampoco se detectaron diferencias entre las temporadas analizadas (Figura Suplementaria 10). En cuanto a la dinámica estacional, se encontraron diferencias significativas entre los meses analizados (Test de Chi-cuadrado;  $P < 0,001$ ), observando un descenso en la RA del ácaro en los meses de febrero y abril en comparación con diciembre y marzo (Figura 38; Figura Suplementaria 11; Tabla Suplementaria 7)



**Figura 36.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de ácaros con descendencia no viable (DNV) presentes en las celdas de cría no removidas por las abejas para los meses analizados. Cada punto se obtuvo de los múltiples registros realizados sobre las colonias y para ambas temporadas (2016-2017 y 2017-2018).



**Figura 37.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de ácaros con reproducción anormal (RA) presentes en las celdas de cría no removidas por las abejas. Cada barra se obtuvo de los múltiples registros realizados en cada colonia para las dos temporadas analizadas (2016-2017 y 2017-2018).



**Figura 38.** Valores medios ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de ácaros con reproducción anormal (RA) por meses. Se muestra el resultado del análisis de GLMM, que tomó como factor fijo a los meses, y como factores aleatorios a la temporada y a la colonia. Cada barra se obtuvo de los múltiples registros realizados a lo largo de las dos temporadas (2016-2018).

## 1.4. DISCUSIÓN

### 1.4.1 Dinámica poblacional de *A. mellifera* y *V. destructor*

Los resultados obtenidos de las dos temporadas analizadas permitieron describir la dinámica de las poblaciones de las dos especies del sistema bajo estudio: *V. destructor* y *A. mellifera*. El patrón obtenido para la dinámica estacional de las poblaciones de *A. mellifera* es consistente con lo esperado para el desarrollo de las colonias de este insecto en regiones de clima templado en nuestro país (Giacobino, 2015; Merke, 2016). En particular, se observó un aumento de la población de abejas adultas durante la primavera, que prosiguió en verano hasta alcanzar un máximo poblacional en el mes de febrero, momento en el cual se maximiza la probabilidad de detectar una colonia en categoría I dentro del apiario. Una vez iniciado el otoño, se observó un descenso de la población adulta, resultado esperado dado que las reinas comienzan a disminuir su postura en este momento del año, y toda la colonia se prepara para la invernada (Chhuneja et al., 2014; Cestaro et al., 2017).

De forma consistente, los niveles de parasitación de *Varroa* tanto en cría (VC) como en abejas adultas (VF) se incrementaron en forma progresiva a través de la temporada, alcanzando valores promedios máximos a finales del verano y principios del otoño (7,22% y 3,74% para VF y VC, respectivamente). Estos resultados confirman la dinámica de la parasitación a través de la temporada apícola en estas latitudes (Marcangeli et al., 1992; Vetharanim, 2012), y apoyan la necesidad del manejo de las poblaciones de *Varroa* para evitar el colapso de las colonias. Esto es particularmente importante considerando que el impacto de la parasitosis está determinado por el nivel de infestación de las colonias a finales del verano, momento en el cual, la población de abejas declina, la parasitación relativa aumenta y esto impacta negativamente en la sobrevivencia de las abejas que invernan (Fries et al., 2003; Amdam et al., 2004; Giacobino et al., 2015). En efecto, las colonias establecidas en esta latitud y mantenidas bajo un manejo convencional, requieren de tratamientos acaricidas (generalmente de síntesis) al finalizar el verano para evitar o disminuir la mortalidad invernal. Los niveles de parasitación alcanzados fueron similares al de colonias de origen europeo sin antecedentes de resistencia, y mayores a los registrados en colonias de abejas con características de tolerancia, colonias higiénicas y colonias con características de supresión de la reproducción del ácaro (SMR) (Ibrahim et al., 2007; Rinderer et al., 2001; Merke, 2016; Russo et al., 2020).

### 1.4.2. Comportamiento higiénico de *A. mellifera* hacia celdas infestadas con *V. destructor*

El comportamiento higiénico hacia celdas de cría infestadas con el ácaro no mostró diferencias significativas entre las colonias estudiadas, a pesar de la variación observada entre las mismas. El promedio general de remoción de celdas infestadas fue de un 28,27%, un valor similar y/o menor al

encontrado en trabajos previos para poblaciones que no presentan comportamiento VSH (23,5%, 28%, 33%, 54% y entre 52,5 y 73,8% informados en Harris et al. (2012), Panziera et al. (2017), Cheruiyot et al. (2018), Martin et al. (2020) y Visintini et al. (2021), respectivamente). Estos resultados parecen indicar que las colonias analizadas en el presente trabajo no exhiben comportamiento VSH.

Altos niveles de este comportamiento (estimado mediante el % de remoción) también se han correlacionado con un alto porcentaje de ácaros infértiles detectados en las celdas de cría no removidas (Harris, 2007). Al respecto, nuestros resultados evidencian una tasa promedio de fertilidad de los ácaros del 80%, similar al informado en otras colonias de origen europeo (Martin, 2001) y considerablemente mayor al informado en colonias que exhiben VSH/SMR (entre 20-50% de acuerdo a Harbo & Harris (2005), Ibrahim & Spivak (2006), De Guzman et al. (2008), y Visintini et al. (2021)). La fertilidad de *V. destructor* dentro de las celdas de cría no removida, no varió entre los meses analizados, aunque sí se observó un aumento de los problemas en la descendencia del ácaro (descendencia no viable y descendencia anormal) particularmente en los meses en que las colonias presentaron mayores niveles de remoción de celdas (diciembre y marzo), consistentemente con los resultados pioneros sobre la dinámica de la reproducción del ácaro obtenidos por Marcangeli et al. (1992) para clima templado. El promedio de ácaros con reproducción anormal dentro de las celdas de cría no removidas fue de 52,78%, valor similar a los detectados en otras colonias de *A. mellifera* (Lin et al., 2018). De este porcentaje detectado en nuestras colonias, el 19,42% correspondió a ácaros que no tuvieron ninguna descendencia y 33,36% a ácaros con descendencia no viable. Si bien, en función de los valores de remoción obtenidos, las colonias no exhiben comportamiento de VSH, los resultados sobre los parámetros reproductivos sugieren que las abejas que realizan el comportamiento higiénico dentro de la colonia serían más propensas a remover celdas de cría parasitadas con la familia completa del ácaro en comparación a celdas con solo hembras fértiles de *V. destructor* (con al menos un huevo) y/o con descendencia no viable. Esta idea se desprende de las evidencias de trabajos previos, en los que se demostró que las señales olfativas emitidas por la cría parasitada cambian (y son más intensas) a medida que avanza la reproducción del ácaro dentro de la celda de cría, las cuales representan el estímulo para disparar el comportamiento higiénico (McAfee et al., 201; Liendo et al., 2021) o el VSH (Harbo & Harris, 2005; Ibrahim et al., 2007; Harris et al., 2012). Por otro lado, los resultados obtenidos ponen en discusión si la infertilidad de los ácaros es el parámetro más adecuado para definir si una colonia de abejas exhibe o no comportamiento VSH, y sugieren la necesidad de seguir investigando sobre aproximaciones alternativas para fenotipificar las colonias en el marco de programas de mejoramiento genético apícola.

Considerando las dinámicas poblacionales de *V. destructor*, podemos observar que cuanto menor es la carga parasitaria en la colonia, mayor es el porcentaje de ácaros con descendencia no viable (DNV) y reproducción anormal (RA) en las celdas de cría no removida. Contrariamente, en los momentos en donde la carga parasitaria es máxima en la colonia (abril), estos parámetros no reproductivos son menores, sugiriendo que el comportamiento de higiene hacia celdas parasitadas sería menos eficiente y que otros comportamientos que limitan específicamente la carga del ácaro en estado forético, como el comportamiento de acicalamiento (*grooming*), podrían tener mayor relevancia. En efecto, de acuerdo a estudios previos, la intensidad del comportamiento de *grooming* estimado a campo es mayor en los momentos previos a la invernada (Russo et al., 2020). Esto reflejaría la capacidad que tiene la colonia para ajustar y desplegar los comportamientos de higiene de una manera flexible en función del estado parasitario de la colonia y del momento estacional de la temporada (Bigio et al., 2013).

#### **1.4.3. Caracterización genética de las colonias de *A. mellifera***

Los haplotipos mitocondriales se han utilizado ampliamente para comprender la variabilidad genética, origen geográfico y la ruta de migración de las subespecies de *A. mellifera* a través de los continentes (Cornuet et al., 1991; Garnery et al., 1992; Franck et al., 2000). Se han informado previamente cuatro linajes principales de abejas melíferas (A, O, C y M), que se han extendido por todo el mundo desde su centro de origen (Ruttner et al., 1978; Garnery et al., 1998; Franck et al., 2001). Las abejas de origen africano están representadas principalmente por los haplotipos mitocondriales A y O, mientras que las abejas de origen europeo están representadas por los haplotipos M (Europa occidental) y C (Europa oriental) (Franck et al., 2001; De la Rúa et al., 2004).

La introducción de las abejas melíferas en el Nuevo Mundo se asoció principalmente con la migración humana y las actividades apícolas. En los EE. UU., se detectó una alta frecuencia de haplotipos C en apiarios comerciales y también en colonias de *A. mellifera* no manejadas por el hombre (enjambres salvajes), siendo el haplotipo C1 en particular muy frecuente en las primeras (Magnus et al., 2011; 2014). En nuestro país, este patrón se repite en las regiones templadas del territorio, donde las colonias presentan en alta frecuencia el haplotipo C (Sheppard et al., 1999, Abrahamovich et al., 2007, Agra et al., 2018; Galindo-Cardona et al., 2020). Particularmente en Buenos Aires, tanto Abrahamovich et al. (2007) como Agra et al. (2018) reportaron una alta frecuencia de C1 (aproximadamente 80%) y, en menor medida la presencia de C2J (20%) en colmenas comerciales de *A. mellifera* de la provincia. Nuestros análisis genéticos son consistentes con estos trabajos, ya que evidenciaron que todas las colonias de abejas evaluadas presentan un origen europeo. En particular se detectó el haplotipo C1 en un 88% de las colonias, el cual es característico de la *A. m. subespecie ligustica* y el haplotipo C2J

en un 12%. Este último haplotipo es una variante del haplotipo C2, característico de la subespecie *A. m. carnica*, representante del grupo C del Mediterráneo norte (Ruttner et al., 1978; Nedi et al., 2009). La alta prevalencia del haplotipo C1 aquí detectada no resulta llamativa, ya que desde el comienzo de la práctica apícola en Argentina hacia 1900, los apicultores han importado reinas de la subespecie *A. m. ligustica* desde Europa, particularmente Italia, para desarrollar la apicultura local (Hall & Smith, 1991; Sheppard et al., 1991; Abrahamovich et al., 2007; Agra et al., 2008; Lanzavecchia et al., 2011). Esta subespecie es la más difundida a nivel comercial, principalmente por su mansedumbre y producción de miel de alta calidad, muy valorada por los mercados internacionales (Bierzychudek, 1979; Dicks et al., 2010; Merke, 2016; Agra, 2018).

Si bien las abejas de origen africano parecen tener una ventaja adaptativa frente a las europeas, sobre todo en cuanto a resistencia a patógenos (Michener, 2000), y el movimiento de colonias con fines de polinización de cultivos o multiplicación de materiales ha favorecido el intercambio genético entre abejas europeas y africanizadas (Agra et al., 2011; 2018), la no detección de haplotipos A en esta Tesis es consistente con trabajos previos donde se documentaron frecuencias bajas de abejas africanizadas en Buenos Aires (Abramovich et al., 2007; Agra et al., 2018; Porrini et al., 2020; Galindo-Cardona et al., 2020) y está en línea con la idea de un límite latitudinal natural para la africanización (Sheppard et al. 1999; Abramovich et al., 2007; Agra et al., 2018; Porrini et al., 2020).

## Capítulo 2. Caracterización genética de *Varroa destructor* en colonias de Argentina

## 2.1. INTRODUCCIÓN

### 2.1.1. Detección y dispersión de *V. destructor* 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 & Piola 1976). El ácaro fue detectado por primera vez en Argentina en 1976, en la provincia de Formosa, 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 & Ruffinengo, 2006; Vandame & Palacio, 2010; revisado por Maggi et al., 2016; SENASA, 2020).



**Figura 39.** Posible ruta de introducción y dispersión de *V. destructor* en Argentina, de acuerdo a lo descrito en De Jong et al. (1982) y Montiel & Piola (1976).

### 2.1.2. Variabilidad genética de *V. destructor*

La utilización de herramientas moleculares ha sido de gran ayuda para la identificación y análisis de variabilidad genética de las especies patógenas de *A. mellifera*, en particular de *V. destructor*. La secuenciación completa del genoma mitocondrial del ácaro ha constituido un gran aporte al

conocimiento genético de esta especie (Evans & Lopez, 2002; Navajas, 2002), que en conjunto con estudios genómicos (Cornman et al., 2010; Techer et al., 2022) y transcriptómicos (Eliash et al., 2017; Mondet et al., 2018; Wu et al., 2020; Lin et al., 2020) han posibilitado la obtención de información a gran escala de secuencias de genes, facilitando los estudios genético-poblacionales.

Mediante el estudio de secuencias nucleotídicas del ADN mitocondrial de *V. destructor* (específicamente la región codificante del gen *citocromo oxidasa 1*, *cox1*) se han identificados dos haplotipos mitocondriales (K y J) que infestan exitosamente *A. mellifera* en el mundo (Anderson, 2000; Anderson & Trueman, 2000). El marcador mitocondrial mencionado (*cox1*) ha demostrado ser útil para la identificación taxonómica a nivel de especie y para definir poblaciones particulares ('haplogrupos') (Koeniger et al., 2002; Zhou et al., 2004; Solignac et al., 2005; Strapazzon et al., 2009; Muñoz et al., 2008; Navajas et al., 2010; Elbeaino et al., 2016; Gajic, et al., 2013). Sin embargo, dado que la variación en esta región genética es inferior al 2 % entre los ácaros de la misma especie (Anderson & Trueman 2000), el uso de este marcador por sí solo puede no ser lo suficientemente sensible para detectar la variación entre poblaciones.

Navajas y colaboradores (2010) encontraron que el uso combinado de *cox1* y otros marcadores del ADN mitocondrial (*atp6*, *cox3* y *cytb*) permite la detección de variaciones genéticas tanto dentro como entre diferentes poblaciones de *V. destructor*. Así, tres variantes nuevas del haplotipo K y tres del haplotipo J fueron descritas en poblaciones europeas y asiáticas del ácaro (Navajas et al., 2010; Elbeaino et al., 2016; Farjamfar et al., 2018). Asimismo, estudios realizados en colonias de *A. mellifera* de Siria y Serbia detectaron cuatro nuevas variantes del haplotipo K (T4 y ALQ5 de Siria, y Serbia 1 y Peshter 1, de Serbia) (Elbeaino et al., 2016; Gajic, et al., 2013). Sin embargo, la diferenciación genética entre los linajes descritos es baja debido fundamentalmente a las características del ciclo de vida y tipo de reproducción de *Varroa* (revisado en Traynor et al., 2020), así como a los potenciales cuellos de botella sufridos por la especie durante la colonización de poblaciones de *A. mellifera* en regiones previamente libres del ácaro (De Guzman et al., 1999; Solignac et al., 2005; Navajas et al., 2010; ver Techer et al., 2022).

Estudios previos realizados en Sudamérica detectaron la presencia del haplotipo K en poblaciones del ácaro de Venezuela, Chile, Uruguay, Colombia, Brasil y Argentina (Garrido et al., 2003; Guerra et al., 2010; Maggi et al., 2012). En Argentina, se han realizado los primeros estudios de variabilidad genética de *V. destructor* a partir de muestras provenientes del centro-sur del territorio (Maggi et al., 2012). Los resultados de dicho estudio indican la presencia del haplotipo K y una baja variabilidad genética de las poblaciones argentinas de la especie, en particular para la región codificante del gen citocromo oxidasa 1 (marcador utilizado). Sin embargo, aún no se ha explorado la diversidad genética de las

poblaciones del ácaro en la región centro-norte, reconocida como la de mayor actividad apícola en nuestro país. Además, existen evidencias sobre variaciones tanto en la morfología externa (morfortipos) como en la virulencia entre distintas poblaciones de *V. destructor* de Argentina (Maggi et al., 2009; Eguaras & Ruffinengo, 2006). En este sentido, el análisis de otras regiones más variables que puedan evidenciar polimorfismos resultaría útil para correlacionar las diferencias fenotípicas observadas con la variación a nivel genético en las poblaciones de *V. destructor* de nuestro país. Por ejemplo, el gen mitocondrial que codifica para la enzima NADH deshidrogenasa (*nd4*) ha demostrado ser altamente polimórfico en un gran número de especies de insectos (Michel et al., 2006; Meraner et al., 2008; Fernández et al., 2013) y arácnidos (Masta 2000; Li et al., 2017; Liu et al., 2018). Aunque este marcador se ha aplicado con éxito a estudios genéticos de poblaciones de ácaros (Li et al. 2019), su uso no se ha informado previamente en estudios genéticos de poblaciones de *V. destructor*.

### **2.1.3. Heteroplasmia**

La transmisión materna estricta del ADN mitocondrial (ADNmt) da como resultado individuos homoplásmicos, que típicamente tienen un solo haplotipo de ADNmt, el materno. Sin embargo, la heteroplasmia (la presencia simultánea de dos o más tipos de ADNmt en el mismo individuo) es frecuente en varias especies animales (Ujvari et al., 2007; Wen et al., 2016; Mastrantonio et al., 2019; Stewart & Chinery, 2021). Recientemente, la heteroplasmia ha sido ampliamente estudiada gracias a las modernas técnicas de secuenciación. Estos estudios, la mayoría de los cuales se realizaron en organismos modelo, revelaron que la heteroplasmia estaba más extendida de lo que se creía anteriormente, en particular como variantes de baja frecuencia (Payne et al., 2013), y que tanto la deriva génica como la selección desempeñarían un papel en su dinámica entre individuos y generaciones (revisado en Parakatselaki & Ladoukakis, 2021).

#### **2.1.3.1. Las fuentes de la heteroplasmia y los NUMT**

La heteroplasmia puede ocurrir principalmente a través de dos vías: la mutagénesis somática durante la vida de un individuo y la fuga de ADNmt paterno en el cigoto durante la fertilización. Estudios recientes en artrópodos, utilizando técnicas de secuenciación, han revelado que la heteroplasmia debida a mutaciones somáticas podría ser frecuente entre los individuos de una población (Van Leeuwen et al., 2008; 2010; Nunes et al., 2013; Robison et al., 2015). Se espera que la mayor tasa de mutación en el ADNmt animal y el gran número de copias de ADNmt, en comparación con el ADN nuclear, generen variantes de ADNmt que coexistan con el haplotipo materno común. Estas variantes pueden diferir del haplotipo común en uno o algunos polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés "Single Nucleotide Polymorphism") y se espera que aparezcan con una frecuencia extremadamente baja (Payne et al., 2013; Li et al., 2015).

La heteroplasma por fuga paterna se genera por la presencia de ADNmt de espermatozoides en baja frecuencia en algunos individuos de una población, y se ha observado en varias especies animales (Nunes et al., 2013; Robison et al., 2015; Luo et al., 2018). Este fenómeno se puede considerar como una insuficiencia inherente de los mecanismos estrictos que protegen la transmisión del ADNmt materno (Rokas et al., 2003), de manera similar a como las mutaciones escapan a la maquinaria de reparación de la célula. Estos mecanismos son variables e incluyen la prevención de que el ADNmt paterno ingrese al óvulo durante la fertilización (Sato et al., 2013), la producción de espermatozoides sin ADNmt (DeLuca et al., 2012) y la destrucción de las mitocondrias de los espermatozoides después de su entrada en el óvulo durante la fertilización (Politi et al., 2014). El ADNmt de los espermatozoides puede ingresar al óvulo y ocasionalmente permanecer en el cigoto en una condición heteroplásmica. Los ovocitos que ya son heteroplásmicos también pueden potencialmente producir individuos heteroplásmicos (transmisión materna de heteroplasma), pero estos ovocitos deben haberse vuelto heteroplásmicos con una de las dos formas principales. La herencia de heteroplasma se ha observado en varios organismos, como humanos (Schwartz et al., 2002; Li et al 2016), crustáceos (Doublet et al., 2008) y *Drosophila* (Polovina et al., 2020).

El ADN mitocondrial nuclear (NUMT) está constituido por fragmentos de ADNmt que se han trasladado al núcleo (Bensasson et al., 2001) y es una importante fuente de error en el estudio de la heteroplasma. Los cebadores de PCR que se utilizan para la amplificación del ADNmt también pueden unirse a los NUMT debido a su similitud de secuencia. Luego, ambas moléculas (ADNmt y NUMT) se amplifican, y el resultado puede pasar erróneamente por heteroplasma. Los NUMT se descubrieron utilizando métodos de secuenciación tradicionales (Bensasson et al., 2001) que son menos susceptibles a la hora de detectar heteroplasma falsa. De hecho, se ha propuesto que las heteroplasmas de ADNmt por debajo de un nivel del 2% podrían ser en realidad NUMT (Albayrak et al., 2016). Estos estudios recientes han revelado que cualquier observación de heteroplasma, incluidos los casos ya informados, deben excluir la posibilidad de que se trate de heteroplasma falsa originada por NUMT.

### **2.1.3.2. Heteroplasma en *V. destructor***

Resultados preliminares obtenidos mediante PCR y secuenciación sugieren que la heteroplasma está presente en *V. destructor* (Navajas et al., 2002). En un estudio reciente sobre poblaciones serbias del ácaro, la heteroplasma se evidenció por la presencia de picos dobles en posiciones puntuales de las secuencias de los genes *cox1* y *cytb* (Gajic et al., 2016; 2019). Sin embargo, no se ha explorado la presencia de este fenómeno de manera extensiva en esta especie, ni se conoce si éste puede ser evidenciado en distintas regiones del ADN mitocondrial.

En el presente Capítulo, se continúa con la evaluación de aspectos genéticos del ácaro *V. destructor*. En particular, presentamos el desarrollo y utilización de marcadores moleculares en el ADN mitocondrial para caracterizar la variabilidad genética de las poblaciones del ácaro presentes en apiarios de *A. mellifera* localizados en diferentes regiones de Argentina.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Colecta de muestras**

Se realizó un muestreo de poblaciones de *V. destructor* en colonias de *A. mellifera* de diferentes regiones de nuestro país dedicadas a la actividad apícola. El muestreo se llevó a cabo con la colaboración de los participantes de la Red de Centros de Evaluación del Programa Nacional de Apicultura (PROAPI-INTA). Específicamente se recibieron muestras de Castelli (provincia de Chaco), Formosa (provincia de Formosa), Leales y Famaillá (provincia de Tucumán), Reconquista, Santa Fe y Rafaela (provincia de Santa Fe), Castelar, Balcarce y Ascasubi (provincia de Buenos Aires), que constituyen localidades representativas de climas subtropicales y templados en Argentina (Tabla 2). En todos los casos, los ácaros se recolectaron vivos de los cuerpos de abejas obreras adultas (ácaros foréticos) y se almacenaron en tubos plásticos de 1,5 mL que contenían etanol al 70%. De cada apiario se tomaron muestras de al menos el 20% del total de colonias. El número de colonias muestreadas por apiario osciló entre dos y diez, según el tamaño del apiario. Se recolectaron al azar cinco ácaros de cada colonia. Cuando se encontró que una colonia muestreada tenía una carga baja de ácaros, se analizaron todos los individuos disponibles ( $\geq 2$ ). Se tomaron muestras de un total de 48 colonias de *A. mellifera* y se recolectaron 182 ácaros.

### **2.2.2. Extracción individual de ADN total de *V. destructor***

Cada ácaro fue colocado en un microtubo de 1,5 mL, secado en estufa a 37 °C por 30 minutos, y luego lavado con 100  $\mu$ L de TE (10:10). Se realizaron extracciones individuales de ADN según protocolo de Baruffi y colaboradores (1995), con modificaciones vinculadas al tamaño del ácaro. Brevemente, todos los volúmenes se redujeron a la mitad, y los tiempos de centrifugación e incubación se aumentaron para obtener una concentración de ADN que permita optimizar la amplificación posterior por PCR. Las muestras de ADN fueron resuspendidas en 10  $\mu$ L TE (Tris base 10 mM; EDTA 1 mM), cuantificadas mediante el uso de Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y conservadas en freezer a -20 °C.

### **2.2.3. Desarrollo de marcadores mitocondriales**

Para estudiar la variabilidad genética de las poblaciones de *V. destructor* de Argentina se utilizaron marcadores moleculares en el ADN mitocondrial.

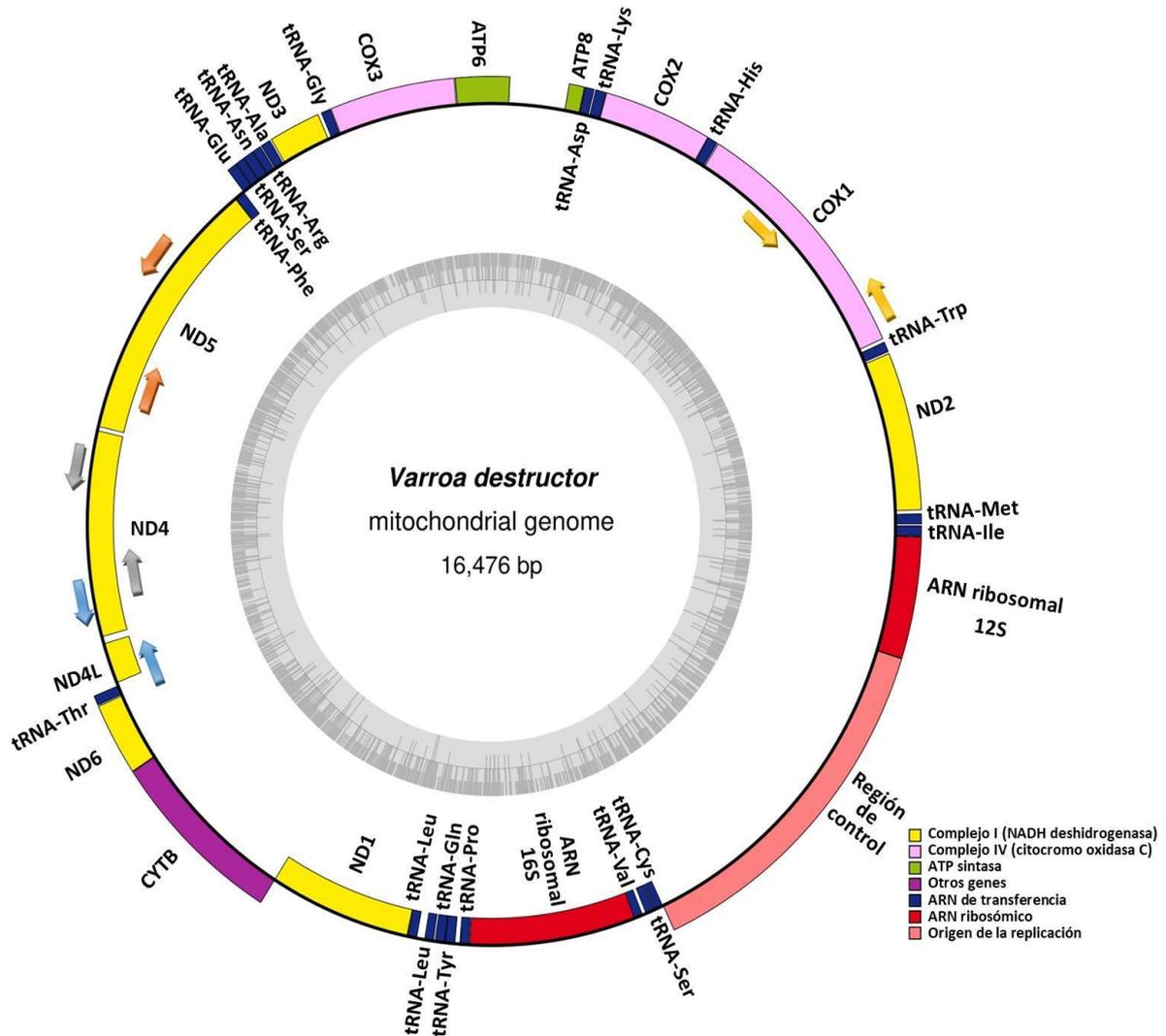
**Tabla 2.** Descripción general de las poblaciones de *V. destructor* muestreadas en colonias de abejas melíferas de Argentina.

Localidad, Provincia	N	Coordenadas Geográficas (Latitud/Longitud)	Clima	Haplotipo mt de las colonias (E)
Castelli, Chaco (Ci)	22	25°57'00''S/ 60°37'00''O	Subtropical	A
Formosa, Formosa (Fo)	37	26°11'05''S/ 58°10'33''O	Subtropical	A
Leales, Tucumán (Le)	32	27°01'58''S/ 65°18'26''O	Subtropical	E, A
Famaillá, Tucumán (Fa)	21	27°03'09''S/65°24'59''O	Subtropical	E, A
Reconquista, Santa Fe (Re)	18	29°14'00''S/ 59°56'00''O	Subtropical	E, A
Santa Fe, Santa Fe (SF)	7	31°38'00''S/ 60°42'00''O	Templado	E
Rafaela, Santa Fe (Ra)	9	31°16'00''S/ 61°29'00''O	Templado	E
Castelar, Buenos Aires (Ca)	16	34°40'00''S/ 58°40'00''O	Templado	E
Balcarce, Buenos Aires (Ba)	11	37°49'00''S/ 58°15'00''O	Templado	E
Ascasubi, Buenos Aires (As)	9	39°22'00''S/ 62°38'00''O	Templado	E
<b>TOTAL</b>	<b>182</b>			

N: número de ácaros analizados; E: características genéticas de las colonias de abejas melíferas muestreadas (E: linaje mitocondrial europeo; A: linaje mitocondrial africano).

Se realizó la amplificación por PCR de un segmento del gen citocromo oxidasa subunidad I (*COX1*) y tres regiones correspondientes al gen de la enzima NADH deshidrogenasa [subunidad 4 (*nd4*), subunidad 4L (*nd4L*) y subunidad 5 (*nd5*)] y posterior análisis de su secuencia nucleotídica (Figura 40).

El fragmento del gen *cox1* se amplificó utilizando un cebador *forward* (10KbCOIF1, Navajas et al., 2010) y un cebador *reverse* diseñado a partir de las secuencias de referencia (número de acceso a GenBank AY163547.1 de Evans & Lopez 2002; y AJ493124.2 de Navajas et al., 2002) mediante el uso de Primer3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (Tabla 3).



**Figura 40.** Esquema del genoma mitocondrial completo de *V. destructor* con la localización de las regiones analizadas. Se muestran las regiones *cox1*, *nd4*, *nd4L* y *nd5* que fueron usadas para el diseño de cebadores específicos (flechas). Para realizar el gráfico se utilizó el programa OGDRAW (Lohse et al., 2013) en base a la secuencia del genoma mitocondrial de la especie NC\_004454 (GenBank).

La elección de los marcadores en la región de los genes NADH deshidrogenasa se basó en antecedentes previos en artrópodos (Gasparich et al. 1997; Dai et al. 2016; Li et al. 2017) y en el análisis de las secuencias de genomas mitocondriales completos de *V. destructor* registradas en la base de datos pública de secuencias nucleotídicas GenBank NCBI (National Center of Biotechnology Information) (Evans et al., 2002, AY163547.1 y Navajas et al., 2002, AJ493124.2). A partir de los alineamientos entre estas secuencias disponibles, utilizando el programa Bioedit (Hall, 1999), se identificaron las regiones del genoma mitocondrial que presentaron mayor polimorfismo (registrado

como cambios nucleotídicos) y se diseñaron cebadores específicos sobre dichas regiones (subunidades 4, 4L y 5 de NADH deshidrogenasa; ver Tabla 3) con el programa *Primer3*. Todos los cebadores se diseñaron teniendo en cuenta las dos versiones disponibles del genoma completo de ADNmt de *V. destructor* (número de acceso de GenBank AY163547.1 y AJ493124.2).

**Tabla 3.** Características de los cebadores utilizados para las amplificaciones por PCR de ADNmt de *V. destructor*.

Genes	Nombre del Cebador	Secuencia de cebador (5' → 3')	Coordenadas del amplicón <sup>#</sup>	Tamaño del amplicón (pb)	At (°C)
<i>cox1</i>	10KbCOIF1*	CTTGTAATCATAAGGATATTGGAAC	1144-2310	1166	55
	COXR	AAATCAATTTACAACCCAGCA			
<i>nd4</i>	ND4F	AGAAGGGGAGAAAATTGCTT	7763-8399	636	55
	ND4R	GCTCATGTTGAAGCTCCTAT			
<i>nd4-nd4L</i>	ND4-ND4LF	CCAATAATAGTTAAAGGCCAAA	8247-9086	839	55
	ND4-ND4LR	AGTTTGTGAAGCCTGTCTTG			
<i>nd5</i>	ND5F	GGAAGAAAAAGTCAGCTTGT	6100-6796	696	55
	ND5R	TGCTTTTCTACTCTAGCCA			

<sup>#</sup> Coordenadas del amplicón según la secuencia completa de ADN mitocondrial de *V. destructor* (AJ493124.2). At: temperatura de *annealing*; \*10KbCOIF1 diseñado por Solignac et al. (2005).

Se analizó un conjunto inicial de 30 muestras de ADN seleccionadas al azar (3 individuos por población/sitio) para todos los marcadores de ADNmt antes mencionados con el fin de explorar la presencia de polimorfismos en las poblaciones argentinas de *V. destructor*. El número de muestras a analizar se amplió para la región *nd4-nd4L* del ADNmt, la cual mostró variación nucleotídica, considerando un número representativo de muestras para cada población.

Para cada muestra, se realizó la amplificación por PCR con un volumen final de 20 µL utilizando el protocolo descrito en punto 1.2.2.2.2. Se utilizó el siguiente esquema de ciclado: 94 °C durante 5 minutos, 40 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 80 segundos y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Todas las PCR se realizaron en un termociclador Applied Biosystems Veriti™. 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, las imágenes fueron capturadas con un fotodocumentador de luz UV (Syngene) y analizadas con Photoshop (Adobe Microsoft).

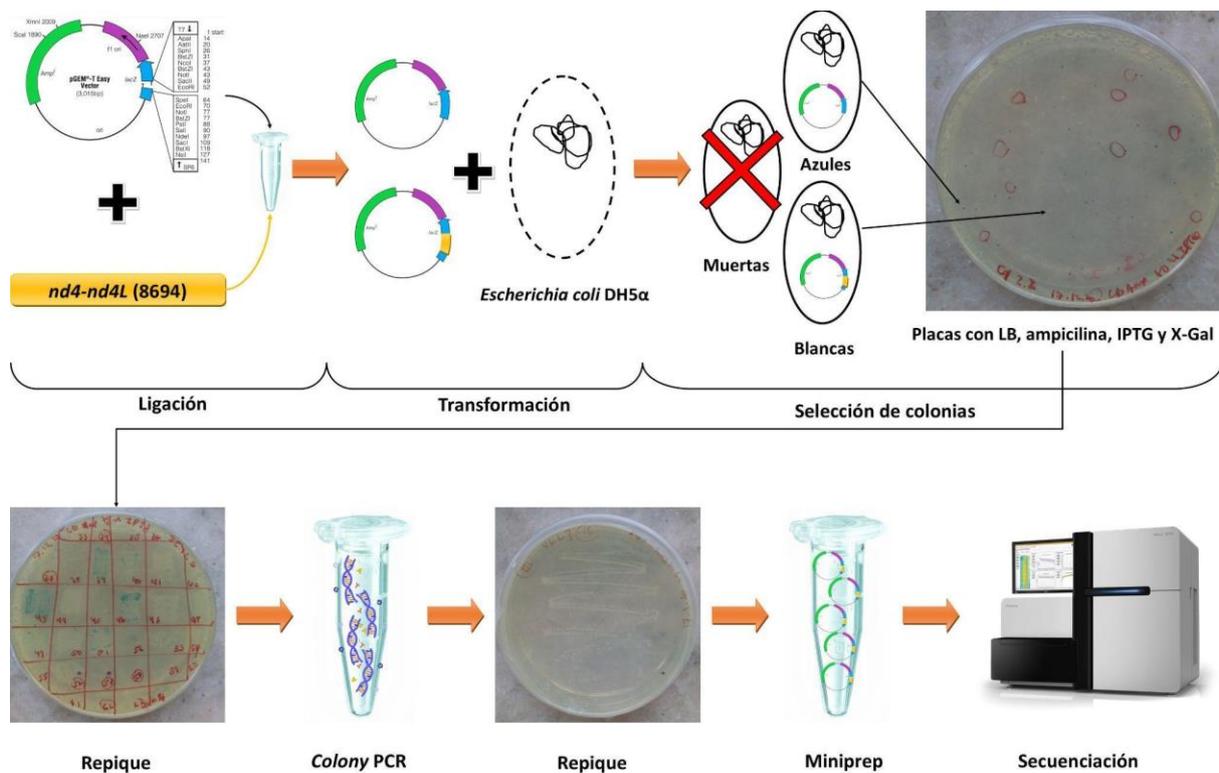
#### **2.2.4. Análisis de secuencia nucleotídica de regiones en el ADN mitocondrial**

Se realizó la purificación de los productos de PCR obtenidos de las diferentes regiones del ADN mitocondrial estudiadas, mediante el uso de QIAquick® PCR Purification Kit (Quiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Para el análisis de la integridad, calidad y concentración de los fragmentos purificados, se cuantificaron y se registraron parámetros de calidad (índices de relación de absorbancia 260/230 y 260/280) mediante el uso de espectrofotómetro de volúmenes reducidos (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en un secuenciador capilar automático (Hitachi ABI 3130, Applied Biosystem) en el Servicio de Secuenciación y Genotipificación de ADN (SIGYSA - CICVyA, INTA, Castelar), utilizando los mismos cebadores (*forward* y *reverse*) utilizados en la amplificación por PCR. Todas las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de nucleótidos GenBank (NCBI) usando BLASTN (Altschul et al., 1990). Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron usando BioEdit (Hall, 1999). Los alineamientos se realizaron utilizando las secuencias de referencia del genoma mitocondrial de *V. destructor* (Evans & López, 2002; Navajas et al., 2002), y las secuencias individuales del haplotipo K obtenidas en estudios previos (por ejemplo, Anderson & Trueman 2000; Navajas et al., 2010).

#### **2.2.5. Verificación de la heteroplasmia**

##### **2.2.5.1. Ligación**

Los productos de PCR que mostraron posiciones nucleotídicas ambiguas (dobles picos en los cromatogramas obtenidos mediante secuenciación) se clonaron, secuenciaron y analizaron. Esto fue evidente específicamente para las secuencias obtenidas de *nd4-nd4L*. Los fragmentos purificados de dichas secuencias se ligaron con el vector pGEM-T Easy (Promega) (Figura 41). Las ligaciones se realizaron con una relación molar del inserto: vector de 3:1 utilizando 40 ng de vector en un volumen final de 20 µL con 100 U de T4 ADN ligasa (New England Biolabs), de acuerdo a las recomendaciones de fabricante. Se realizaron incubaciones a 4 °C durante toda la noche (*overnight*) (Figura 41).



**Figura 41.** Metodología realizada para la verificación de la heteroplasmia en las muestras de *V. destructor*. En el esquema solo se muestran los procedimientos para un solo individuo (cuyo cromatograma presenta un pico doble en la posición nucleotídica 8694 de la secuencia del ADN mitocondrial de *V. destructor*).

### 2.2.5.2. Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5α

Se inocularon células DH5α en placas de petri que contenían 5 mL de medio LB y se las dejó crecer a 37 °C durante toda la noche. Se picaron 10 colonias grandes y se las resuspendió en 1 mL de LB. Se inoculó este cultivo en 100 mL de medio LB y se lo dejó creciendo a 37 °C y 215 rpm hasta que alcanzara una DO<sub>600nm</sub> (densidad óptica) de entre 0,5 y 0,6. Se enfrió el cultivo en hielo por 15 minutos y a continuación se lo centrifugó durante 30 minutos a 5500 g y 4 °C en tubos falcon de 50 mL. Se retiró el sobrenadante, se resuspendieron las células suavemente en 1 mL de agua destilada estéril fría, y luego se enrazó hasta los 100 mL finales con agua ultrapura. Se centrifugaron nuevamente los tubos falcon de 50 mL durante 30 minutos a 5500 g y 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de agua destilada estéril fría. Finalmente, se centrifugaron las células a 5500 g y 4 °C y se resuspendieron en 250 µL de agua destilada estéril fría con 10% glicerol. Se alicuotaron microtubos de 1,5 mL con 30 µL de la suspensión, se congelaron las células con nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C.

### **2.2.5.3. Transformación por electroporación**

Los clones obtenidos de la ligación se usaron para transformar las células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Para ello se mezclaron 30  $\mu$ L de células electrocompetentes DH5 $\alpha$  con 1,5  $\mu$ L de la mezcla de ligación, en cubetas de electroporación de 2 mm frías y electroporadas en un electroporador usando el siguiente protocolo: Voltaje 2,5 kV, Capacitancia 25  $\mu$ F y Resistencia 200  $\Omega$ . Este procedimiento se realizó en hielo. A continuación, se añadieron rápidamente 900  $\mu$ L de medio SOC a 37 °C. Se incubaron por 2 horas a 100 rpm en un agitador de cultivos (Figura 41).

### **2.2.5.4. Selección de colonias bacterianas**

Alícuotas de 200  $\mu$ L de la suspensión anterior se sembraron en placas de petri con medio selectivo de LB con ampicilina. Las placas se dejaron a 37 °C toda la noche. Para poder diferenciar las colonias transformadas (que incorporaron el vector con el inserto de interés) de aquellas colonias que no lo portaran, el medio de cultivo de las placas se suplementó con IPTG y X-Gal, con concentraciones finales de 1 mM y 0,2 mg, respectivamente. Las colonias que incorporaron el vector intacto fueron de color azul, mientras que las que incorporaron el plásmido recombinante fueron blancas; esto debido a la interrupción del gen de la  $\beta$  galactosidasa (Figura 41).

### **2.2.5.5. Colony PCR**

Las colonias blancas fueron estriadas por separado nuevamente en placas con medio selectivo de LB con ampicilina y suplementado con IPTG y X-Gal. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C. Una vez verificado su crecimiento, a partir de la observación visual de la presencia de colonias, una parte de esas colonias fueron aisladas para realizar una *colony PCR* (Figura 41). Brevemente, con la punta de un palillo estéril se picó en una de las colonias aisladas y se colocó el contenido del palillo en un microtubo de 1,5 mL que contenía 50  $\mu$ L de agua destilada. Este procedimiento se repitió con todas las colonias portadoras de fragmentos de PCR de *V. destructor* de interés. Posteriormente, los tubos conteniendo las muestras de bacterias transformadas se colocaron en un *heat block* a 90 °C durante 15 minutos y se usaron como templado para realizar la *colony PCR*. La amplificación del inserto contenido en el vector pGEM se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 1.2.2.2.2 y utilizando los primers ND4-ND4LF/R (Tabla 3).

### **2.2.5.6. Aislamientos**

Una vez confirmada la presencia del inserto en las colonias por *Colony PCR*, se seleccionaron y aislaron diez colonias por cada región mitocondrial analizada. Se realizó un nuevo repique en placas de petri con medio selectivo de LB con ampicilina y suplementado con IPTG y X-Gal (Figura 41).

### 2.2.5.7. Miniprep

A cada una de estas colonias se las hizo crecer durante toda la noche en un medio LB líquido con ampicilina y luego se les extrajo el ADN plasmídico mediante un protocolo de miniprep (Sambrook et al., 1989) (Figura 41). Brevemente, se centrifugó a 10.000 rpm durante tres minutos cada cultivo de a 1.5 mL (tubos), descartando el sobrenadante un máximo de 3 veces. Se resuspendieron las células en 300 µL de Buffer GET (50 mM Tris HCL pH 8, 10 mM EDTA) frío y se pasó los tubos por *vortex*. Luego se agregó a cada tubo 300 µL de Buffer de Lisis (0,2 M NaOH, 1% SDS). Los tubos se mezclaron por inversión una 4 a 6 veces y se los dejó en hielo por cinco minutos. Se agregaron otros 300 µL de Buffer de neutralización (5M Acetato de potasio, ácido acético glacial). Los tubos se invirtieron inmediatamente de forma suave y se colocaron en hielo durante 10 minutos. Se centrifugaron en frío durante 15 minutos a 10.000 rpm y se separaron los sobrenadantes. A éstos se les agregó 1 µL de RNAsa (10 µg/µL) y se los incubó durante 2 horas a 37 °C. Se agregó a cada tubo 600 µL de cloroformo:isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión. Nuevamente, los tubos fueron centrifugados a 10.000 rpm a temperatura ambiente, para luego recuperar la fase superior. Se agregó a cada tubo 600 µL de isopropanol y se los dejó incubando toda la noche a -20 °C. Al otro día, los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm, 4 °C durante 30 minutos, descartándose luego el sobrenadante. Se lavaron los *pellets* con 200 µL de etanol 70% (v/v) y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, pero durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante nuevamente y se dejó evaporar el excedente de etanol 70% (v/v). Una vez evaporado el alcohol, se resuspendió el *pellet* en 40 µL de agua bidestilada. Como control previo a la secuenciación se realizaron PCR siguiendo la metodología descrita en la sección 1.2.2.2.2.

### 2.2.5.8. Secuenciación y análisis

El inserto de las muestras de ADN plasmídico se secuenció en las dos direcciones para evitar errores, utilizando los cebadores T7-SP6. Las secuencias se analizaron utilizando BioEdit (Hall, 1999) y se compararon con las secuencias disponibles públicamente en GenBank utilizando BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Solo se analizaron a nivel de secuencia nucleotídica aquellos individuos que exhibían un pico doble en la posición nucleotídica 8694 del genoma mitocondrial de *V. destructor* (Figura Suplementaria 15), ya que se trató del cambio detectado con mayor frecuencia entre las poblaciones. Otros picos dobles identificados se consideraron sitios potencialmente heteroplásmicos porque no fue posible obtener secuencias de buena calidad a partir de los fragmentos clonados (Tabla 4 y 7; Figura Suplementaria 16).

### 2.2.6. Análisis estadístico

Para evaluar posibles diferencias en el porcentaje de cada subhaplotipo detectado (KArg-N1 y KArg-N2) entre poblaciones, se aplicaron Modelos Lineales Mixtos Generalizados (GLMM) incluyendo la localidad (población de *V. destructor*) como factor fijo y la colonia donde los ácaros fueron muestreados como un factor aleatorio. El mismo análisis se realizó para la variable porcentaje de heteroplasma. Las distribuciones normales de medias y residuos se probaron utilizando las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene. Para obtener la estructura de varianza más adecuada se utilizó el criterio de información de Akaike. Para evaluar las diferencias en las frecuencias tanto haplotípicas como heteroplasmáticas entre localidades, se realizaron comparaciones múltiples utilizando Fisher LSD ( $\alpha = 0,05$ ).

Las diferencias en las frecuencias haplotípicas y de heteroplasma entre regiones (subtropical frente a templada) también se evaluaron mediante la prueba *Chi-Cuadrado*. Para explorar posibles asociaciones entre las frecuencias haplotípicas o la frecuencia de heteroplasma de *V. destructor* con la genética de las abejas melíferas (% de linaje africano A) y variables climáticas y geográficas (temperaturas máximas y mínimas en enero; longitud y latitud), se realizaron correlaciones de Spearman. La información climática se obtuvo de las estaciones agro-meteorológicas más cercanas a las localidades muestreadas utilizando el sistema SIGA versión 1.0.5 (SIGA, 2018) desarrollado por el INTA. Los análisis estadísticos se realizaron con Statistica V 6.0 (Statsoft 2001) e InfoStat 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

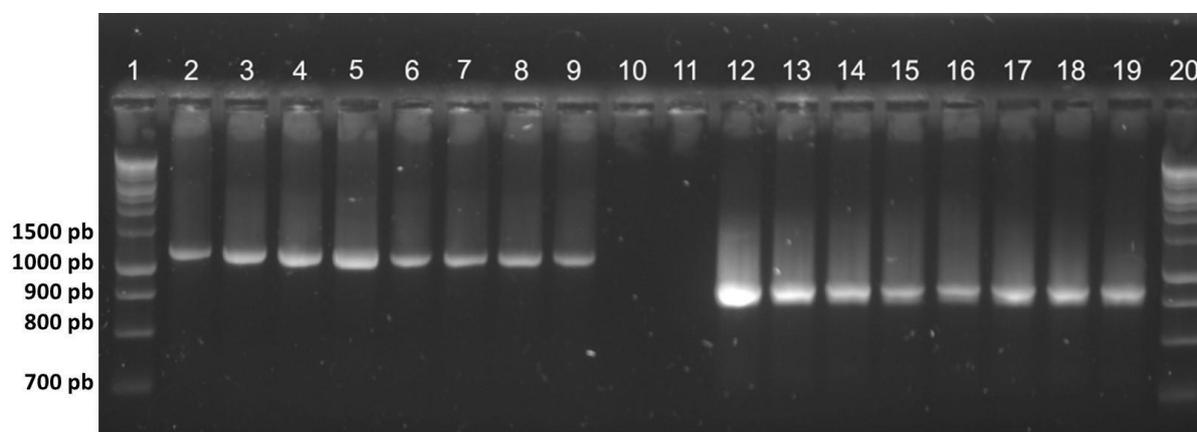
## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Extracción individual de ADN total de *V. destructor*

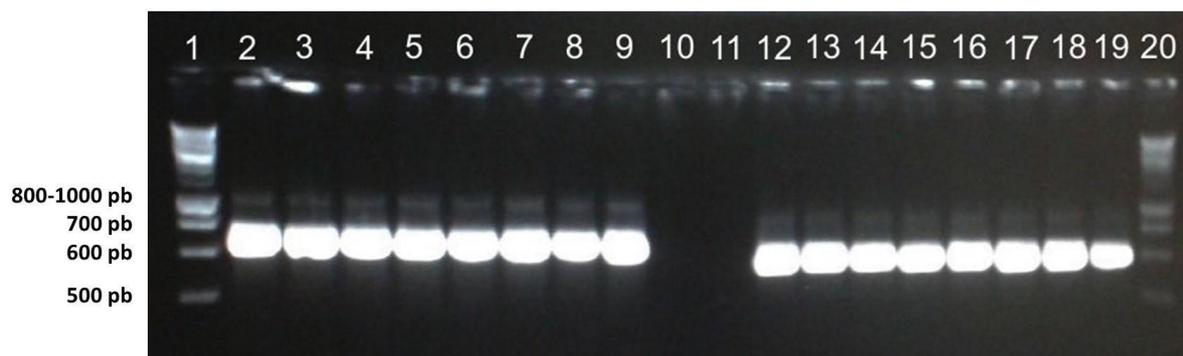
Se logró la puesta a punto de la extracción individual de ADN total de *V. destructor* obteniendo concentraciones entre 10 y 50 ng/ $\mu$ L por ácaro. Las muestras de ADN obtenidas resultaron de la calidad adecuada para ser utilizadas en los análisis genéticos posteriores. Los resultados de los índices de calidad y concentración del ADN extraído se muestran en la Tabla Suplementaria 8. En total, se realizó la extracción de ADN de 182 muestras de *V. destructor* provenientes de diferentes regiones de nuestro país (detalladas en Tabla 2). Estas incluyeron muestras de colonias pertenecientes al apiario experimental establecido en el predio del Instituto de Genética, INTA, y analizadas en el capítulo 1.

### 2.3.2. Amplificación de marcadores del genoma mitocondrial de *V. destructor*

Se obtuvieron bandas únicas y nítidas para todas las regiones del ADN mitocondrial amplificadas (Figuras 38 y 39). A partir del análisis de secuencias nucleotídicas ya publicadas se contaba con el tamaño esperado de los fragmentos de cada región del ADN mitocondrial evaluada. Los tamaños obtenidos coincidieron con los esperados. Particularmente, se obtuvieron productos de amplificación de 1166 y 839 pares de bases para los fragmentos correspondientes al *cox1* y *nd4-nd4L* (Figura 42; Tabla Suplementaria 9 y 10), y de 696 y 636 pares de bases para los correspondientes a *nd5* y *nd4*, respectivamente (Figura 43; Tabla Suplementaria 11 y 12). La calidad y concentración de los productos de PCR fue óptima, lo que permitió su posterior purificación (Tabla Suplementaria 9, 10, 11 y 12) y secuenciación.



**Figura 42.** Fragmentos de PCR de las regiones *cox1* y *nd4-nd4L* del ADN mitocondrial en muestras de *V. destructor*. Gel de agarosa 1,5% p/v. Calle 1 y 20: marcador de peso molecular *DNA Ladder Solis Biodyne 100bp* (100 a 3000 pares de bases). Calles 2-9: productos de PCR para la región *cox1*; Calles 12-19: productos de PCR para la región *nd4-nd4L*; Calles 10 y 11: Control negativo.



**Figura 43.** Fragmentos de PCR para las regiones *nd4* y *nd5* del ADN mitocondrial en muestras de *V. destructor*. Gel de agarosa 1,5%. Calle 1 y 20: marcador de peso molecular *DNA Ladder Solis Biodyne 100 bp* (100 a 3000 pares de bases). Calles 2-9: productos de PCR para la región *nd5*; Calles 12-19: productos de PCR para la región *nd4*; Calles 10 y 11: Control negativo.

### 2.3.3. Análisis de secuencias e identificación de haplotipos

El análisis de secuencias de *cox1* (1166 nucleótidos) confirmó la presencia del haplotipo K para todas las muestras de ADN de *V. destructor* analizadas y evidenció 100% de identidad entre ellas y con las secuencias reportadas como K1-1 (GQ379056) y K1-2 (GQ379057) por Navajas et al. (2010) (Figura Suplementaria 12).

Se obtuvo un total de 2171 nucleótidos de la secuenciación del amplicón correspondiente a *nd4*, *nd4-nd4L* y *nd5* (Figura Suplementaria 13 y 14). La comparación entre las secuencias argentinas y las de referencia reveló dos y cinco cambios puntuales para las regiones *nd* en comparación con el genoma mitocondrial completo de *V. destructor* AY163547.1 (Evans & Lopez, 2002) y AJ493124.2 (Navajas et al., 2002), respectivamente (Tabla 5). Estos cambios son mutaciones sinónimas.

**Tabla 4.** Posiciones nucleotídicas polimórficas y heteroplasmia para el gen *nd* (subunidades *nd5*, *nd4* y *nd4L*) de poblaciones de *V. destructor* de Argentina.

ID de secuencia	<i>nd5</i>	<i>nd4</i>										<i>nd4L</i>			
	7 0 7 6	8 3 1 7	8 3 4 9	8 3 8 5	8 3 9 0	8 3 9 1	8 5 0 3	8 5 2 9	8 5 3 0	8 6 4 5	8 6 9 4	8 7 0 1	8 8 9 5	8 9 4 9	9 0 5 9
<b>Secuencias de referencia</b>															
AJ493124.2 <sup>a</sup>	G	-	T	A	C	A	A	A	T	A	G	G	G	A	A
AY163547.1 <sup>b</sup>	A	A	-	T	C	T	C	A	T	A	G	A	A	-	T
<b>En este estudio</b>															
KArg-N1 <sup>c</sup>	A	-	T	T	C	T	A	A	T	A	G	A	A	A	A
KArg-N2 <sup>c</sup>	A	-	T	T	C	T	A	A	T	A	A	A	A	A	A
KArg-N1/KArg-N2 <sup>d</sup>	A	-	T	T	C	T	A	A	T	A	<b>R</b>	A	A	A	A
Fo/Fa/Ca/Ba <sup>e</sup>	A	-	T	T	<b>V</b>	T	A	A	T	A	G	A	A	A	A
Ci/Le <sup>e</sup>	A	-	T	T	C	T	A	<b>W</b>	T	A	A	A	A	A	A
Ci/Le <sup>e</sup>	A	-	T	T	C	T	A	A	<b>W</b>	A	A	A	A	A	A
Re <sup>e</sup>	A	-	T	T	C	T	A	A	T	<b>W</b>	A	A	A	A	A

Las coordenadas corresponden a las posiciones nucleotídicas establecidas en la secuencia del genoma mitocondrial de *V. destructor* utilizada como referencia (*GenBank Accession Number* AJ493124.2). Los guiones indican deleciones. (a) secuencia según Navajas et al. (2002); (b) secuencia según Evans & López (2002); (c) Secuencias correspondientes a los subhaplotipos detectados; (d) Secuencia correspondiente a un individuo heteroplásmico para la posición 8694; (e) Secuencias correspondientes a otras posiciones potencialmente heteroplásmicas sin confirmar. Utilizamos los códigos de nucleótidos estándar (IUPAC-IUB *Commission on Biochemical Nomenclature*, 1970) para describir los sitios heteroplásmicos (y potencialmente heteroplásmicos), V: A/C; W: A/T; R: A/G.

Específicamente, el análisis de secuencias *nd4* y *nd5* reveló una identidad del 100% entre las muestras, sin la presencia de polimorfismos en los 1332 nucleótidos analizados (Figura Suplementaria 13 y 14). Por el contrario, el análisis de la secuencia *nd4-nd4L* evidenció un sitio polimórfico en la posición

nucleotídica 8694 (coordinada de AJ493124.1; Tabla 5). Tras el análisis de 182 individuos detectamos que el 73,6% de las secuencias obtenidas (correspondientes a 134 ácaros) eran idénticas a ambas secuencias de referencia (AY163547.1 y AJ493124.2), en adelante denominadas KArg-N1 (Tablas 5 y 6). Las restantes secuencias (26.4%, 48 ácaros) mostraron un nucleótido diferente en la posición mencionada o resultaron heteroplásmicas (Tablas 5 y 6). El polimorfismo detectado implica el cambio de una G a una A, y representa una nueva variante del haplotipo K, en lo sucesivo denominado subhaplotipo KArg-N2 (Tabla 4, Figura Suplementaria 15). Mientras que el subhaplotipo KArg-N1 se detectó en todas las poblaciones de ácaros analizadas, el subhaplotipo KArg-N2 se presentó con menor frecuencia y en siete de las diez poblaciones analizadas (Figura 44, Tabla 5).

**Tabla 5.** Porcentajes y frecuencias absolutas de los subhaplotipos mitocondriales (K-ArgN1 y K-ArgN2) y de heteroplasmia (Het.) detectados en las poblaciones de *V. destructor* analizadas.

Localidad	Porcentajes			Frecuencias Absolutas			
	K-ArgN1	K-ArgN2	Het.	K-ArgN1	K-ArgN2	Het.	Total
Castelli	54,5 A	18,2 A	27,3 A	12	4	6	22
Formosa	94,6 B	5,4 A	0 B	35	2	0	37
Leales	46,9 A	9,4 A	43,7 A	15	3	14	32
Famaillá	66,7 AB	9,5 A	23,8 AB	14	2	5	21
Reconquista	72,2 AB	0 A	27,8 AB	13	0	5	18
Santa Fe	85,7 AB	0 A	14,3 AB	6	0	1	7
Rafaela	88,9 AB	11,1 A	0 AB	8	1	0	9
Castelar	87,5 AB	6,2 A	6,3 AB	14	1	1	16
Balcarce	81,8 AB	9,1 A	9,1 AB	9	1	1	11
Ascasubi	88,9 AB	0 A	11,1 AB	8	0	1	9
TOTAL	73,6	7,7	18,7	134	14	34	182

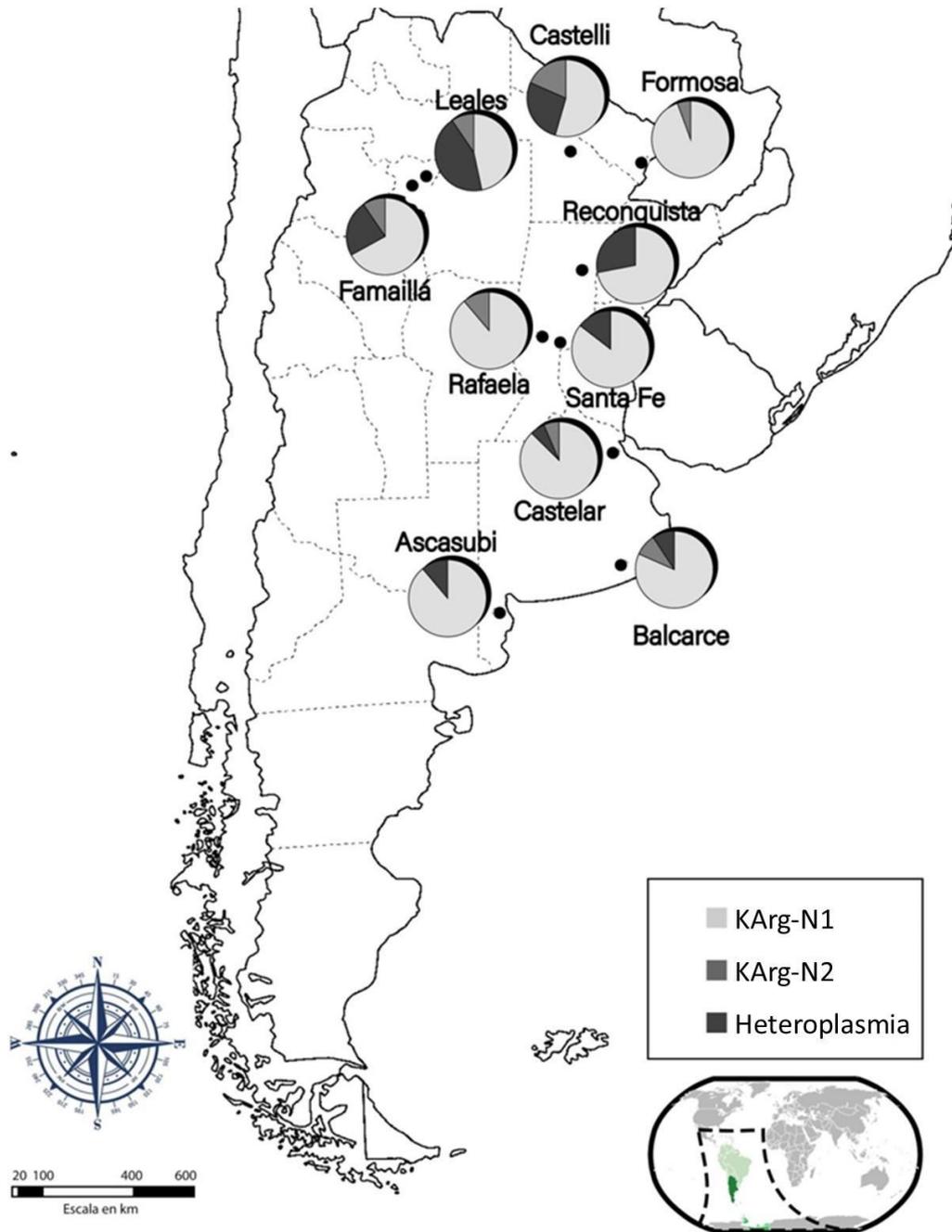
Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre localidades (resultados de comparaciones pareadas, GLMM). Se muestra el número de individuos totales analizados de cada localidad. Het., heteroplasmia.

Aunque el porcentaje del subhaplotipo KArg-N2 parece diferir entre localidades, particularmente entre poblaciones subtropicales y templadas, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en el análisis GLMM. Sin embargo, se encontró una asociación significativa entre el porcentaje del subhaplotipo KArg-N2 y la latitud (localización de la población) (correlación de Spearman, coef: 0,63,  $P < 0,05$ ). El porcentaje del subhaplotipo KArg-N1 resultó significativamente diferente entre las poblaciones de ácaros analizadas ( $F_{9,30} = 154,27$ ,  $P < 0,000$ ; resultados GLMM) (Tabla 5; Figura 44). En particular, las poblaciones de Castelli y Leales mostraron los porcentajes más bajos de KArg-N1, en comparación con Formosa, que presentó la mayor frecuencia de este subhaplotipo (comparaciones múltiples Fisher LSD; Figura 44; Tabla 5). Las demás poblaciones mostraron valores intermedios de este subhaplotipo (Figura 44; Tabla 5). De acuerdo con los resultados de KArg-N2, se encontró una asociación marginalmente significativa entre el porcentaje del KArg-N1 y la latitud de la población de *V. destructor* (correlación de Spearman: coef= -0,58;  $P = 0,08$ ). No se encontraron asociaciones entre la frecuencia de los subhaplotipos de *V. destructor* (KArg-N1 y KArg-N2) y el linaje mitocondrial de las colonias de *A. mellifera* u otras variables consideradas (altitud, temperaturas máximas y mínimas en enero; longitud y clima).

En cuanto a la variación en los porcentajes de cada subhaplotipo dentro de las colonias, los resultados indicaron coexistencia en una misma colonia de ácaros con diferentes subhaplotipos para todas las poblaciones analizadas. La frecuencia de co-infestación varió entre 33 y 75% (excepto Formosa, donde solo el 14% de las colonias presentaron ácaros con diferentes haplotipos mitocondriales), y no mostró diferencias significativas entre poblaciones (*Chi-Cuadrado*: 5,7;  $P = 0,22$ ; Tabla 6).

#### **2.3.4. Análisis de la heteroplasma**

El análisis cualitativo de los cromatogramas de las secuencias obtenidas nos permitió identificar dobles picos de altura similar en la posición 8694 (correspondiente al gen *nd4*, específicamente al sitio polimórfico entre los subhaplotipos detectados), tomando como genoma mt de referencia el de AJ493124.2 (Navajas et al., 2002). El análisis de secuencias de los fragmentos de PCR *nd4-nd4L* clonados de las muestras que mostraban dobles picos confirmó la presencia de heteroplasma de sitio, dado que se obtuvieron secuencias de ambas variantes mediante la técnica de clonado (Figura Suplementaria 16).



**Figura 44.** Distribución de los subhaplotipos de ADNmt y heteroplasmia de sitio (basada en el gen *nd4*) detectados en poblaciones de *V. destructor* de Argentina. Ver definición de KArg-N1/N2 en la Tabla 4.

**Tabla 6.** Porcentajes de co-infestaciones de ácaros en las colonias estudiadas según la localidad. Se consideró que una colonia estaba co-infestada cuando presentaba ácaros con distinto subhaplotipo (K-ArgN1, K-ArgN2) o con heteroplasmia.

Localidad	Porcentaje de co-infestación
Castelli	45,45
Formosa	14,29
Leales	41,67
Famaillá	37,50
Reconquista	66,67
Santa Fe	66,67
Rafaela	50,00
Castelar	50,00
Balcarce	75,00
Ascasubi	33,33
Total	44,07

Considerando todas las poblaciones muestreadas se detectó un 18,7% de ácaros que contenían dos secuencias *nd4-nd4L* diferentes (las correspondientes a KArg-N1 y KArg-N2), con porcentajes de heteroplasmia que variaron entre localidades ( $F_{9,30}=9,29$ ;  $P=0,0048$ , resultados GLMM, Figura 44 y Tabla 5). Las poblaciones de *V. destructor* de Castelli y Leales mostraron los porcentajes más altos de heteroplasmia (43,7% y 27,3%, respectivamente; Figura 44 y Tabla 5) y fueron estadísticamente diferentes de las otras poblaciones ( $P<0,001$ , Fisher LSD, resultados GLMM). En general, para las poblaciones de clima templado, la frecuencia de heteroplasmia (7,7%) fue significativamente menor que para las poblaciones subtropicales (23,1%) ( $Chi$ -Cuadrado (2) = 5,79;  $P <0,05$ ). Sin embargo, la población de Formosa exhibió un patrón diferente al de otras poblaciones subtropicales y no presentó individuos heteroplásmicos (Figura 44 y Tabla 5).

Por otro lado, se detectaron otros sitios potencialmente heteroplásmicos presentes en las secuencias correspondientes al gen *nd4* (Tabla 4; Tabla 7). Consideramos estas posiciones como "sitios potencialmente heteroplásmicos" debido a la presencia de dobles picos y la ausencia de alguna de las variantes homoplásmicas, aunque los mismos no pudieron ser confirmados por clonado. Estos

cambios se visualizaron en los cromatogramas y corresponden a las coordenadas 8390, 8529-8530 y 8645 de la secuencia de referencia del genoma mitocondrial de *V. destructor* (AJ493124.1) (Tabla 4; Tabla 7). Específicamente, el doble pico en la posición 8390 (C/A) estuvo presente en el 12,2 % de las muestras en cinco de las diez poblaciones analizadas (Tabla 7). El 87,8% de las muestras restantes presentaron el nucleótido C, mientras que ninguna de las 182 secuencias analizadas presentaron el nucleótido A en esta posición. Este cambio es una mutación no sinónima que produce una modificación en el aminoácido codificado (ácido glutámico) (187:A) y genera un codón de terminación (Figura Suplementaria 17). Los dobles picos identificados en las posiciones 8529 y 8530 (AT/TA; Tabla 7) se detectaron simultáneamente en el 8,8 % de las muestras y se evidenciaron sólo en dos de las diez poblaciones de ácaros analizadas. Se trata de una mutación no sinónima que conduce a la sustitución de asparagina (140:N) (un aminoácido polar sin carga) por metionina (M) (un aminoácido alifático no polar; Figura Suplementaria 17). Finalmente, el doble pico en la posición 8645 (A/T) estuvo presente solo en una de las muestras, perteneciente a una colonia de Reconquista (provincia de Santa Fe) (Tabla 7). Esta es una mutación no sinónima que conduce a la sustitución de fenilalanina (102:F) (un aminoácido del grupo de los aromáticos) por isoleucina (I) (un aminoácido alifático no polar; Figura Suplementaria 17).

**Tabla 7.** Porcentaje de muestras de *V. destructor* que exhiben posiciones potencialmente heteroplásmicas en la secuencia del gen *nd4*.

<b>Coordenadas</b>	<b>8390</b>	<b>8529</b>	<b>8530</b>	<b>8645</b>	<b>N</b>
<b>Homoplasmia registrada</b>	C	A	T	A	
<b>Sitios potencialmente heteroplásmico</b>	V	W	W	W	
<b>Localidades</b>					
Castelli	0	23,8 (5)	23,8 (5)	0	22
Formosa	14,3 (5)	0	0	0	37
Leales	23,3 (7)	33,3 (10)	33,3 (10)	0	32
Famaillá	9,1 (2)	0	0	0	21
Reconquista	0	0	0	5,5 (1)	18
Castelar	6,2 (1)	0	0	0	16
Balcarce	36,4 (4)	0	0	0	11
Santa Fe	0	0	0	0	7
Rafaela	0	0	0	0	9
Ascasubi	0	0	0	0	9
<b>Total</b>	<b>12,2 (19)</b>	<b>8,8 (15)</b>	<b>8,8 (15)</b>	<b>0,6 (1)</b>	<b>182</b>

Las coordenadas corresponden a las posiciones nucleotídicas establecidas en la secuencia del genoma mitocondrial de *V. destructor* utilizada como referencia (*GenBank Accession Number* AJ493124.2). Definimos el término "sitios potencialmente heteroplásmicos" como una ambigüedad en la secuencia de nucleótidos (doble pico en los cromatogramas) de varios ácaros individuales que no tuvieron la confirmación por clonación.

Además, estas secuencias solo exhibieron una de las variantes homoplásmicas (homoplasmia registrada) en todos los casos. Las frecuencias absolutas de muestras heteroplásmicas para cada localidad se muestran entre paréntesis. N: número de ácaros analizados. Utilizamos los códigos de nucleótidos estándar (IUPAC-IUB *Commission on Biochemical Nomenclature*, 1970) para describir los sitios potencialmente heteroplásmicos, V: A/C; W: A/T.

## 2.4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos proporcionan información valiosa sobre la variabilidad genética de las poblaciones de *V. destructor* presentes en colonias de *A. mellifera* manejadas con fines comerciales de las regiones apícolas más importantes de Argentina correspondientes a zonas templadas y subtropicales del territorio. Mediante PCR y secuenciación de cuatro regiones del ADNmt, analizamos la diversidad genética presente en este ácaro, previamente no explorada. Nuestros datos están en línea con la baja variabilidad genética descrita para esta especie (p. ej., Solignac et al., 2005; Navajas et al., 2010), pero revelan un sitio polimórfico previamente no informado para el marcador mitocondrial ND4 y confirman la presencia de heteroplasma en *V. destructor*.

La variabilidad genética de las poblaciones de *V. destructor* del mundo se ha estudiado ampliamente utilizando marcadores mitocondriales basados en el análisis de una región (458 pb) del gen *citocromo oxidasa 1* (Solignac et al., 2005; Warrit et al., 2006; Muñoz et al., 2008; Strapazon et al., 2009; Navajas et al., 2010). Utilizando este marcador, se ha informado la existencia de dos haplotipos mitocondriales (K1 y J1) que infestan con éxito las colonias de *A. mellifera* (Navajas et al., 2010). Aquí, aplicando este mismo marcador (secuencia de *cox1* de 1116 pb), se detectó la presencia exclusiva del haplotipo K1 y el 100% de identidad de secuencia entre las poblaciones analizadas de *V. destructor* de Argentina. De acuerdo con Maggi y colaboradores (2012), no se detectó el haplotipo J en ninguna de estas poblaciones locales, lo que refuerza la evidencia sobre la presencia exclusiva de este haplotipo en áreas restringidas de Brasil (Isla Fernando de Noronha) (Guerra et al., 2010). La ausencia de variabilidad en la región *cox1* en nuestras poblaciones es consistente con resultados previos en otras poblaciones del ácaro (Solignac et al., 2005; Muñoz et al., 2008; Navajas et al., 2010; Gajic et al., 2013; 2016; 2019; Salvaé et al., 2016; Kelomey et al., 2017) y apoya la hipótesis de un cuello de botella que ocurrió al comienzo de la invasión de *A. mellifera*, como lo sugirieron previamente Solignac et al. (2005). Además, se ha propuesto que cuellos de botella adicionales podrían haberse producido a medida que *V. destructor* se propagaba por todo el mundo (ver Roberts et al., 2015; Techer et al., 2022).

Si bien la baja variabilidad genética parece ser una tendencia general en *V. destructor*, el análisis de nuevos marcadores mitocondriales presenta un desafío y puede ser útil para detectar nuevas variantes nucleotídicas como lo demuestran antecedentes previos (Navajas et al., 2010; Gagic et al., 2013). Asimismo, estos marcadores permitirían monitorear rasgos relevantes en poblaciones específicas de ácaros, como la resistencia a los acaricidas (ver Beaurepaire et al., 2017; Millán-Leiva et al., 2021). Nuestros resultados, basados en el análisis de la secuencia del gen *nad4*, permitieron identificar dos subhaplotipos de K1 (KArg-N1 y KArg-N2) en poblaciones argentinas de *V. destructor*.

KArg-N2 corresponde a una nueva variante reportada para el haplogrupo K1, y está presente en la mayoría de las poblaciones aquí analizadas. En comparación con las secuencias descritas previamente del genoma mitocondrial de ácaros con haplotipo K (Evans & López, 2001; Navajas et al., 2002) y con el subhaplotipo KArg-N1, el subhaplotipo KArg-N2 exhibe una mutación sinónima en la secuencia *nad4*, puntualmente en la posición nucleotídica 8694 (AJ493124.1). Esta nueva variante parece estar bien establecida en las colonias de abejas, ya que está ampliamente distribuida entre las poblaciones del ácaro analizadas y se presenta en frecuencias relativamente altas. Esto podría explicarse por el sistema reproductivo endogámico y haplodiploide del ácaro que tiende a fijar nuevas mutaciones (Solignac et al., 2005; Rosenkranz et al., 2010; Nazzi & Le Conte, 2016), por el posterior intercambio genético de ácaros dentro de la colonia y la interacción de ácaros entre colonias impulsada por el movimiento natural de las abejas o la incidencia humana (Dynes et al., 2017).

La trashumancia es una actividad humana habitual en la que se trasladan colonias de abejas con fines de polinización de cultivos o en busca de zonas de floración más temprana para la multiplicación de las colonias. Cada año, los apicultores de las regiones templadas (principalmente de la provincia de Buenos Aires) trasladan colonias del sur (clima templado) al norte (clima subtropical) del territorio para encontrar mejores condiciones para la multiplicación de las colonias y obtener ventajas en las etapas iniciales de la temporada de producción de miel (Agra et al., 2018). Esta práctica, junto con el comercio de núcleos y paquetes de abejas entre diferentes regiones, contribuye al flujo de genes entre las poblaciones de abejas melíferas y, en consecuencia, conduce a interacciones entre ácaros que parasitan diferentes colonias. Nosotros encontramos que la frecuencia del nuevo subhaplotipo difiere entre las poblaciones analizadas y muestra una asociación positiva con la latitud. En este escenario, podríamos localizar el origen putativo del subhaplotipo KArg-N2 en el norte de Argentina. Esta variante pudo haberse originado en esta área o bien haber sido introducida desde un país vecino, para luego extenderse a las poblaciones del sur, posiblemente mediado por movimientos de colonias. Sin embargo, los presentes resultados no indican si el subhaplotipo detectado se originó en poblaciones argentinas o es "ancestral" a las poblaciones americanas del ácaro. En este sentido, el análisis de este marcador en otras poblaciones de Brasil, Uruguay o la región podría generar información sobre el origen y posterior dispersión de esta nueva variante.

Además de la influencia humana a través de la trashumancia y las actividades comerciales, el origen genético de las abejas podría explicar el patrón observado en las frecuencias de subhaplotipos de *V. destructor*. Aunque no encontramos una asociación significativa entre el linaje mitocondrial de la colonia y la frecuencia del subhaplotipo del ácaro, sí encontramos una asociación entre el subhaplotipo del ácaro y la latitud de la población. En un trabajo en que se caracterizó la variabilidad

genética de las abejas melíferas de Argentina, Agra et al. (2018) detectaron un clina latitudinal de norte a sur para el nivel de hibridación entre abejas africanizadas y europeas basándose en el uso de marcadores altamente polimórficos (microsatélites). Un nuevo análisis genético de las colonias de abejas melíferas de nuestro estudio utilizando microsatélites u otro tipo de marcadores altamente polimórficos podría ser útil para detectar alguna asociación entre el haplotipo del ácaro y el origen genético de la abeja, considerando la clina latitudinal descrita y otros factores involucrados en el ciclo estacional y la dispersión de los ácaros en cada ambiente.

Para todas las poblaciones analizadas, encontramos ácaros con distintos subhaplotipo dentro de una misma colonia. De hecho, esta coexistencia parece ser habitual en nuestras poblaciones de *V. destructor*. Estos resultados están en línea con Dynes y colaboradores (2017), quienes encontraron una estructura poblacional de *V. destructor* donde individuos genéticamente distintos coexisten en la misma colonia y un mayor cruzamiento entre éstos de lo que se esperaba anteriormente (ver Dietemann et al., 2019). Según lo propuesto por estos autores, una posible explicación de esta diversidad es el intercambio genético entre ácaros dentro de la colonia (Dynes et al., 2017). Aunque la mayoría de los apareamientos en *V. destructor* ocurren entre hermanos dentro de la celda de cría, pueden ocurrir cruzamientos no endogámicos cuando más de una hembra fundadora ingresa a la misma celda de cría para realizar su ciclo reproductivo. Este fenómeno ocurre con mayor frecuencia en puntos específicos del ciclo anual de la colonia, cuando la proporción de ácaros en la cría es alta, como a fines del verano (Dynes et al., 2017; Beaupaire et al., 2017). De hecho, en los climas templados de Argentina, y en particular en el apiario analizado, se detectan con frecuencia infestaciones múltiples de ácaros en las celdas de cría de obreras a principios de otoño y en las celdas de cría de zánganos durante la primavera, lo que posiblemente contribuya a cruzamientos entre ácaros no emparentados dentro de la celda.

La heteroplasmia fue identificada en varias de las muestras analizadas de las poblaciones argentinas de *V. destructor* aquí analizadas. Estos hallazgos están en línea con los resultados preliminares de Navajas et al. (2002), quienes sugirieron la existencia de este fenómeno en la especie, y con un estudio más reciente realizado en poblaciones serbias del ácaro (Gajic et al., 2016). Usando los métodos ARMS y RFLP, estos autores detectaron heteroplasmia de sitio dentro de las secuencias de *cox1* y *cytb*, en sitios que definen haplotipos, particularmente para los haplotipos S1 y P1 descritos para la región (Gajic et al., 2013; 2016; 2019). En este sentido, los presentes análisis reportan la primera ocurrencia de heteroplasmia de sitio dentro de la secuencia *nad4* en *V. destructor* (y para el haplotipo K1) y sugiere que este fenómeno sería relativamente frecuente en esta especie de ácaro. Aunque la prevalencia de la heteroplasmia varió entre poblaciones, los resultados parecen respaldar la

estabilidad de este fenómeno, si bien este hallazgo debe ser profundizado mediante análisis de cruzamientos dirigidos y su descendencia, como así también la búsqueda de asociaciones con aspectos fisiológicos del parásito y el ambiente.

La heteroplasmia ha sido explicada por diferentes mecanismos en diferentes especies (Wolf et al., 2013; Xiong et al., 2013; Robinson et al., 2015) y está relacionada con la tasa de mutación inherentemente alta del ADN mitocondrial, la naturaleza propensa a errores de la ADN polimerasa, y la falta de mecanismos de reparación del ADN dentro de las mitocondrias (Avisé, 2000; Chinnery et al., 2000; Wolf et al., 2013). Las mutaciones pueden surgir durante la gametogénesis y el desarrollo embrionario, generando haplotipos nuevos. Si se generan mutaciones dentro de las células germinales femeninas, estos nuevos haplotipos mitocondriales pueden transmitirse a la descendencia si persisten a través del cuello de botella de la línea germinal asociado con la formación de ovocitos y escapan a la selección contra mutaciones perjudiciales (Chinnery et al., 2000; White et al., 2008). El fenómeno de mutación en la mitocondria con un posterior paso de generación en generación, parecería ser un mecanismo plausible que genere heteroplasmia en *V. destructor*, ya que es común en otros artrópodos ectoparásitos de la Subclase Acari (Van Leeuwen et al., 2008; 2010).

Los resultados logrados en la caracterización genética de *V. destructor* en colonias comerciales de *A. mellifera* de Argentina, abren las puertas a nuevas líneas de investigación para la conformación de una base de datos completa de las características genéticas, fisiológicas, de virulencia y de dispersión del ácaro, con fines de facilitar estudios futuros de asociación con eventos poblacionales o rasgos de interés en el estudio del sistema abeja: ácaro.

# Capítulo 3. Transcriptoma de Varroa destructor: Identificación de transcriptos potencialmente involucrados en el éxito reproductivo del ácaro

## 3.1. INTRODUCCIÓN

### 3.1.1. RNA-Seq

#### 3.1.1.1. Secuenciación de nueva generación y experimentos de *RNA-Seq*

Con el desarrollo de las nuevas herramientas de secuenciación de ADN y ARN, denominadas secuenciación de nueva generación (NGS, de sus siglas en inglés *Next Generation Sequencing*), fue posible disponer de un nuevo enfoque de secuenciación a gran escala (*HTS-High Throughput Sequencing*) (Heather & Chain, 2016). Estas nuevas metodologías han aumentado considerablemente la escala y resolución de los análisis genómicos. Además, la reducción de la cantidad de muestra necesaria y la disminución significativa en los costos de secuenciación de nucleótidos permitió la aplicación de NGS en la secuenciación de genomas completos, metagenomas, transcriptomas, exomas, RNA no codificantes, inmunoprecipitaciones, entre varias otras aplicaciones (Wang et al., 2009; Muhammad et al., 2020).

Para acompañar el avance de las técnicas de secuenciación y las nuevas necesidades de análisis de la cantidad masiva de datos generados, ha surgido una nueva disciplina, denominada bioinformática, un campo interdisciplinario que aplica técnicas informáticas a la biología (Quail et al., 2012). Desde entonces, han surgido nuevos programas computacionales y desarrollos de procesos de análisis. Actualmente, las herramientas bioinformáticas disponibles permiten a los investigadores analizar rápidamente conjuntos de datos genéticos diversos, incluyendo comparaciones entre diferentes células, tejidos, órganos y tratamientos, entre otras. Al final del procesamiento, estas herramientas de análisis permiten realizar inferencias sobre los mecanismos genéticos y rutas metabólicas potencialmente involucradas y la selección de genes candidatos para profundizar los estudios sobre su funcionalidad. Sin embargo, el paso clave para disminuir los falsos positivos y garantizar una buena relación costo/tiempo, es la elaboración de un diseño experimental que represente el proceso biológico de interés y permita un mejor uso de los datos y el desarrollo de un análisis robusto. Para ello, se plantea generalmente una estrategia de trabajo bioinformático (*pipeline*) que utilice los paquetes de programas más apropiados según el diseño experimental.

La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica en una célula o tejido es posible a través de la implementación de la secuenciación de ARN, conocida como *RNA-Seq* (Wang et al., 2009; Garber et al., 2011; Egan et al., 2012; Ward et al., 2012). Esta herramienta ha cambiado la manera de cómo se analizan y comprenden los transcriptomas (Wang et al., 2009). Además, el *RNA-Seq* da una cobertura completa de transcritos, genera información no solo de la secuencia, sino también de la estructura de exones y posibles eventos de *splicing* alternativo (Lister et al., 2009; Gullledge et al.,

2012) y permite realizar análisis de cuantificación de la expresión génica. De esta manera, la información puede ser integrada e interpretada de una forma holística, y se constituye de gran utilidad para vislumbrar procesos biológicos y mecanismos de co-expresión génica.

Para la obtención de resultados robustos mediante la técnica de *RNA-Seq*, se han probado diferentes programas de acuerdo a los diseños experimentales para lograr una alta correlación entre los resultados de *RNA-Seq* y la validación por qPCR (Camarena et al., 2010; Feng et al., 2010; Zhang et al., 2018; Wang et al., 2019). Por ejemplo, Everaert et al. (2017) compararon lecturas de secuenciación de ARN mensajero procesadas con cinco flujos de trabajo diferentes (Tophat-HTSeq, Tophat-Cufflinks, STAR-HTSeq, Kallisto & Salmon) y resultados de niveles de expresión génica generados por ensayos de qPCR, y mostraron diferentes grados de precisión según el experimento. Estos estudios fortalecen la solidez de *RNA-Seq* como una metodología confiable para el análisis de transcriptomas y la cuantificación de la expresión génica a gran escala, y refuerzan la importancia del uso de las herramientas bioinformáticas apropiadas para el diseño experimental que se pretende realizar (Conesa et al., 2016).

En el caso de organismos con genomas de referencia conocido y disponible, durante el procesamiento de datos, es posible que las lecturas cortas de secuencias de ARN se puedan identificar mediante su alineamiento (o mapeo) con el genoma de referencia. Para organismos de los cuales no se dispone de genomas de referencia, se necesita la realización del ensamble *de novo* del transcriptoma. En particular, con respecto al análisis de *RNA-Seq* basado en genomas de referencia, el consorcio de evaluación de anotaciones genómicas de datos de *RNA-Seq* (RGASP, de sus siglas en inglés “*RNA-seq Genome Annotation Assessment Project*”) ha llevado a cabo una evaluación sistemática de los principales procesos bioinformáticos y programas de alineamiento, reconstrucción de transcritos y cuantificación para este tipo de datos (Steijger et al., 2013; Engström et al., 2013). Estos autores, resaltan el diseño de procesos bioinformáticos adecuados para cada diseño experimental y el uso de programas que implementen análisis robustos utilizando los algoritmos más procesivos.

### **3.1.2. Estudios genómicos en *Varroa destructor***

En los últimos años, el gran impacto negativo, tanto económico y como sanitario, que ha ocasionado el ácaro *V. destructor* sobre las colonias de *A. mellifera*, ha impulsado la realización de esfuerzos de secuenciación genómica y transcriptómica para la identificación de genes clave en ácaros a partir del conocimiento previo generado en insectos y otros artrópodos (revisado en Evans & Cook, 2018; Zdobnov et al., 2017). Recientemente, se publicaron los resultados de estudios proteómicos en *V. destructor*, que permitieron categorizar la expresión génica específica de edad y sexo de esta especie

(McAfee et al., 2017). Los recursos genómicos también permitieron identificar los mecanismos moleculares detrás de rasgos clave del ácaro, desde la virulencia hasta la resistencia a los acaricidas (revisado en Evans & Cook, 2018). Asimismo, se han realizado avances para comprender los cambios subyacentes a las transiciones entre fases de su ciclo de vida y estado fisiológico, tanto a nivel proteómico como transcriptómico (McAfee et al., 2017; Mondet et al., 2018). Estos últimos autores encontraron una amplia remodelación del transcriptoma de *V. destructor*, con una sobre-regulación de los procesos energéticos y metabólicos de la quitina durante las fases inicial y final del ciclo de vida (por ejemplo, las etapas forética y post-oviposición), e identificaron genes relacionados con funciones de regulación transcripcional que se sobre-expresan durante la fase reproductiva. Estos estudios resaltan la importancia de las herramientas genómicas para profundizar en aspectos claves de la interacción parásito-hospedador y la salud apícola (revisado en Grozinger & Robinson, 2015), y posibilitan la identificación de genes candidatos involucrados en dicha interacción, particularmente aquellos vinculados con la reproducción del ácaro dentro de la celda de cría de la abeja.

### **3.1.3. Bases genéticas de la reproducción en *V. destructor***

El éxito reproductivo de *V. destructor* se basa en una coordinación efectiva entre la preparación fisiológica y la capacidad de respuesta a las señales del huésped (revisado por Evans & Cook, 2018). El entorno de la celda de cría juega un papel esencial en la regulación de la oviposición de los ácaros (Milani & Chiesa, 1990; Milani & Nazzi, 1994; Donzé et al., 1997; Garrido et al., 2003; Frey et al., 2013). Específicamente, experimentos de comportamiento realizados previamente, mostraron que las condiciones en las celdas de cría de *A. mellifera* promueven la maduración de los huevos del ácaro y desencadenan la oviposición durante las primeras 24 h post operculado (Frey et al., 2013). Más recientemente, y de forma complementaria, otros estudios han identificado genes potencialmente asociados con la reproducción de *V. destructor*. Particularmente, Cabrera et al. (2013a,b) han evidenciado que los genes que codifican para las vitelogeninas 1 y 2 (*Vg1* y *Vg2*) aumentan sus niveles de expresión en el ácaro después del operculado de la celda de cría, sobre todo en el momento de la formación del capullo, previo a que la cría de la abeja sea una prepupa. En efecto, las vitelogeninas, especialmente la *Vg1*, fueron vinculadas con el inicio de la vitelogénesis en *V. destructor* (Cabrera et al., 2013a). Por otra parte, los genes *Halloween* (*CYP302a1*, *CYP307a1* y *CYP314a1*), un grupo de genes que codifican enzimas P450, encargadas de la hidroxilación secuencial de hormonas derivadas del colesterol en la vía biosintética de ecdisteroides, han sido propuestos como claves en la reproducción del ácaro, ya que el producto final de esta vía activaría la expresión de los genes de vitelogenina nombrados (Cabrera et al., 2015). Por su parte, la proteína de transferencia de lípidos grandes (codificada por el gen *LLTP*) es un transportador de lípidos altamente vinculado con las vitelogeninas

y con su correcta distribución en el organismo. De acuerdo a estudios previos, la expresión de este gen disminuye en el momento de la reproducción del ácaro (Cabrera et al., 2013 b). Por otro lado, Huang et al. (2017) propusieron tres genes potencialmente involucrados en la reproducción de *V. destructor* (genes de la *proteína ribosomal L8* (Rpl8), la *proteína ribosomal L11* (Rpl11) y la *subunidad de adenosina trifosfatasa del proteosoma 26S* (Pros26S)). Los mencionados autores encontraron que el silenciamiento de estos genes a través de ARN doble cadena, se correlacionó con un descenso significativo en el éxito reproductivo del ácaro (Huang et al., 2017). Además de la función de genes codificantes para proteínas, recientemente, se ha realizado una contribución importante al estudio de ARNs largos no codificantes (lncRNA) en *V. destructor* y se ha sugerido, mediante estudios *in silico*, que estas moléculas podrían tener funciones regulatorias en procesos celulares claves que ocurren durante la fase reproductiva del ácaro (Lin et al., 2020). A pesar de estos avances, los cambios transcripcionales asociados al éxito reproductivo del ácaro y la identificación de aquellos genes tempranos responsables del progreso efectivo de la reproducción dentro de la celda de cría, son todavía un aspecto clave a explorar en *V. destructor*.

En este capítulo, se presentan los principales resultados de un análisis transcriptómico realizado sobre ácaros de edad controlada (primer ciclo), que incluye a hembras en estado forético, y a hembras fundadoras reproductivas y no reproductivas en la fase de oviposición. Específicamente, estudiamos un momento clave, el cuarto día luego del operculado de la celda de cría de las abejas, momento en el que es posible distinguir si una hembra fundadora inició la postura del primer huevo en el período de tiempo descrito para la especie (de acuerdo al desarrollo de su hospedador) o se retrasó por factores intrínsecos o del ambiente.

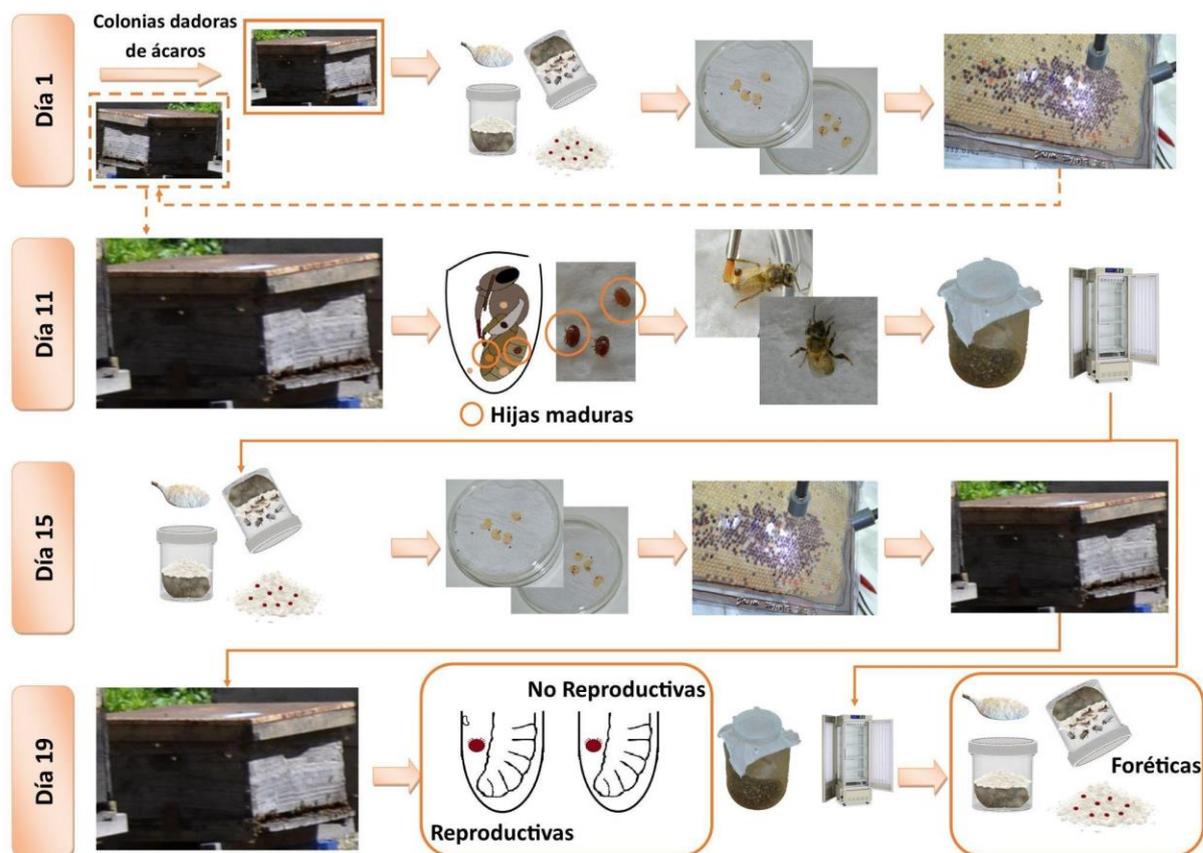
## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Material**

Los experimentos se realizaron durante los meses de verano de la temporada 2018-2019, utilizando colonias de *A. mellifera* infestadas naturalmente con *V. destructor* disponibles en el apiario experimental del Instituto de Genética (INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina). Específicamente para la obtención de las muestras de ácaros para el análisis transcriptómico se utilizaron las colonias que fueron caracterizadas por su comportamiento higiénico hacia *V. destructor* y cuyos resultados se muestran en el capítulo 1. Dichas colonias se utilizaron como dadoras de cuadros de cría. Además, se usaron otras colonias de abejas con cargas parasitarias elevadas como dadoras de ácaros foréticos, establecidas en el apiario experimental del Instituto de Investigación en Tecnología de Alimentos, INTA (Castelar) nombrado en la sección 1.2.2.4.1. (Capítulo 1).

### **3.2.2. Obtención de muestras de *V. destructor* en estado reproductivo, no reproductivo y forético en su primer ciclo de vida**

Con el fin de obtener ácaros con ciclo de vida controlado y edad homogénea para el análisis transcriptómico, se desarrolló una cría semi-artificial de *V. destructor* (Figura 45; Muntaabski et al. 2022, en revisión). Brevemente, de cada colonia se eligió un cuadro con cría de larva 5 (L5) sin opercular; estas celdas se marcaron en una hoja de acetato transparente (mapa). Una vez obtenidos los mapas, los cuadros se volvieron a colocar en las colmenas. Cinco horas más tarde, se identificaron en cada cuadro las celdas de cría de obreras recientemente operculadas, haciendo uso del mapa, y se infestaron artificialmente con un ácaro (hembra fundadora). Las celdas infestadas se obtuvieron abriendo el opérculo con un bisturí e introduciendo la hembra fundadora en una celda de cría recién operculada usando un pincel fino. Posteriormente, las celdas se cerraron empujando suavemente el opérculo y cubriendo toda la superficie de las mismas (Figura 45).



**Figura 45.** Diseño experimental realizado para obtener las muestras de *V. destructor* para el análisis transcriptómico. Tomado de Muntaabski et al. (2022) en revisión.

Los cuadros que contenían las celdas de cría infestadas artificialmente se colocaron nuevamente en la colonia. Once días después de la infestación artificial, las celdas infestadas se abrieron cuidadosamente con un bisturí y se recogieron las hembras fundadoras y sus hijas sexualmente maduras (Figura 45). Las hembras hijas (F1) y fundadora (P) fueron identificadas por su pigmentación (Rosenkranz et al., 2010). Una vez identificadas y separadas, se montó a las hembras F1 sobre abejas recién emergidas, que se colocaron en frascos de vidrio (3L) (Figura 45). Las abejas recién emergidas se obtuvieron de cuadros de cría de colonias con baja carga parasitaria. Cada frasco de vidrio se acondicionó con 30 abejas nodrizas y 10 hembras hijas de *V. destructor* (F1), y con agua y miel *ad libitum*. Los frascos se colocaron en una cámara con condiciones controladas de temperatura y humedad (35 °C y 60%, respectivamente) en oscuridad durante 4 días. Este período se describió previamente como el tiempo necesario para la maduración de los espermatozoides dentro de la espermateca de las hembras de *V. destructor*, y simuló una fase forética (Häußermann et al., 2016; 2019). Luego, se recuperaron las hembras F1 (ácaros del primer ciclo) del cuerpo de las abejas utilizando la técnica del azúcar impalpable. Estos ácaros se usaron para infestar celdas de cría recién operculada de las colonias con baja carga. Cuatro días después, las celdas infestadas que contenían

prepupas se abrieron para observar la presencia/ausencia de huevos de *V. destructor*. De estos ácaros de primer ciclo se establecieron dos grupos: hembras reproductivas (R, hembras que pusieron un huevo dentro de la celda de cría) y hembras no reproductivas (NR, hembras sin huevos en la celda de cría) (Figura 45).

Los ácaros que continuaron sobre las abejas nodrizas formaron un tercer grupo, llamado forético (F). Este grupo estuvo constituido por hembras que permanecieron sobre las abejas nodrizas durante cuatro días y no volvieron a infestarse en las celdas de cría (Figura 45). Los ácaros de los tres grupos o estados reproductivos (R, NR y F) presentaron la misma edad y estaban en su primer ciclo de vida.

Se obtuvo un total de 40-100 ácaros de cada uno de los tres grupos (R, NR, F). Los mismos se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y se almacenaron a -80 °C. Se prepararon tres muestras (réplicas biológicas) por grupo para el análisis transcriptómico. Cada muestra consistió en un *pool* de 5 ácaros.

### **3.2.3. RNAseq, análisis del transcriptoma y elección de genes candidatos**

#### **3.2.3.1. Extracción de RNA**

El ARN total se aisló de grupos (*pooles*) de cinco ácaros. Brevemente, cada muestra de cinco ácaros se homogeneizó en 300 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 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 150 µL de cloroformo. Las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y luego se dejaron 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 de cada tubo. Este último paso se realizó dos veces para mejorar el lavado. Finalmente, se retiró el etanol y se dejaron secar las muestras en flujo laminar. Una vez secas, las muestras 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 RNA 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 -80 °C.

La construcción de las bibliotecas y la secuenciación de alto rendimiento fueron realizadas por Novogene Corporation Inc. (Sacramento, EE. UU.). Se construyó un total de nueve bibliotecas, incluidas tres réplicas biológicas para cada estado reproductivo (R, NR, F), utilizando el kit de preparación de bibliotecas de ARN NEB Next® Ultra™ (New England Biolabs) con una longitud de inserción de 250 a 300 pares de bases (pb). Las bibliotecas se secuenciaron con un equipo Illumina HiSeq 4000 (150 pb *paired-end*) con una profundidad de secuenciación de al menos 20 millones de lecturas *paired-end* por biblioteca. Las secuencias sin procesar están disponibles en la base de datos NCBI BioProject con el número de acceso PRJNA674908.

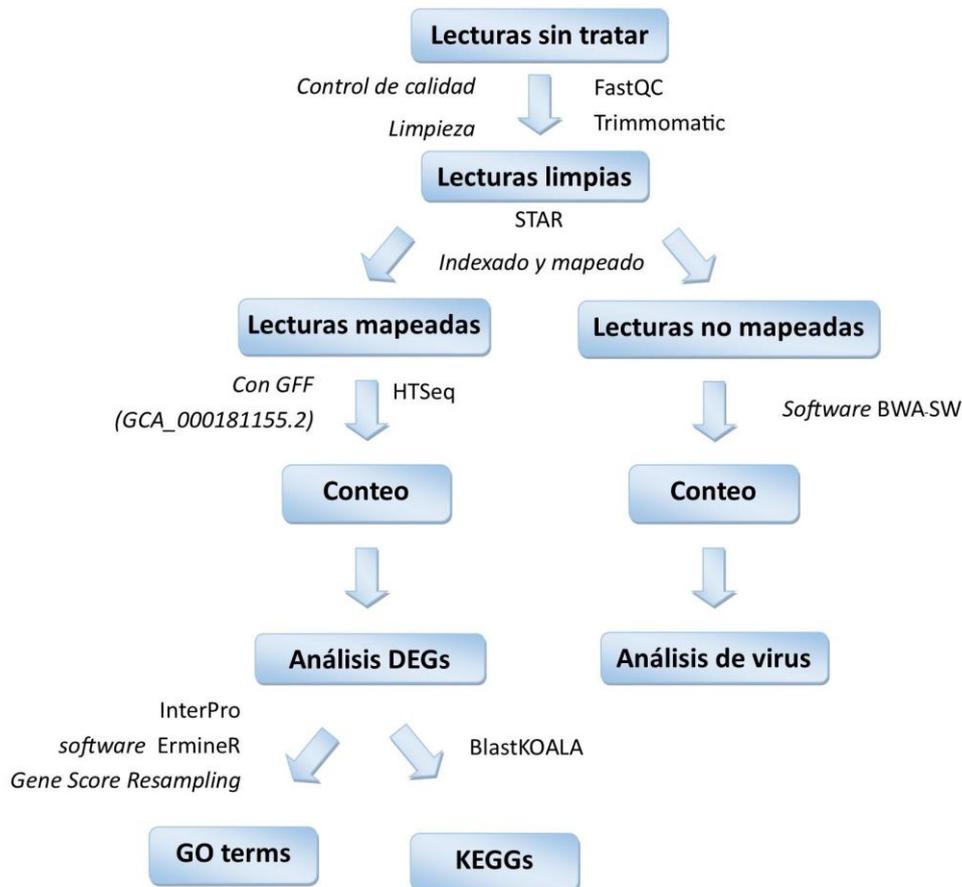
### **3.2.3.2. Análisis del transcriptoma**

El desarrollo de análisis de transcriptoma de *V. destructor* se realizó en colaboración y bajo la supervisión del Dr. José Manuel Latorre Estivales (FCEN, UBA).

En los siguientes párrafos se describe en detalle el flujo de trabajo realizado para el análisis de las 9 bibliotecas obtenidas (ver resumen en Figura 46).

#### **3.2.3.2.1. Control de calidad, filtrado y recorte**

Se utilizó la herramienta FASTQC (disponible en [www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc)) para evaluar la calidad de las lecturas obtenidas y detectar la presencia de adaptadores Illumina (Figura 46). Los adaptadores y las bases de los extremos 5' y 3' con puntuaciones de calidad de Phred inferiores a 5 se eliminaron de las lecturas mediante el uso de Trimmomatic v0.32 (Bolger et al., 2014) (Figura 46). El parámetro SLIDING-WINDOW se estableció en 4:15 y solo se conservaron las lecturas de más de 50 pares de bases (parámetro MINLEN = 50). El software se configuró para datos *paired-end*.



**Figura 46.** Flujo de trabajo realizado para el análisis del transcriptoma de *V. destructor*.

### 3.2.3.2.2. Mapeo de lecturas

El ensamblaje del genoma de *V. destructor* (versión Vdes\_3.0 con número de acceso GCA\_000181155.2) y su correspondiente archivo de características generales (GFF), ambos disponibles en la base de datos del NCBI, se indexaron mediante STAR v.2.6.0 (Dobin et al., 2013). Luego, las lecturas generadas por Trimmomatic en el paso anterior se mapearon utilizando STAR con parámetros de mapeo predeterminados (Figura 46; Tabla Suplementaria 13).

### 3.2.3.2.3. Análisis de la expresión génica

#### 3.2.3.2.3.1. Expresión diferencial de genes

Se utilizó el paquete EdgeR (v3.6.8) para identificar los genes diferencialmente expresados (GDE) (Figura 46). En primer lugar, los valores de recuento de lecturas se normalizaron por medio del método *Trimmed Mean of M-values* (TMM) (Tabla Suplementaria 14). Estos valores de TMM se consideran cuentas por millón (CMP) según el manual de edgeR (Robinson et al., 2010; McCarthy et al., 2012). Se

realizó un análisis exploratorio de las muestras de los tres grupos de ácaros (R, NR, F) utilizando una matriz log<sub>2</sub> CPM para calcular las disimilitudes de Bray-Curtis entre muestras (con el paquete mctoolsR v0.1.1.2 en R) y para crear un gráfico PCoA (con el comando betadispcers del paquete vegan v2.5-7 de R). El efecto de la variable "tratamiento" (grupos de ácaros) se midió mediante un análisis de PERMANOVA utilizando 99999 permutaciones (con el comando adonis2 del paquete vegan v2.5-7 de R).

Posteriormente, se utilizó el paquete HTSFilter (Rau et al., 2013) para filtrar y eliminar los genes poco expresados y/o de expresión muy variables (Tabla Suplementaria 15). Los GDE se identificaron utilizando la prueba F de cuasi-verosimilitud bajo un enfoque GLM. Inicialmente, se realizó un análisis de expresión general para identificar aquellos genes que se expresan diferencialmente entre cualquier grupo utilizando un *False Discovery Rate* (FDR) < 0,05. Luego, se realizaron comparaciones pareadas entre los grupos. Para las comparaciones R vs. F y NR vs. F, los GDE se identificaron utilizando un umbral de *fold-change* (FC) > 2 (equivalente a log<sub>2</sub>FC > 1) y un valor FDR < 0,05. En el caso de la comparación R vs. NR, no se estableció un umbral de FC y el FDR se fijó en 0,1, ya que esperábamos ligeros cambios en la expresión génica considerando que ambos grupos de ácaros pertenecen a la fase reproductiva. Se elaboraron gráficos de diferencia de medias (MD) para cada comparación con el objetivo de visualizar los patrones de expresión.

### **3.2.3.2.3.2. Comparación de ácaros reproductivos y no reproductivos**

Se realizó un análisis detallado de los GDE identificados en la comparación de ácaros reproductivos (R) y no reproductivos (NR) con el objetivo de explorar los genes y vías moleculares asociados al éxito reproductivo de *V. destructor*. Primero, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre especies cercanas a esta especie para validar y complementar la anotación de estos genes. En segundo lugar, se realizaron búsquedas BLAST para identificar genes que no tuvieran anotación o función asignada en el genoma de referencia de *V. destructor*. En tercer lugar, realizamos un *heatmap* de los GDE utilizando el paquete pheatmap R (v1.0.12) (Kolde & Vilo, 2015) en RStudio para visualizar los cambios de expresión entre ambas condiciones (R vs. NR). Finalmente, los términos *Gene Ontology* (GO) se obtuvieron utilizando InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) y los KEGGs usando la herramienta BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) de la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG). Las *KEGGs Orthologies* se obtuvieron analizando bases de datos KEGG específicas de *Tetranychus urticae*, *Ixodes scapularis*, *Apis mellifera* y *Drosophila melanogaster*.

La ubicación subcelular predicha de los ARN largos no codificantes (en inglés *lncRNA*) identificados como DEG entre los ácaros R y NR se obtuvo utilizando el IncLocator, un software disponible en línea para la predicción de la ubicación de *lncRNA* basado en un clasificador de conjunto (Cao et al., 2018).

LncLocator puede predecir cinco localizaciones subcelulares de *lncRNA*, que incluyen el núcleo, el citoplasma (parte del citoplasma excepto el citosol, el ribosoma y el exosoma), el ribosoma, el citosol y el exosoma. Los genes codificantes 100 kb río arriba y río abajo de los *lncRNA* se clasificaron como posibles genes diana en *cis* (Guil & Esteller, 2012; Feng et al., 2019). Estos genes se identificaron y sometieron a análisis de sus funciones GO y *KEGGs Orthologies*, como se describió anteriormente.

#### **3.2.3.2.4. Análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology***

Se descargó el conjunto de datos con las proteínas predichas del ensamblaje Vdes\_3.0 disponible en NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=varroa+destructor](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=varroa+destructor)) y los términos GO se obtuvieron localmente usando InterProScan 5 (Jones et al., 2014) (Figura 46).

El análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO) se llevó a cabo con el *software* ermineR en RStudio usando el método *Gene Score Resampling* (GSR) con los valores logFC absolutos para todos los genes de cada comparación pareada como entrada. Estos valores se utilizaron como una variable continua produciendo un rango de puntajes con el que se pudo determinar qué términos GO estaban enriquecidos (Lee et al., 2005; Gillis et al., 2010; Ballouz et al., 2016). Más información sobre este método está disponible en <https://erminej.msl.ubc.ca/help/tutorials/running-an-analysis-resampling/>. Posteriormente, los términos GO enriquecidos obtenidos de cada comparación por el método GSR se buscaron utilizando QuickGO ([www.ebi.ac.uk/QuickGO/slimming](http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/slimming)).

#### **3.2.3.2.5. Identificación de transcritos virales**

Las lecturas que no se mapearon contra el genoma de *V. destructor* se usaron para construir nueve bases de datos. Las mismas se examinaron para identificar coincidencias con 30 virus ARN descritos en *A. mellifera* y potencialmente asociados con *V. destructor* (Tabla Suplementaria 16). El mapeo de las lecturas virales se realizó como se describió anteriormente en la sección "3.2.3.2.2. Mapeo de lectura". Las secuencias de los genomas virales disponibles (parciales o completas) de las bases de datos del NCBI se indexaron utilizando STAR v.2.6.0 (Dobin et al., 2013). Luego, las "lecturas no mapeadas" se mapearon utilizando STAR con parámetros de mapeo predeterminados. Sobre todos los virus detectados, se calculó el porcentaje total de recuentos mapeados por biblioteca y se comparó este porcentaje entre las condiciones analizadas (R, NR y F) ("Análisis de virus total"). Luego, se realizaron dos análisis adicionales. Primero, los recuentos de cada virus para las tres condiciones se tomaron como nueve réplicas y se comparó la abundancia relativa de cada virus en la población de ácaros ("Análisis de abundancia viral"). En segundo lugar, se compararon los recuentos de cada virus entre las tres condiciones (R, NR y F) para evaluar si había una asociación entre la condición de las hembras de *V. destructor* y la abundancia de virus específicos ("Análisis de condiciones"). Los datos de "virus total" y "condición" se analizaron utilizando un modelo lineal general (GLM) con una

distribución binomial y una función de enlace logit (mapeado vs. no mapeado y virus vs. no virus, respectivamente) considerando la condición como un factor fijo. De manera similar, los datos de "abundancia viral" se analizaron utilizando GLM con una distribución binomial y una función de enlace logit (virus vs. no virus) considerando los virus detectados como un factor fijo. Se realizaron múltiples comparaciones utilizando Fisher LSD ( $\alpha = 0,05$ ). En todos los casos se ensayó y analizó la dispersión de los residuos. Para obtener la estructura de varianza más adecuada se utilizó el criterio de información de Akaike. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando la función `glmer` en el paquete R 'lme4' (Bates et al., 2015).

### **3.2.3.3. Validación de la expresión por medio de PCR cuantitativa**

Para validar los resultados de *RNA-Seq*, se realizó la cuantificación de la expresión de ocho GDE y dos genes de referencia mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (Tabla 8). La selección de estos genes se basó en su expresión diferencial entre los estados considerados (particularmente R vs. NR) y en sus funciones predichas (asociadas a la reproducción y procesos fisiológicos) según búsquedas de BLAST. Además, se analizó la expresión de otros tres genes candidatos asociados con la reproducción de *V. destructor* en estudios previos: *vitelogenin 1 (vg1)*, *ribosomal protein L11 (RpL11)* y *large lipid transfer protein (LLTP)* (Cabrera et al., 2013 a;b; Huang et al., 2017) (Tabla 8).

El nivel de expresión de cada transcripto se analizó en cuatro réplicas biológicas por condición (R, NR y F), que se generaron independientemente de las utilizadas para el experimento *RNA-Seq*. Las muestras de ARN se obtuvieron como se describe anteriormente en la sección 3.2.3.1. Se usó aproximadamente 1  $\mu$ g de ARN total como molde para sintetizar ADNc usando la enzima ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega) y cebadores aleatorios (*random primers*, Promega), siguiendo el protocolo del fabricante. Los cebadores específicos para la amplificación por qPCR de los genes seleccionados 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>).

**Tabla 8.** Características de los genes candidatos y de referencia usados para la validación por qPCR de los resultados obtenidos por *RNA-Seq*.

Nombre del gen	N° de Acceso	Secuencia del cebador 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Ta(°C)	Ef. qPCR
<i>protein patched homolog 1-like</i>	LOC111252634	AATGATGAGGCTGGTGGGTG	94	60	1,693
		TACCGCCGACAGGAAGTAGA			
<i>transcription factor AP-1-like</i>	LOC111243751	TCGCTGAATTTGAGCGTCT	78	60	1,648
		CGAGATGACCCCTAAGGCAC			
<i>la-related protein 6-like</i>	LOC111245737	TTACCTCATTGACAGCCCC	88	60	1,86
		GAAAAGCTGATCCCCCTCCC			
<i>vitellogenin-6-like</i>	LOC111244790	GACGGTCATAGACGACGAGT	106	60	1,89
		AGCCATCTTGCGGATTAGGG			
<i>purine nucleoside phosphorylase-like</i>	LOC111244127	TGGAGGTTGGTCTGGTAGT	148	60	1,834
		GCCACGATTACCTCGTGACT			
<i>troponin T-like</i>	LOC111247563	CGTATCGTCTCGTGGAGTC	102	60	1,935
		GTTGATCTGCCTCTGACGCT			
<i>endochitinase-like</i>	LOC111255436	AAAGAAGGCTACGGTGGAGC	189	60	1,855
		GGTCAGGGAGCCAGAGTAGA			
<i>pupal cuticle protein G1A-like</i>	LOC111247947	GTATTTGCTGCTGGCTGC	130	60	1,885
		GACTGTGGGACCTCCATTG			
<i>nascent polypeptide-assoc. complex subunit <math>\alpha</math>, muscle-sp form-like</i>	LOC111254322	TGGACGACAGTGAACGCATTA	121	60	1,819
		GAGTGGCTAAAAGCTGCTCG			
<i>vitellogenin 1</i>	LOC111249970	CATTGTTGCCGCACACACCGT	175	61	1,91
		AATGCCAGCGCTCTACCT			
<i>proteína ribosomal L11</i>	LOC111250605	CACTTATGTGCGGAATCGTTATAG	151	55	1,827
		TCTAACCAATAAGTGCCTATGAAC			
<i>large lipid transfer protein</i>	LOC111244791	ACGTCGACTATTCAGGACGC	183	60	1,849
		AAAAGCATCCGGCTCAAGGA			
<i>heat shock protein 83-like (90)</i>	LOC111244541	TTTGTAAACGACACGAGCTG	117	58,4	1,577
		TGTTGAGCGTGTGAAGAAGC			
<i>Large ribosomal sub-unit</i>	LOC111245786	ACGTATTCCATTCCGGCTTCC	106	58,4	1,851
		GAGTCCGGCGAGGTATGAGT			
<i>40S ribosomal protein (S18)</i>	LOC111253957	AGCTGTCCGAACAGGAAGTG	186	60	1,902
		GGGCACGGATCTTTTTCAGC			

Los cebadores usados para la amplificación del gen que codifica la *ribosomal protein* L11 fueron obtenidos a partir de Huang et al. (2017). Los cebadores usados para la amplificación de los transcritos correspondientes a los genes *heat shock protein 83-like* y *LRSU* fueron obtenidos a partir de Campbell et al. (2016). Genes de referencia: *LRSU* y *Rps*. Ta: temperatura de *annealing*. Ef. qPCR: Eficiencia del amplicón.

Los ensayos de qPCR se realizaron en un LightCycler 96 (Roche), utilizando el cDNA como templado. Cada reacción se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ L, que contenía 5  $\mu$ L de Fast Start Essential DNA Green Master (Roche), 0,25  $\mu$ L (50 mM) de cada cebador *forward* y *reverse*, 4  $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O y 0,5  $\mu$ L 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 de la curva de *melting*. Todas las qPCR se realizaron por triplicado (es decir, tres réplicas técnicas).

La expresión de los genes *LRSU* y *Rps* se utilizaron para normalizar la expresión de los genes candidatos (Tabla 8). Estos genes se describieron previamente como genes de expresión estables en *V. destructor*

(Campbell et al., 2016). De todas maneras, la estabilidad y la idoneidad de dichos genes de referencia 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 (Cq) 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 de ácaros con la prueba de Kruskal-Wallis. Se realizaron pruebas de Dunn para las comparaciones múltiples *a posteriori*. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando la función emmeans en el paquete R 'emmeans' (Lenth, 2020).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Transcriptoma de *Varroa destructor*

##### 3.3.1.1. Mapeo y procesamiento de lecturas

Se recuperaron un total de 202.880.980 lecturas *paired-end* para el experimento completo con un promedio de 22.5 M de lecturas crudas por biblioteca. En promedio, se eliminó menos del 9 % de las lecturas después de los procesos de filtrado y recorte, lo que produjo entre 18.9 y 24.6 M de lecturas limpias por biblioteca (Tabla 9 y Tabla Suplementaria 13). Un promedio de 17.6 millones de lecturas por biblioteca (83.3 %) se asignaron de forma única al genoma de *V. destructor* (Tabla 9). Los resultados del análisis del mapeo mostraron que un total de 12,375 de los 12,854 genes descritos para *V. destructor* (96 %) presentaron al menos un recuento en alguna biblioteca (Tabla suplementaria 13).

**Tabla 9.** Número y porcentajes de lecturas (*reads*) obtenidas, trimadas y mapeadas correspondientes a cada una de las 9 bibliotecas de *V. destructor* obtenidas. Se muestran los valores para los tres grupos de ácaros (R, NR y F) y se identifican con números (1-3) las réplicas dentro de cada grupo.

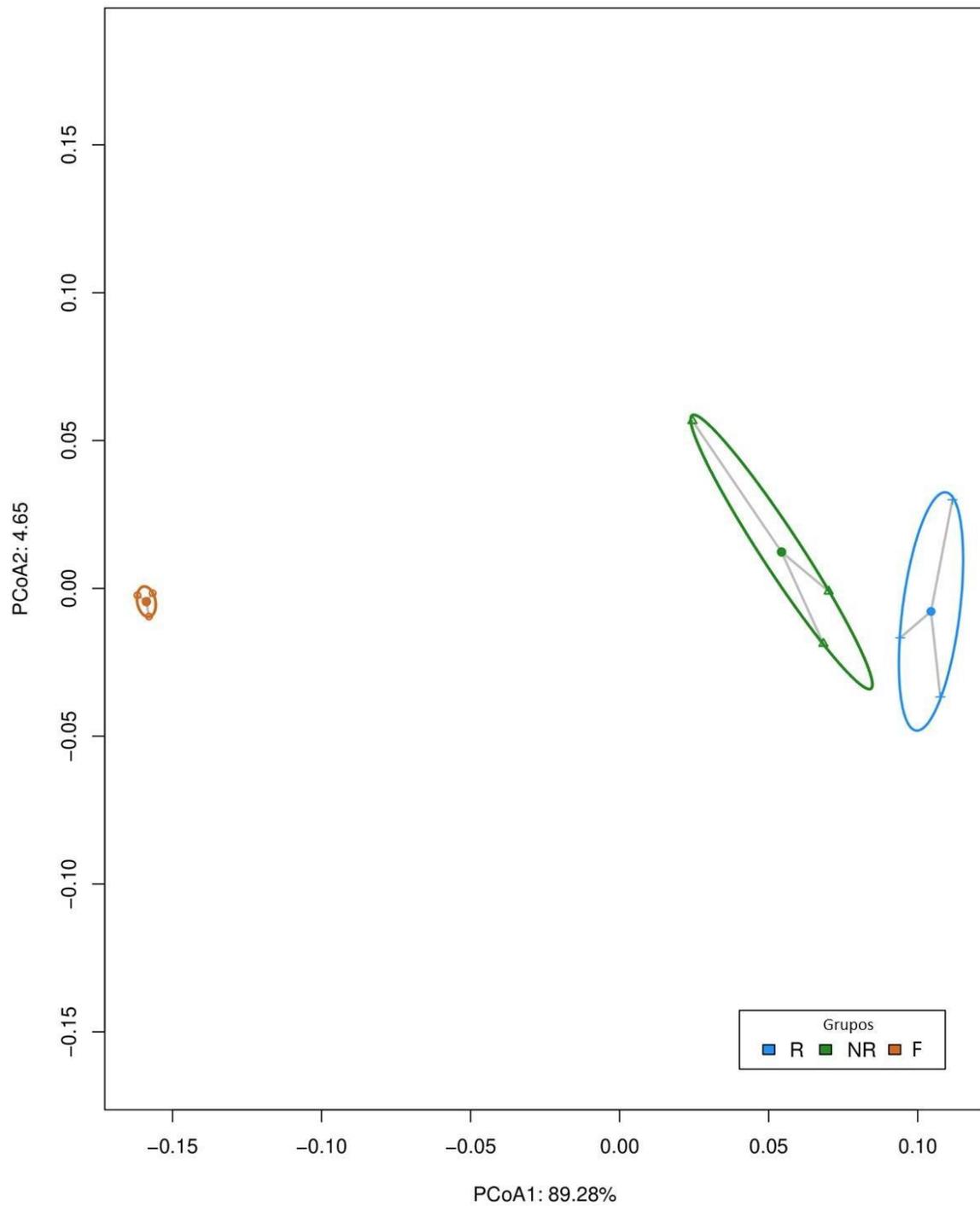
Biblioteca	Número de lecturas sin procesar	Número de lecturas trimadas	Lecturas trimadas (%)	Número de lecturas mapeadas de forma única	Lecturas mapeadas de forma única (%)
R1	23.210.418	22.190.274	95,60	13.757.238	62,00
R2	22.170.870	21.291.930	96,04	15.658.480	73,54
R3	22.132.818	20.604.144	93,09	18.841.085	91,44
NR1	21.744.924	19.974.774	91,86	14.245.994	71,32
NR2	22.483.312	21.567.652	95,93	19.514.067	90,48
NR3	22.130.582	20.699.892	93,54	19.111.669	92,33
F1	26.797.221	24.602.535	91,81	21.568.209	87,67
F2	21.845.020	20.094.636	91,99	18.282.548	90,98
F3	20.365.815	18.907.150	92,84	17.126.251	90,58
Promedio	22.542.331	21.103.665	93,63	17.567.282	83,37

##### 3.3.2.2. Análisis global

Las muestras de *RNA-Seq* se compararon mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA). Los dos primeros componentes del PCoA mostrados en la Figura 47 explican el 93,93% de la variación total entre tratamientos (grupos de ácaros) (el componente 1 explica el 89,28% y el componente 2 explica el 4,65% de la variación). Los tres grupos de ácaros se ubican separados a lo largo del eje 1 (PCoA1) y las muestras de cada tratamiento se visualizan agrupadas dentro de la elipse que representa la

desviación estándar dado un nivel de confianza del 95% (Figura 47). El grupo de los ácaros foréticos (F) fue el más homogéneo, mientras que los grupos R y NR mostraron una mayor variación entre réplicas. Las muestras de los tres grupos presentaron perfiles de expresión con disimilitudes que, según el análisis PERMANOVA, están significativamente explicadas por el factor tratamiento (PERMANOVA,  $R^2 = 0,89806$ ;  $F = 26,428$ ; valor P corregido 0,00375).

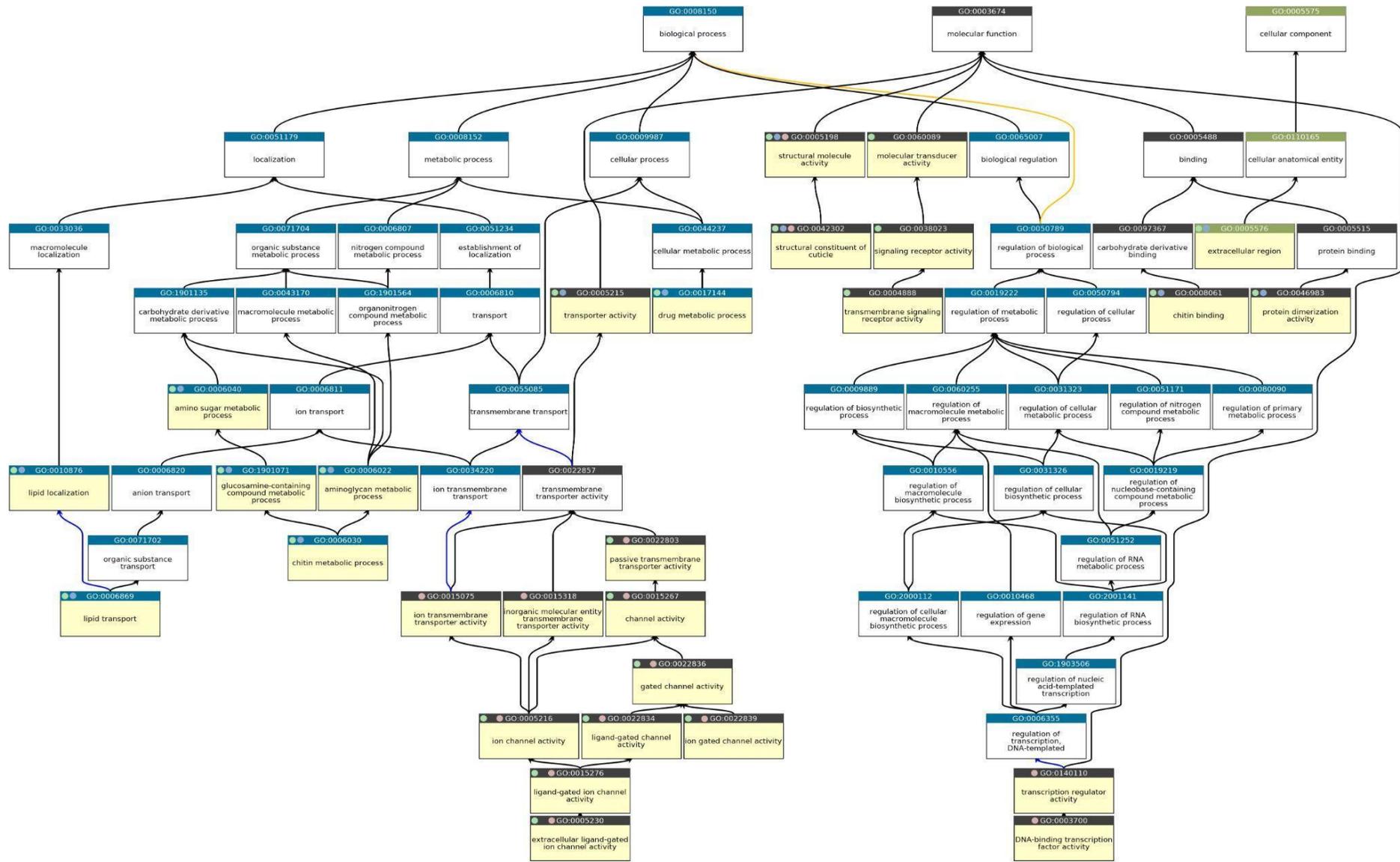
Luego de filtrar los transcritos de baja y/o muy variable expresión entre las bibliotecas, se obtuvo un subconjunto de 10.390 genes que se utilizó para los análisis posteriores (Tabla Suplementaria 15).



**Figura 47.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) realizado sobre el perfil de abundancia de transcriptos. R: ácaros reproductivos; NR: ácaros no reproductivos; y F: ácaros foréticos.

### **3.3.2.3. Análisis de enriquecimiento *Gene Ontology***

Luego del filtrado arriba mencionado, se obtuvieron los valores de *fold-change* (FC) de los 10.390 genes para las siguientes comparaciones pareadas: R vs. F, NR vs. F y R vs. NR, (Tablas Suplementarias 17, 18 y 19, respectivamente); y se utilizaron estos datos para el análisis de enriquecimiento GO. Un total de 11 términos *Gene Ontology* (GO) que incluyen la localización de lípidos (incluido el transporte de lípidos), el proceso metabólico derivado de carbohidratos (incluidos los procesos metabólicos de aminoglicanos, de aminoazúcares y de compuestos que contienen glucosamina, y el proceso metabólico de quitina) y procesos de unión (incluidos unión de quitina y actividad de dimerización de proteínas) se detectaron enriquecidos (valor p corregido <0.05) en las comparaciones R vs. F. Estos términos GO también se evidenciaron como enriquecidos cuando se compararon los grupos NR vs. F (Figura 48; Tabla Suplementaria 20 y 21).



**Figura 48.** Términos GO enriquecidos en las comparaciones pareadas entre los grupos de ácaros. Comparaciones R vs. F (puntos verdes claros), NR vs. F (puntos azules claros), y R vs. NR (puntos rosas). Los recuadros del gráfico representan los ID y definiciones de los términos GO. El color de la cabecera de cada caja indica la clase del término GO: proceso biológico (azul), función molecular (negro) y componente celular (verde). El color amarillo de fondo de las cajas indica los términos GO significativos ( $P < 0,05$ ). Las flechas indican relaciones entre dos términos GO específicos: las flechas negras indican "es un", las azules indican "parte de" y las amarillas indican "regula".

La comparación R vs. F mostró un total de 25 términos GO significativamente enriquecidos, siete pertenecen a "proceso biológico", 17 a "función molecular" y uno a "componente celular" (Figura 48, Tabla Suplementaria 20). Específicamente, la actividad de transducción de señales (incluidas la actividad de receptor de señalización y la de señalización transmembrana) se vio alterada sólo en esta comparación. La comparación NR vs. F mostró un total de 13 términos GO enriquecidos, de los cuales siete pertenecen a "proceso biológico", cinco a "función molecular" y uno a "componente celular", principalmente asignados al proceso metabólico de aminoglicanos, transporte de lípidos, unión a quitina, proceso metabólico de aminoazúcares y localización de lípidos (Figura 48, Tabla Suplementaria 21).

Se obtuvieron un total de 15 términos GO significativamente enriquecidos para la comparación de R vs. NR. Estos términos GO se dividieron en tres grupos según su función molecular: actividad reguladora de la transcripción (incluida la actividad de factor de transcripción de unión al ADN), actividad de transportador transmembrana, y actividad molecular estructural (incluido el constituyente estructural de la cutícula). Específicamente este último grupo de GO se enriqueció de manera diferente entre todas las comparaciones (Figura 48, Tabla Suplementaria 22).

### 3.3.2.4. Análisis de la expresión génica

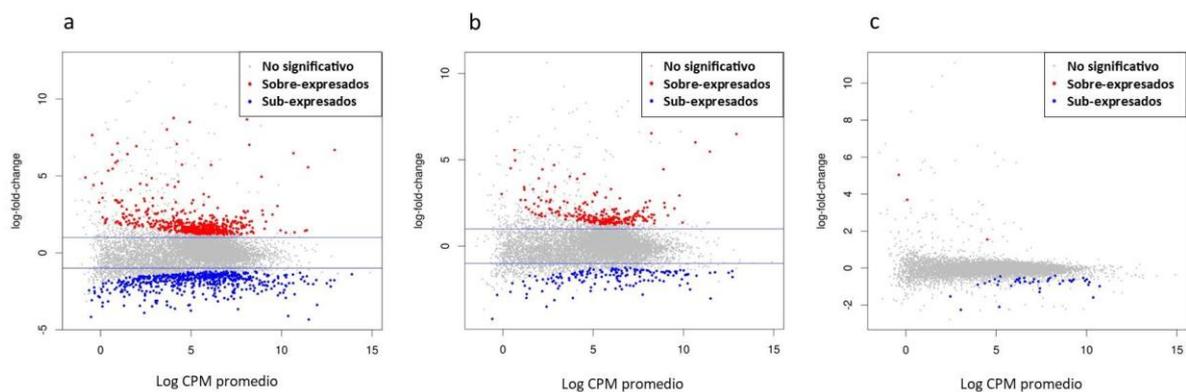
#### 3.3.2.4.1. Fase reproductiva vs. fase forética

De acuerdo los resultados del análisis global (FDR <0,05), se detectaron un total de 6246 (60,1 %) genes diferencialmente expresados (GDE) en al menos una de las tres comparaciones pareadas (Tabla 10; Tabla Suplementaria 23). Un segundo análisis más estricto (FDR <0,05 y FC >2) detectó un total de 1.577 GDE para las tres comparaciones pareadas (Tabla 10; Tabla Suplementaria 23).

**Tabla 10.** Número de genes diferencialmente expresados (GDE) en el análisis global y para las comparaciones pareadas entre grupos de ácaros (R: reproductivos, NR: no reproductivos, F: foréticos). Se muestran el total de genes sub y sobre-expresados en cada caso y los parámetros utilizados en los análisis (FDR: *False Discovery rate correction*, FC: *Fold-change*).

Análisis/Comparaciones	Parámetros	N° GDE	Sobre-expresados	Sub-expresados
Global	FDR < 0,05	6.246	-	-
NR vs. F	FDR < 0,05, FC > 2	416	256	160
R vs. F	FDR < 0,05, FC > 2	1.116	548	568
R vs. NR	FDR < 0,1	45	3	42

Los mayores cambios transcripcionales se produjeron entre los grupos de ácaros reproductivos (R) y foréticos (F), ya que se identificaron un total de 1.116 GDE para dicha comparación. De estos genes, 548 se detectaron sobre-expresados y 568 sub-expresados (Tabla 10; Figura 49a; Tabla Suplementaria 17). La comparación de ácaros NR y F mostró 416 GDE, 256 sobre-expresados 160 sub-expresados (Tabla 10; Figura 49b; Tabla Suplementaria 18). Entre los DEGs para ambas comparaciones, se encontraron dos genes relacionados con los genes de Halloween. Específicamente, el gen del receptor de ecdisona (EcR) se encontró sobre-expresado en el grupo de ácaros R en comparación con el grupo F, y el gen *disembodied* (CYP302a1) se encontró sobre-expresado en la fase reproductiva (R/NR) respecto a la fase forética (F) (Tabla Suplementaria 19).

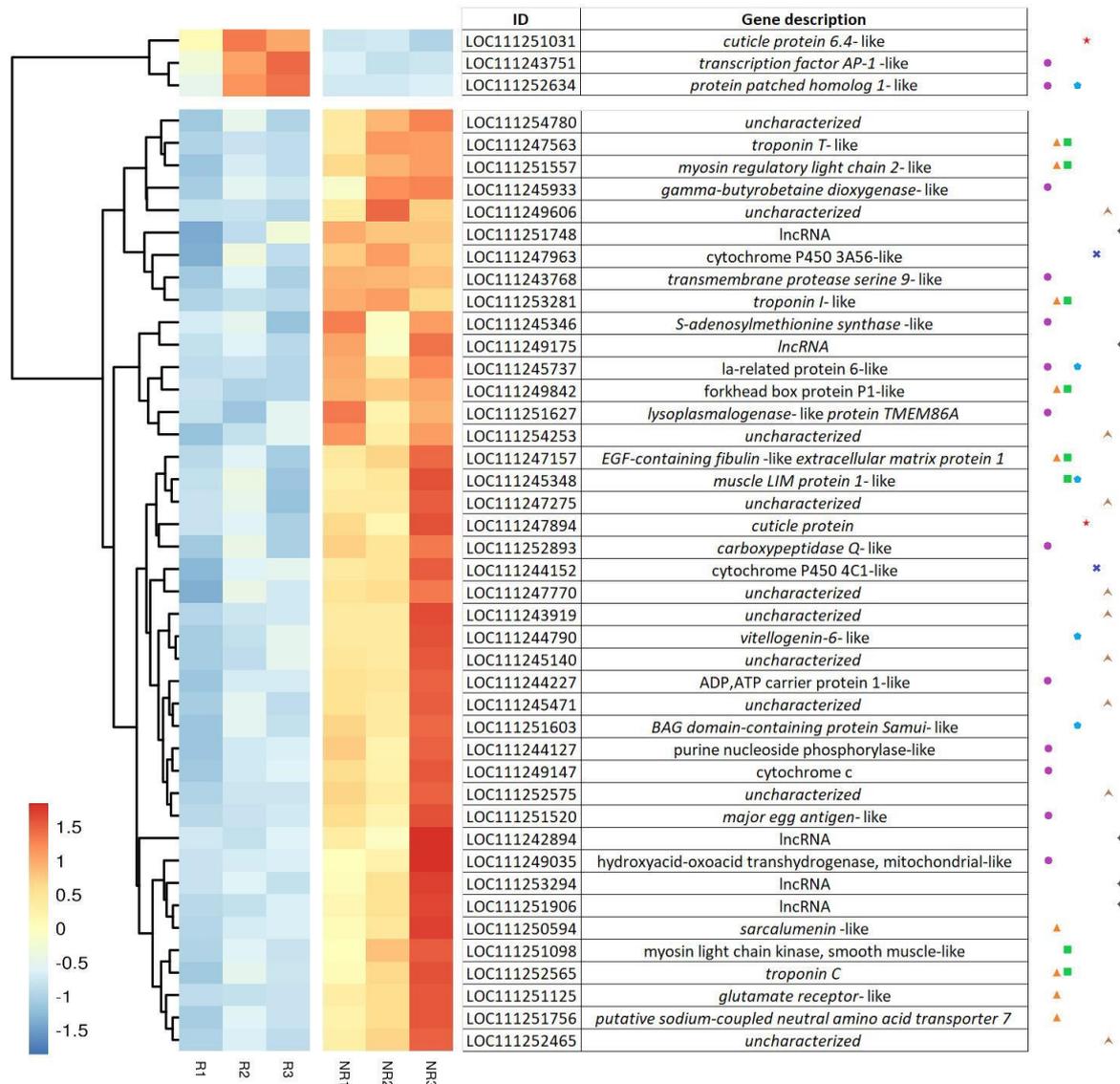


**Figura 49.** Patrones de expresión génica para cada comparación pareada, considerando los grupos de ácaros analizados: R (reproductivos), NR (no reproductivos), F (foréticos). Se grafica Log (FC; *fold-change*) en función de los valores medios del log (CPM; cuentas por millón). Se muestran las comparaciones: R vs. F (a); NR vs. F (b); y R vs. NR (c). Los genes que están significativamente sobre-expresados o sub-expresados se muestran en rojo y azul, respectivamente. Los genes que no se expresaron diferencialmente entre los grupos de ácaros se muestran en gris.

### 3.3.2.4.2. Comparación entre ácaros reproductivos y no reproductivos

Se detectaron un total de 45 GDE entre los grupos de ácaros R y NR, 42 genes se mostraron sub-expresados y tres sobre-expresados en R en comparación con NR (Figura 49c y 50; Tablas Suplementarias 19; 24). Los GDE identificados para dicha comparación se asignaron a siete categorías funcionales principales de acuerdo con estudios publicados previamente en artrópodos: 13 genes asociados con la regulación y replicación celular, nueve genes relacionados con los sistemas nervioso y muscular, cinco genes asociados con la maduración y embriogénesis, dos genes vinculados al metabolismo de la cutícula, dos genes involucrados en el metabolismo hormonal, cinco lncRNAs y nueve genes no caracterizados (Figura 50). Entre estos GDE no caracterizados, sólo se identificaron

dos transcritos a través de búsquedas BLAST: LOC111247894 (*hypothetical early protein cuticle protein 16.8-like*) y LOC111251125 (*hypothetical glutamate receptor*).



**Figura 50.** Mapa de calor (*heatmap*) de los genes diferencialmente expresados para la comparación R vs. NR. Se muestra una escala de colores, en la que el azul representa el nivel de expresión más bajo y el rojo, el más alto. Los genes se identifican por su ID de GenBank. Se presenta un dendrograma con agrupación jerárquica entre los genes. Las formas coloreadas de la derecha indican cada uno de los ocho grupos funcionales en los que se dividieron los GDE. Puntos violetas: regulación y replicación celular; triángulos naranjas: sistema nervioso y muscular; cuadrados verdes: movimiento muscular; pentágonos azul claro: maduración y embriogénesis; estrellas rojas: metabolismo de la cutícula; x azul: metabolismo hormonal; puntas de flecha marrones: genes no caracterizados; y rombos grises: *lncRNAs*.

Se obtuvieron los términos GO y los KEGGs asociadas a los GDE identificados en la comparación R vs. NR. Dos de los tres genes sobre-expresados en los ácaros R están asociados con vías de transducción de señales: el gen *protein patched homolog 1-like (ptch1)* (involucrado en la vía de señalización Hedgehog) y el gen *transcription factor AP-1-like (ap-1)* (asociado con las vías de señalización MAPK y Wnt) (Tablas Suplementarias 24 y 25). Ambos genes también se asociaron con la apoptosis, los factores de transcripción y las vías de señalización Toll e Imd (Tablas Suplementarias 24 y 25). El tercer gen que se sobre-expresó en el grupo de ácaros R corresponde al gen *cuticle protein 6.4-like*, asociado con el metabolismo de la cutícula (Figura 50; Tablas Suplementarias 24 y 25). La mayoría de los genes sub-expresados en el grupo de ácaros R está relacionados con procesos metabólicos generales, específicamente con el metabolismo de aminoácidos, de nucleótidos y cofactores y de vitaminas (Tablas Suplementarias 24 y 25).

Se identificaron cinco *lncRNA* diferencialmente expresados entre los ácaros R y NR (Figura 50), cuya localización predicha es el núcleo. Se detectaron 41 genes potencialmente *target* de estos *lncRNA* en regulación *cis* (Tabla Suplementaria 26). El análisis de las rutas KEGG indicó que estos genes *target* participan en 24 rutas metabólicas principales, tales como el procesamiento de información genética (incluido el plegamiento y la degradación, la traducción, la replicación y la reparación, y la transcripción) y los procesos metabólicos (metabolismo de cofactores y vitaminas, metabolismo energético, biosíntesis y metabolismo de glicanos y de lípidos) (Tabla Suplementaria 26). Entre estos genes, se detectó el gen *protein ovo-like*, con un papel predicho en la determinación del sexo de la línea germinal y la remodelación del citoesqueleto.

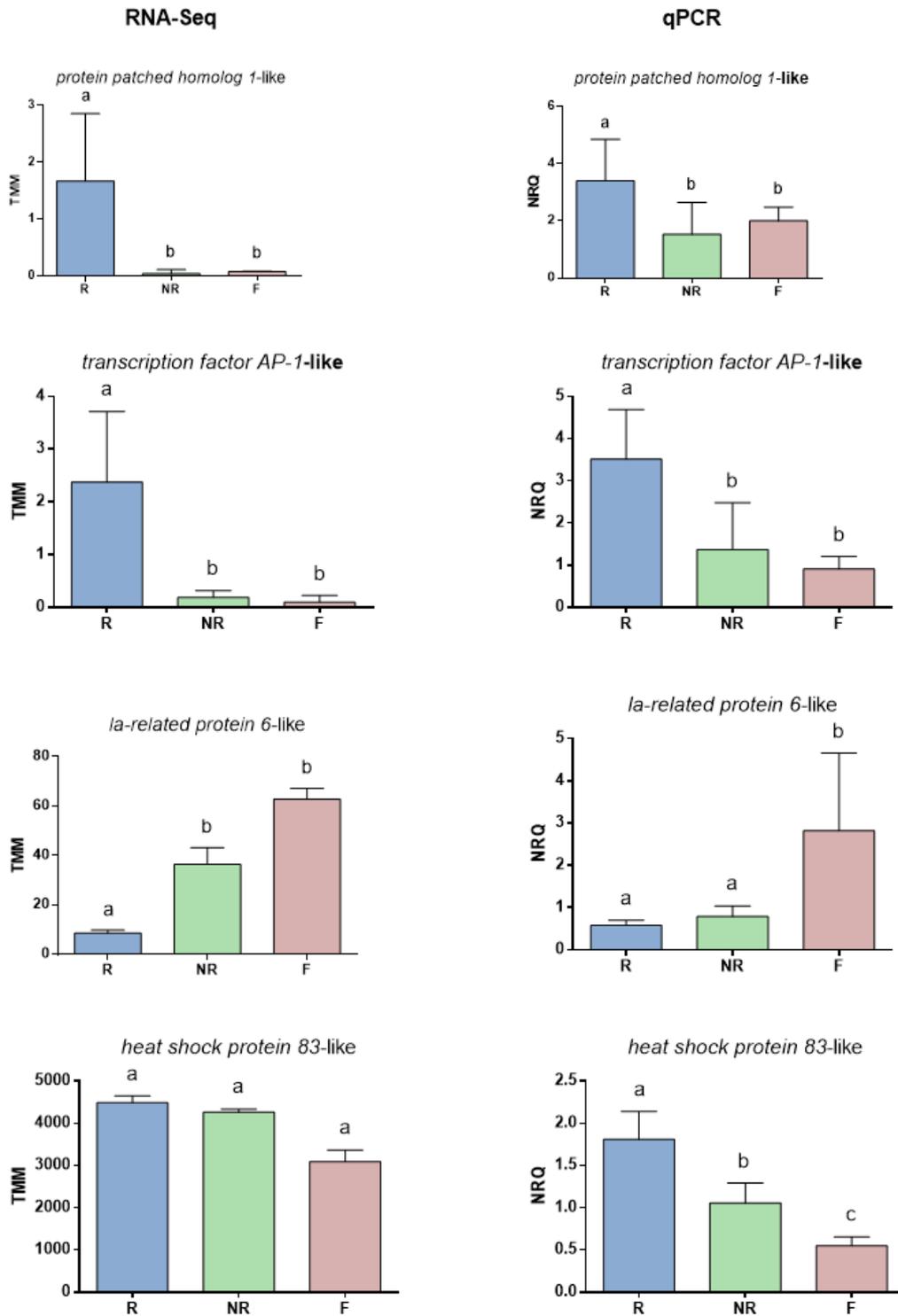
### 3.3.2.5. Validación de los resultados de *RNA-Seq*

Se seleccionó un conjunto de 13 transcriptos (Tabla 8) para validar los resultados de *RNA-Seq* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se obtuvo una correlación global significativa entre los conjuntos de datos de *RNA-Seq* y qPCR (correlación de Spearman;  $r=0,7384$ ;  $p=8,90E-5$ ). Cuando se consideraron las comparaciones pareadas entre los grupos de ácaros, también se obtuvieron correlaciones significativas entre los conjuntos de datos (correlación de Spearman;  $r=0,6923$ ,  $p=8,90E-5$  para N vs. NR;  $r=0,9140$ ,  $p=6,90E-11$  para R vs. F, y  $r=0,8462$ ,  $p=5,170E-8$  para NR vs. F).

Los resultados de qPCR mostraron una sobre-expresión significativa de los transcritos anotados como *ptch1* y *ap-1* en los ácaros R en comparación con los ácaros NR y F (Figura 51). El transcrito *vg6* evidenció una sobre-expresión significativa en el grupo de ácaros F y NR en comparación con el grupo R (Figura 51). En el caso del transcrito *hypothetical endochitinase-like (chisal)*, se evidenció una sobre-expresión significativa en F en comparación R (Figura 51). Además, los transcritos *la-related protein 6-*

like (*larp6*), *purine nucleoside phosphorylase-like (pnp)* y *large lipid transfer protein (lltp)* se mostraron significativamente sobre-expresados en el grupo F en comparación con NR y R (Figura 51). Se detectaron diferencias en la expresión génica de *troponin T-like (tnnt)* y *heat shock protein 83-like (hsp83)* entre todos los grupos de ácaros analizados. Específicamente, el gen *tnnt* se expresa mayormente en F, seguido de NR y R, mientras que *hsp83* mostró una mayor expresión en R, seguido de NR y F (Figura 51).

Los resultados de los genes *pupal cuticle protein G1A-like (cug1a)* y *vg1* evidenciaron una significativa sub-expresión en F en comparación con los ácaros R y NR (Figura 51). El transcrito *nascent polypeptide-associated complex subunit alpha (naca)* también se mostró sub-expresado en los ácaros F en comparación con los ácaros R. Finalmente, el transcrito correspondiente al gen *ribosomal protein L11 (rpl11)* no mostró diferencias de expresión para ninguna de las comparaciones pareadas (Figura 51).



**Figura 51.** Perfiles de expresión de los genes candidatos obtenidos por qPCR en los grupos de ácaros R, NR y F (derecha; NRQ son unidades de expresión relativa) y por RNA-Seq (izquierda; CPM son cuentas por millón). Las diferencias significativas entre grupos se muestran con letras diferentes. Los genes de referencia utilizados para la normalización de la expresión fueron *large ribosomal sub-unit* y *18S rRNA*.

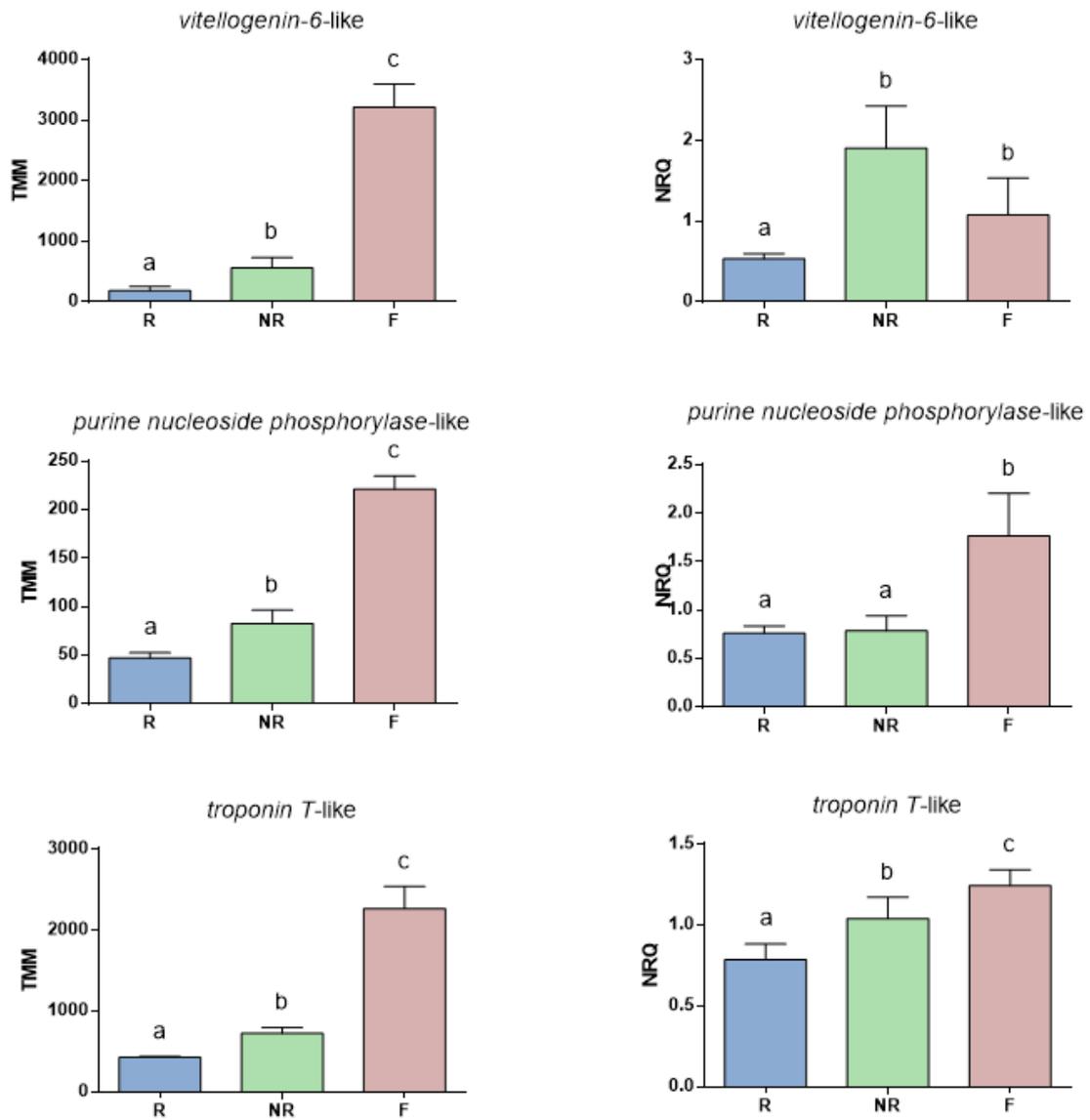


Figura 51. Continuación

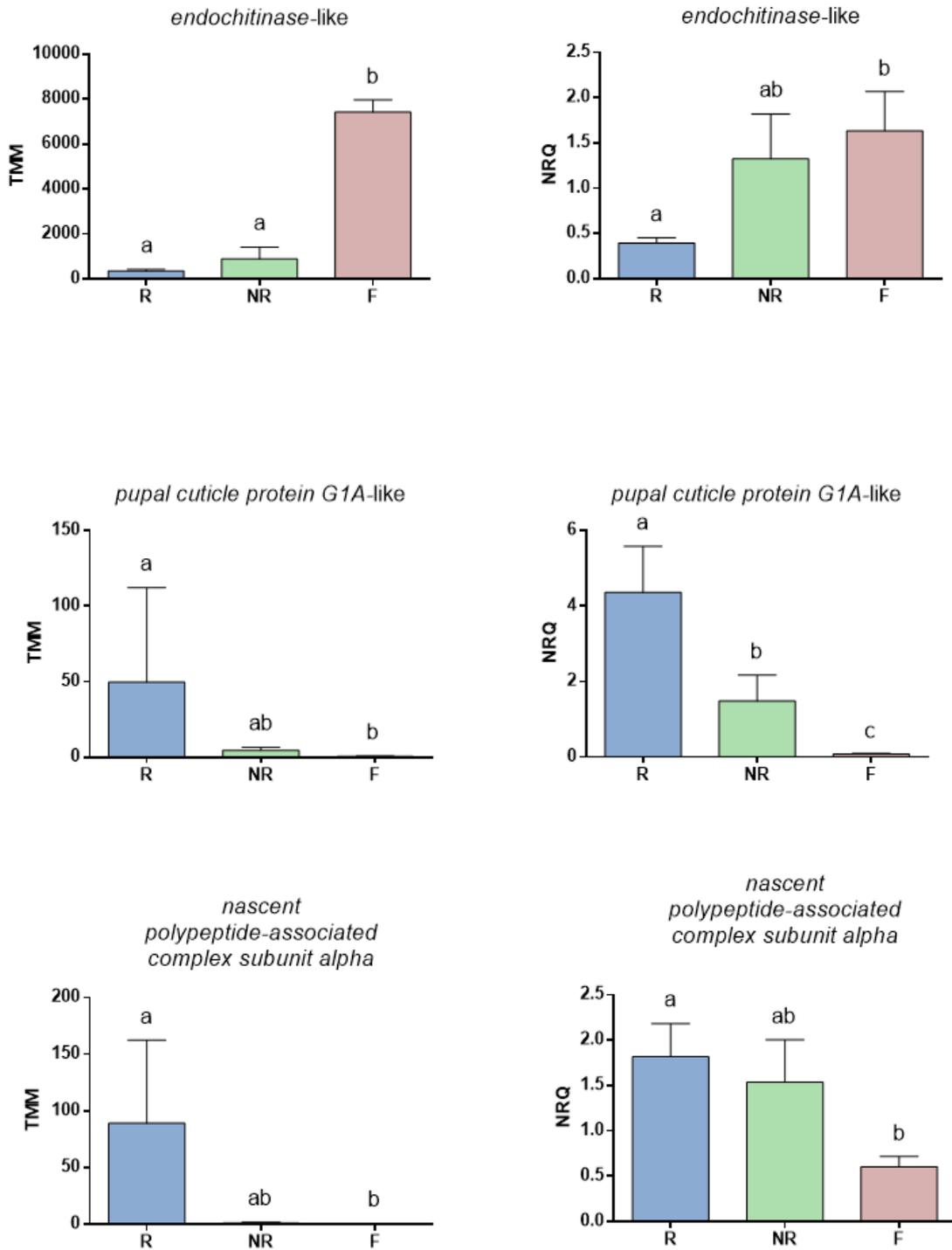


Figura 51. Continuación

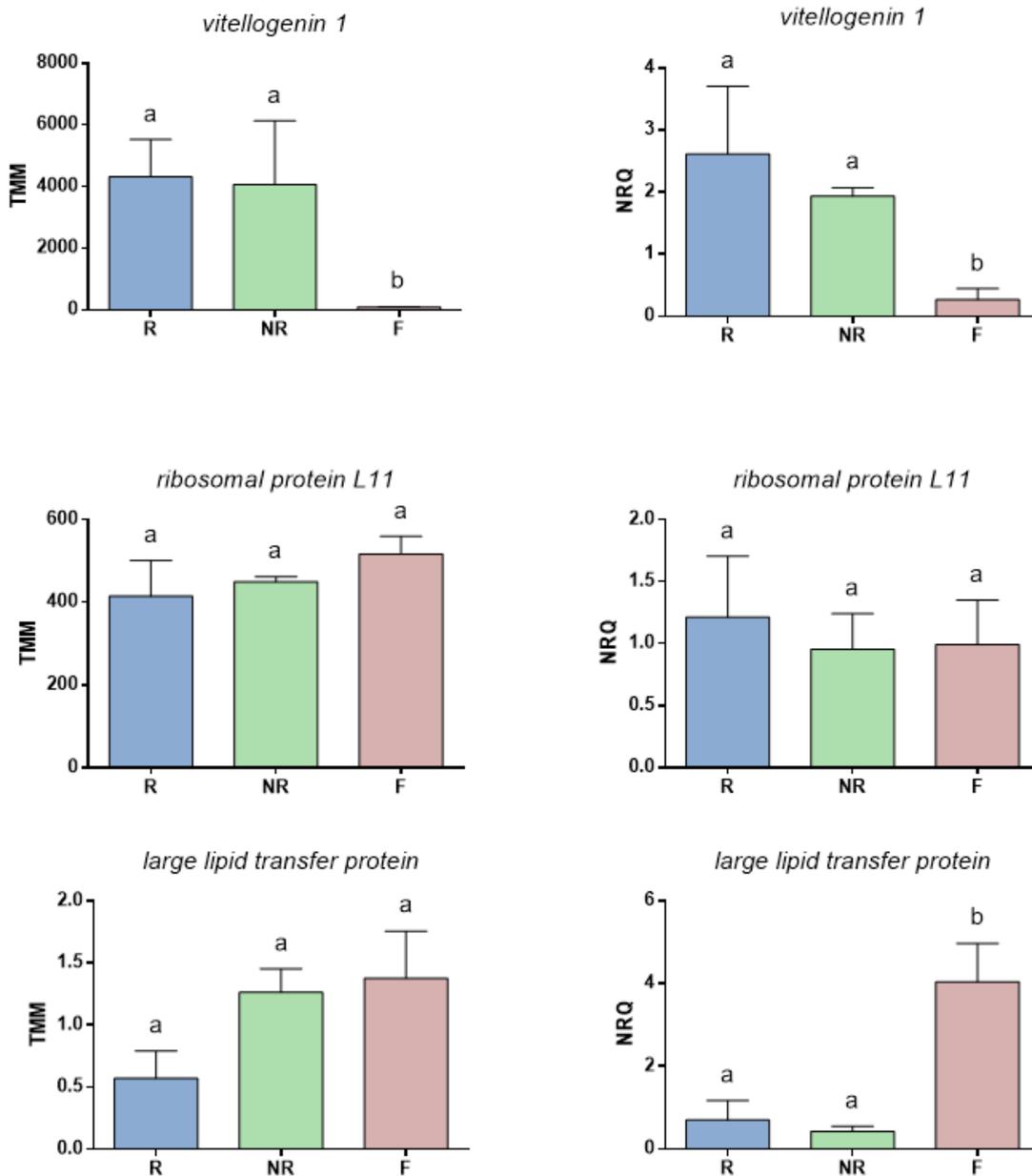


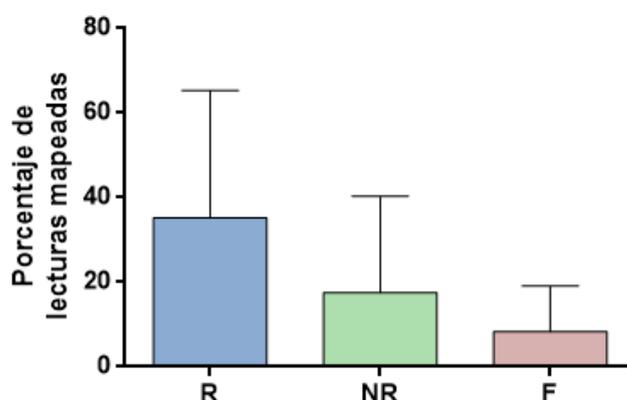
Figura 51. Continuación

### 3.3.2.6. Detección y cuantificación de transcritos virales

Se detectaron un total de 10 de los 30 virus de *A. mellifera* analizados (Tabla 11; Tabla Suplementaria 16), varios de los cuales se encuentran asociados a *V. destructor* según bibliografía. Se detectó una gran variación de las lecturas mapeadas contra los genomas virales analizados entre las bibliotecas (Tabla 11); sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos de ácaros (R, NR y F) (Resultados GLMM;  $P=0,8286$ ; Figura 52).

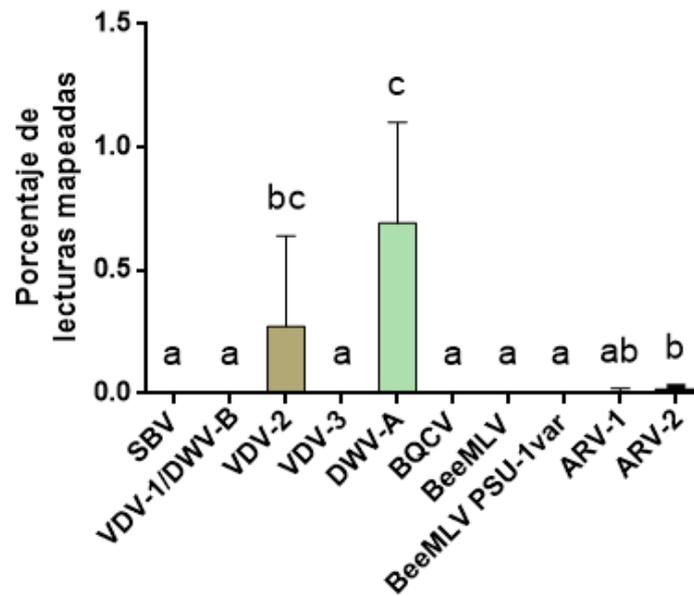
**Tabla 11.** Abundancia relativa de los virus totales de *A. mellifera* en las 9 bibliotecas correspondientes a los tres grupos de ácaros (R, NR y F). La abundancia de virus se expresa como el porcentaje de lecturas mapeadas.

Muestras	N° Lecturas de entrada	N° Lecturas mapeadas	% de Lecturas mapeadas
R1	8.433.036	4.430.416	52,54%
R2	5.633.450	2.981.492	52,92%
R3	1.763.059	10.804	0,61%
NR1	5.728.780	2.503.526	43,70%
NR2	1.776.564	150.282	8,46%
NR3	1.588.223	13.716	0,86%
F1	3.034.326	638.977	21,06%
F2	1.812.088	35.423	1,95%
F3	1.780.899	40.361	2,27%



**Figura 52.** Abundancia relativa de los virus totales de *A. mellifera* en los tres grupos de ácaros (R, NR y P). La abundancia de virus se expresa como el porcentaje de lecturas mapeadas en los genomas virales.

Entre las secuencias virales detectadas, los virus VDV-2 y DWV-A mostraron la mayor abundancia en todas las bibliotecas analizadas (resultados GLM;  $P < 0,0001$ ; Figura 53; Tablas Suplementarias 27 y 28). Aunque se evidenció una abundancia viral similar para VDV-2 entre las bibliotecas, se observó una alta variación para el virus DWV-A (Tabla Suplementaria 27). Específicamente, para los grupos R y NR, dos de las tres muestras evidenciaron una gran abundancia de DWV-A (Tabla Suplementaria 27). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ácaros para los virus de mayor prevalencia, sí se observaron diferencias para los virus de menor prevalencia. Específicamente, DWV-B mostró una mayor abundancia en el grupo de ácaros F que en los ácaros R y NR, mientras que los dos virus BeeMLV mostraron un patrón inverso (resultados GLM;  $P = 0,0286$  (DWV-B);  $P = 0,0443$  (BeeMLV);  $P = 0,0427$  (BeeMLV PSU-1var); Figura 54).



**Figura 53.** Abundancia relativa de los 10 virus de *A. mellifera* detectados en las bibliotecas de *V. destructor*. SBV: Sacbrood virus; VDV-1/DWV-B: Varroa destructor virus-1/Deformed wing virus-B; VDV-2: Varroa destructor virus-2; VDV-3: Varroa destructor virus-3; DWV-A: Deformed wing virus-A; BQCV: Black queen cell virus; BeeMLV: Bee Macula-like virus; BeeMLV PSU-1var: Bee macula-like virus isolate PSU-1var; ARV-1: Apis rhabdovirus 1; ARV-2: Apis rhabdovirus 2.

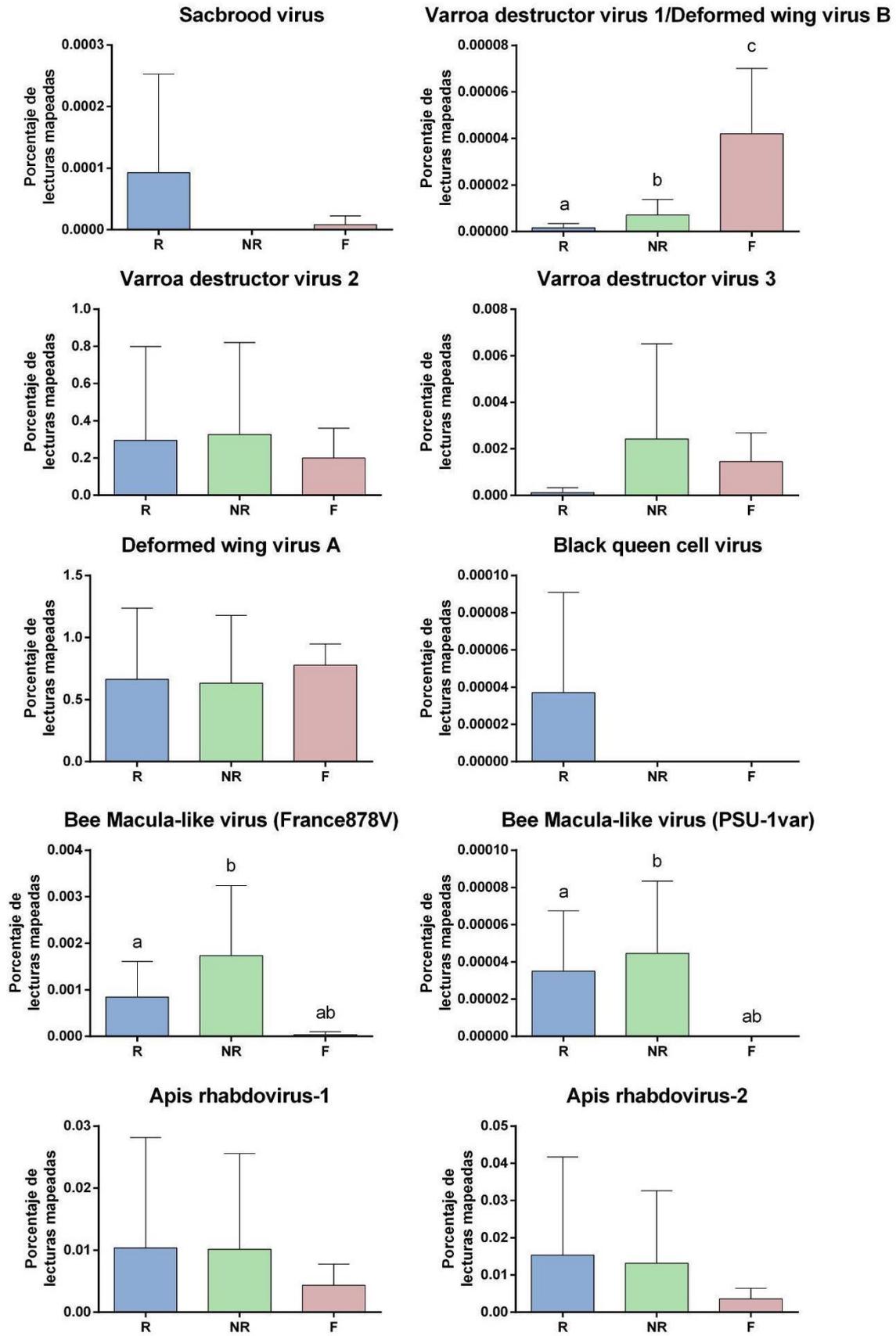


Figura 54. Abundancia relativa de los virus de *A. mellifera* detectados en las bibliotecas de *V. destructor* para los tres grupos de ácaros (R, NR y F).

### 3.4. DISCUSIÓN

En este capítulo, se presentan los principales resultados de la obtención y análisis del transcriptoma completo de hembras de *V. destructor* en su primer ciclo de vida con diferente estado reproductivo. Se identificaron genes candidatos implicados en el éxito reproductivo del ácaro y se exploraron las vías metabólicas subyacentes. Además, se utilizaron herramientas bioinformáticas para detectar *lncRNA* potencialmente asociados a la regulación de la reproducción de esta especie e identificar secuencias virales potencialmente involucradas en la interacción entre *V. destructor* y *A. mellifera*.

Los primeros análisis del experimento de RNA-Seq desarrollado en esta Tesis, mostraron una alta calidad y representatividad de las lecturas obtenidas. Estos resultados se evidenciaron en el mapeo de las lecturas obtenidas de secuenciación contra el genoma de referencia (GCA\_000181155.2). Este análisis mostró que el 96% de los genes estaban representados en las nueve bibliotecas de *V. destructor* analizadas.

Nuestros resultados revelaron que la mayor diferencia en los conjuntos de datos del experimento de RNA-Seq se produjo entre las fases forética (F) y reproductiva (R/NR) (con 1116 genes diferencialmente expresados en la comparación R vs. F, y 416 en la comparación NR vs. F). Estos resultados están en línea con los profundos cambios fisiológicos, conductuales y funcionales que ocurren en el ácaro durante la transición de fases del ciclo de vida también evidenciado por otros autores (Mondet et al., 2018). Por el contrario, nuestros resultados para los ácaros reproductivos (R) y no reproductivos (NR) presentaron perfiles de expresión más homogéneos, con solo 45 DEGs, lo que sugiere que cambios regulatorios menores subyacen al éxito reproductivo del ácaro en el cuarto día post operculado.

#### 3.4.1. Comparación entre la fase forética y la fase reproductiva de *V. destructor*

Dentro de los cambios transcripcionales que ocurren entre las fases forética y reproductiva, identificamos tres términos GO clave para los cuales se encontraron diferencias significativas en los perfiles de expresión: el proceso metabólico de aminoazúcares, el proceso metabólico de la quitina y la unión de la quitina. Nuestros resultados están en línea con estudios previos que revelaron que los procesos metabólicos de los carbohidratos (específicamente el metabolismo de la quitina) subyacen las transiciones entre las fases del ciclo de vida de los ácaros (McAfee et al., 2017; Mondet et al., 2018). La quitina es el principal componente estructural de la cutícula de los artrópodos, que proporciona soporte mecánico y una barrera eficaz contra la disecación y las infecciones (Politi et al., 2019; Tralalon et al., 2020). Anteriormente se ha sugerido que una cutícula flexible durante la fase reproductiva permitiría que el ácaro ingiera una gran cantidad de hemolinfa durante su alimentación (Mondet et al., 2018). Sin embargo, Ramsey y colaboradores (2019) han demostrado recientemente

que la principal fuente de alimento para *Varroa* es el cuerpo graso del huésped, en línea con la falta de adaptaciones esenciales en el ácaro asociadas con la alimentación en base. Una explicación alternativa a los resultados anteriores y los obtenidos en la presente Tesis es que las hembras de *V. destructor* podrían invertir estratégicamente menos energía en la síntesis de la cutícula, ya que en las celdas de cría de las abejas están menos expuestas a las variaciones de temperatura y humedad (Nazzi & Le Conte, 2016) y protegidas del comportamiento de acicalamiento de las abejas adultas (Guzman-Novoa et al., 2012; Russo et al., 2020). Los resultados obtenidos en nuestros experimentos respaldan la hipótesis de una adaptación eficiente de las hembras de *Varroa* con una mínima inversión energética en la constitución de la cutícula según el entorno de su huésped (la celda de cría/la abeja adulta) y evidencian que estos cambios fisiológicos están regulados a nivel transcripcional.

Los lípidos parecen desempeñar un papel crucial en el desarrollo de *V. destructor* (McAfee et al., 2017). Estos autores, a través de un análisis proteómico, detectaron que la localización y el transporte de lípidos son los procesos biológicos más significativamente enriquecidos en las hembras fundadoras y su progenie, principalmente impulsados por la expresión de vitelogenina. De forma consistente, en nuestros resultados, encontramos que las vías de localización y transporte de lípidos se enriquecen cuando se comparan las fases reproductiva y forética, lo que respalda el papel clave de estas macromoléculas en la fisiología de los ácaros en general, pero en la transición de fases en particular. De hecho, nuestros resultados están en línea con los hallazgos de Ramsey y colaboradores (2019) que identificaron el cuerpo graso como el principal tejido del huésped consumido por *V. destructor*. Dado que el cuerpo graso representa el sitio principal de almacenamiento y síntesis de proteínas y lípidos en la abeja melífera, la alimentación de este tejido por parte del ácaro requiere el transporte y la localización de estos nutrientes para enfrentar el desafío energético de la reproducción. Además, estos autores encontraron una fuerte relación entre la fecundidad y los niveles de grasa corporal en la dieta del ácaro (Ramsey et al., 2019). Estos resultados están en consonancia con un uso estratégico de los recursos energéticos por parte del ácaro cuando inicia su fase reproductiva, maximizando aquellos destinados a la reproducción y minimizando la energía destinada a otros procesos.

### **3.4.2. Comparación entre ácaros reproductivos y no reproductivos**

La mayoría de los genes diferencialmente expresados (GDE) identificados para la comparación R vs. NR se mostraron sub-expresados en R (42 genes, 93,3%), de acuerdo con la hipótesis de que varios procesos fisiológicos se minimizan en las hembras de *V. destructor* que se reproducen exitosamente dentro de las celdas de cría de su huésped. De hecho, varias funciones, específicamente aquellas relacionadas con el metabolismo hormonal y energético general, la neuro-detección y neuro-locomoción, y la apoptosis, se encontraron sub-reguladas en los ácaros R en comparación con los NR. El patrón de expresión génica observado en los ácaros R está en línea con los resultados de Mondet

et al. (2018) y respalda los altos requerimientos energéticos necesarios para iniciar la oviposición (Garedew et al., 2004; Traynor et al., 2020). Por el contrario, las funciones asociadas con la transducción de señales, la actividad de factores de transcripción y la segmentación embrionaria se sobre-expresaron en los ácaros R en comparación con NR y serían procesos clave que determinan el éxito reproductivo del ácaro.

Dos genes sobre-expresados en los ácaros R estarían asociados con la transducción de señales: el gen *protein patched homolog 1-like (ptch1-like)*, un receptor de membrana predicho involucrado en la vía de señalización Hedgehog, y el gen *activator protein 1 (ap-1-like)*, un factor de transcripción predicho que constituye el producto final de la vía de señalización *c-Jun N-terminal kinase (JNK)*. La vía de señalización Hedgehog está íntimamente relacionada con el crecimiento y la diferenciación celular, con funciones en la formación de patrones embrionarios y la homeostasis del tejido adulto (Lum & Beachy, 2004). La vía de señalización JNK juega un papel importante en programas celulares complejos como la proliferación, diferenciación, desarrollo, transformación y apoptosis (Kim & Ausubel, 2005; Yamamoto et al., 2008; Tong & Feng, 2018). En artrópodos, estas dos vías de señalización están íntimamente relacionadas con el desarrollo embrionario, concretamente con la segmentación del embrión (Kockel et al., 2001; Oda & Oda, 2020), y están estrechamente interconectadas con la vía de señalización Wnt, otra de las vías clave en la segmentación del área posterior de los artrópodos (ver Clark et al., 2019 para una revisión). Aunque se dispone de poca información sobre los genes asociados a la oogénesis (Cabrera et al., 2013a) y a la embriogénesis en *V. destructor*, los aspectos citológicos de estos procesos han sido estudiados en detalle (Steiner et al., 1995;1994; Steiner & Diehl, 1994; Steiner, 1995). Steiner et al. (1994) describieron el desarrollo del huevo en el interior de la hembra fundadora en dos etapas: (1) una oogénesis con previtelogénesis, vitelogénesis y formación de la cáscara del huevo, y (2) una embriogénesis intraovárica con clivaje, segmentación, formación de yemas, diferenciación de las extremidades y molde embrionario. Así, este estudio pionero demostró que parte del proceso de embriogénesis tiene lugar en el interior de la hembra fundadora y, por tanto, los dos genes mencionados (*ptch1* y *ap-1*) son candidatos putativos implicados en este proceso temprano en *V. destructor*.

Por otro lado, los resultados de qPCR evidenciaron que el gen *heat shock protein 83-like* también se sobre-expresa en los ácaros R en comparación con los NR. Este gen ha sido descrito como perteneciente a la familia *hsp90* en *D. melanogaster* y estaría asociado con la espermatogénesis, la ovogénesis y la embriogénesis (Ding et al., 1993; Yue et al., 1999; Song et al., 2007; Pisa et al., 2009; Xu et al., 2009; 2010). En general, nuestros resultados sugieren que los procesos de escisión y diferenciación del embrión serían fundamentales para el éxito reproductivo de *V. destructor*, y que los genes identificados son candidatos putativos involucrados en este rasgo.

En el grupo de ácaros NR detectamos genes sub-expresados asociados a la segmentación embrionaria y genes sobre-regulados relacionados con la apoptosis. Específicamente, *ap-1*, un gen que regula la apoptosis, se sobre-expresa en los ácaros R en comparación con los NR. En los artrópodos, uno de los productos de la vía Hedgehog es una proteína (Dpp; Ågren et al., 2004), que inhibe la vía de la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) (Kockel et al., 2001), responsable, entre otras funciones, de activar la función apoptótica de AP-1 (Kim et al., 2005). Es posible que la mayor expresión de *ptch1* observada en los ácaros R esté implicada en la inhibición de la acción apoptótica de AP-1 en este grupo. Además, citocromo C (CYCS), un gen que activa la apoptosis, se encontró sobre-expresado en los ácaros NR en comparación con los R. En general, estos resultados son consistentes con una interrupción temprana del proceso de reproducción en los ácaros NR, posiblemente para evitar la inversión innecesaria de energía en el proceso de reproducción cuando el momento preciso de la puesta del primer huevo pasó. En este sentido, y basándonos en nuestros resultados que sugieren que los ácaros NR serían más parecidos a los ácaros F (de lo que se parecen los ácaros R a los F), podemos sugerir que los ácaros NR pasarían el resto de su fase reproductiva dentro de la celda de cría asemejándose cada vez más a los ácaros foréticos, y estarían así preparados para iniciar una nueva fase reproductiva (potencialmente exitosa) una vez que les toca abandonar la celda de cría. Esta hipótesis está en línea con los resultados obtenidos por Frey et al. (2013), quienes observaron que una vez que la hembra de *Varroa* inicia la oogénesis, ésta puede ser interrumpida por factores del huésped. Concretamente, a las 48 horas del operculado de la celda, si el desarrollo de los ovocitos del ácaro se retrasa en comparación con el desarrollo de las larvas del hospedador, es difícil obtener hembras hijas fértiles y maduras. En estas condiciones, un proceso de oosorción (degradación de los ovocitos en crecimiento; Steiner et al., 1995) podría conducir a una infertilidad temporal de las hembras de *Varroa* dentro de la celda de cría y, por tanto, les permitiría ahorrar recursos energéticos para el siguiente ciclo reproductivo. Nuestra hipótesis es que la apoptosis sería un proceso clave que posibilita la degradación de los ovocitos en crecimiento que se inicia 48 horas después del operculado de la celda de cría, según los experimentos de transferencia de ácaros realizados por Frey et al. (2013).

#### **3.4.2.1. ARN largos no codificantes diferencialmente expresados**

Estudios previos han demostrado la posible función de los ARN largos no codificantes (*lncRNA*), fundamentalmente asociados a la regulación de la expresión génica a nivel de la herencia epigenética, la transcripción y los procesos postranscripcionales (Furuno et al., 2006; Mercer et al., 2009). Nosotros detectamos cinco *lncRNA* diferencialmente expresados entre los ácaros R y NR e identificamos 41 genes potencialmente *targets* en *cis* de estos *lncRNAs*. Los análisis KEGG revelaron que estos genes están principalmente asociados con el metabolismo y las vías de replicación, transcripción y traducción. Estos resultados son consistentes con los obtenidos para los GDE entre ácaros R y NR (esta

Tesis) y con los obtenidos por Mondet et al. (2018) en los que se evidencia que las funciones relacionadas con la replicación del ADN y la regulación de la traducción serían reguladas durante la etapa de oviposición de la hembra fundadora dentro de la celda de cría.

Entre los potenciales genes *targets* identificados de los cinco lncRNA detectados, se destaca el gen *protein ovo-like*. Este gen codifica una proteína que juega un papel crucial en la supervivencia, la determinación del sexo en la línea germinal y la remodelación del citoesqueleto durante la diferenciación epidérmica. Asimismo, diferentes isoformas de esta proteína actúan de forma antagónica entre sí, teniendo una actividad de activación o represión transcripcional (Andrews et al., 2000). Nuestros resultados están en línea con Lin et al. (2020), quienes propusieron que los lncRNA predichos en *V. destructor* pueden ser potencialmente responsables de las funciones reguladoras de progresos celulares y biológicos durante la fase reproductiva del ácaro. Consideramos que son necesarios más estudios para explorar las funciones de estos lncRNA y los genes *target*, y así como su impacto en la reproducción de *V. destructor*.

### **3.4.3. Genes Halloween**

Estudios previos han propuesto que el inicio de la vitelogénesis y la reproducción en el orden Acari es iniciado por ecdisteroides (Cabrera et al., 2009) y que, como en los insectos, la hidroxilación secuencial final de los precursores de esteroides que dan lugar a los ecdisteroides activos está mediada por el citocromo P450 (CYP450s), codificado por genes de Halloween (Rewitz et al., 2006). Algunos ortólogos de estos genes como *spook* (CYP307a1), *disembodied* (CYP302A1), *shade* (CYP314A1) y *shadow* (CYP315a1) han sido detectados previamente en Acari, y particularmente en *Varroa* (Cabrera et al., 2015; Mondet et al., 2018; Techer et al., 2019; Yang et al., 2021). Nosotros detectamos la presencia de estos cuatro genes y dos receptores nucleares: el receptor de ecdisona (EcR) y el receptor de retinoides X (RXR). Al analizar los patrones de expresión de estos genes *Halloween*, encontramos que *EcR* y *disembodied* se sobre-expresaron en los ácaros R y NR en comparación con los ácaros F, de manera consistente con estudios previos en los que *disembodied*, *spook* y *shade* se presentaron como genes sobre-regulados en las etapas de oviposición respecto a la fase forética (Cabrera et al., 2015; Mondet et al., 2018). Aunque los genes *Halloween* identificados no se encontraron expresados diferencialmente entre los ácaros R y NR, la alta expresión detectada durante la fase reproductiva respalda que esta cascada juega un papel crucial en el inicio de la fase reproductiva de *V. destructor* y que se mantiene activa incluso cuatro días después de la invasión de la hembra fundadora a la celda, independientemente de que la reproducción progrese efectivamente dentro de la celda de cría.

#### 3.4.4. Virus

Los resultados obtenidos en esta Tesis a partir del análisis de las lecturas no mapeadas de nuestra base de datos RNA-Seq de *V. destructor* permitieron detectar secuencias de 10 virus previamente identificados como patógenos de abejas melíferas y potencialmente asociados al ácaro. En particular, seis de estos virus (VDV-2, VDV-3, BeeMLV, BeeMLV PSU-1var, ARV-1 y ARV-2) de estos 10 virus no fueron reportados previamente en Argentina ni en muestras de abejas ni en ácaros (ver Salina et al., 2021 para una revisión). Este resultado novedoso, se fundamenta en que la mayoría de los análisis anteriores se realizaron en muestras de abejas, y los VDV-2, VDV-3 son virus que se replican exclusivamente en *V. destructor* (Herrero et al., 2019). Por otro lado, la detección de los virus BeeMLV, BeeMLV PSU-1var, ARV-1 y ARV-2 respalda la hipótesis previa de que *V. destructor* es un vector de estos virus, aunque se desconoce el papel preciso de los ácaros en su transmisión (de Miranda et al., 2015; Remnant et al., 2017; Levin et al., 2017; revisado por Yañez et al., 2020).

La detección de SBV está en línea con reportes previos de Argentina en los que se detectó este virus en colonias con prevalencias de 9 a 14% (Reynaldi et al., 2010; Sguazza et al., 2013; Brasesco et al., 2013; revisado en Salina et al., 2021), y con resultados recientes que proponen a *V. destructor* como vector mecánico de este virus (Dubois et al., 2020). Por otro lado, la presencia de BQCV en el ácaro era menos esperada, ya que si bien se reportó en colonias de Argentina con prevalencias que varían entre 3,5 a 58% (Sguazza et al., 2013; Ding et al., 2016; revisado en Salina et al., 2021), no hay evidencia de que *V. destructor* actúe como vector de este virus (revisado en Yañez et al., 2020). ABPV e IAPV no se detectaron en nuestras muestras de ácaros a pesar de que estos virus generalmente se detectan en colonias de abejas melíferas de Argentina (Reynaldi et al., 2010; Sguazza et al., 2013; Brasesco et al., 2013; Ding et al., 2016; revisado en Salina et al., 2021) y que *V. destructor* se ha descrito como un vector mecánico y biológico eficiente de IAPV (Di Prisco et al., 2011) y como vector mecánico del ABPV (Bakonyi et al., 2002; D'Alvise et al., 2019).

Nuestros resultados mostraron que los virus VDV-2 y DWV-A se hallaban en alta abundancia. Por un lado, la alta abundancia de VDV-2 está en línea con los antecedentes previos de alta prevalencia del virus en *V. destructor* (Herrero et al., 2019; Chen et al., 2021; Lester et al., 2022). Por otro lado, los resultados sobre la abundancia de DWV-A son consistentes con estudios previos donde se ha caracterizado como un virus altamente prevalente en colonias de abejas melíferas de Argentina (Brascesco et al., 2021a; b; revisado en Salina et al., 2021) y es detectado ampliamente distribuido en colonias infestadas por *V. destructor* en todo el mundo (Martin et al., 2019; Lester et al., 2022; revisado en Martin & Brettell, 2019). En este sentido, el patrón observado en ácaros es consistente con lo descrito para el hospedador. La mayor prevalencia de la variante DWV-A en comparación con DWV-

B es llamativa ya que, ésta (DWV-A) a diferencia de la variante DWV-B, solo puede ser transmitida por el ácaro (Posada-Florez et al., 2019) y no es capaz de replicarse en *V. destructor*, (Ongus et al., 2004, 2006; Campbell et al., 2016; Posada-Florez et al., 2019; Yañez et al., 2020).

Si bien no se detectaron diferencias significativas en la abundancia de virus entre las tres condiciones de ácaros comparadas para los virus de mayor prevalencia, hemos encontrado diferencias significativas en los virus detectados en menor frecuencia (DWV-B y BeeMLV) entre las fases forética (F) y reproductiva (R y NR). Si bien evidencias previas no detectaron una correlación entre DWV y el éxito reproductivo del ácaro (Castelli et al., 2021), más estudios son necesarios para analizar si una etapa específica del ciclo de vida del ácaro es particularmente sensible a la replicación e infección de virus en *V. destructor* y su transmisión a *A. mellifera*.

Capítulo 4. Análisis de patrones de expresión y exploración funcional de genes candidatos a intervenir en el éxito reproductivo de *Varroa destructor*

## 4.1. INTRODUCCIÓN

### 4.1.1. Silenciamiento génico: Generalidades

El silenciamiento génico es un proceso definido como una modificación epigenética endógena de la expresión génica que conduce a la inactivación de genes o regiones cromosómicas previamente activos. Los mecanismos responsables de la represión de los genes implican cambios en los niveles de metilación del ADN y alteraciones en las modificaciones covalentes de las histonas, que conducen a la compactación de la cromatina y la concomitante inaccesibilidad de los genes a la maquinaria de transcripción. El silenciamiento génico también puede ocurrir después de la transcripción debido a la degradación del ARN mensajero (mRNA, del inglés *messenger RNA*) y/o la represión de su traducción. Estos efectos están fundamentalmente mediados por pequeños reguladores de ARN, como pequeños ARN de interferencia (siRNA, de sus siglas en inglés *small interfering RNA*), micro ARNs (miRNA, del inglés *micro RNA*) o ARN asociados a PIWI (piRNA, del inglés *piwi-interacting RNA*, siendo PIWI una subfamilia de proteínas nucleares que actúan a nivel del ADN). Estos ARN pequeños se generan a partir de diferentes formas de ARN doble cadena (dsRNA, del inglés *double-stranded RNA*) que se acumulan en las células. Los ARN pequeños, particularmente los siRNA, también pueden participar del silenciamiento de genes a nivel de transcripción. Mediante este proceso, el organismo puede regular procesos biológicos clave como el desarrollo, el metabolismo o la proliferación celular, entre otros (Wassenegger, 2002; Scott et al., 2013; Filipowicz & Paszkowski, 2013).

### 4.1.2. Orígenes de la técnica de ARN de interferencia (ARNi)

El fenómeno de silenciamiento génico por interferencia fue accidentalmente descubierto en 1990, cuando investigadores intentaron sobreexpresar la enzima Chalcona Sintasa, involucrada en la síntesis de antocianinas, y que produce el color púrpura en los pétalos de petunias (Napoli et al., 1990). Los autores introdujeron varias copias del gen que codifica para la enzima mencionada, esperando encontrar que las plantas que la sobre-expresaran, exhibieran flores de color púrpura intenso. Sin embargo, descubrieron que se generaban flores sin color o con parches blancos. Al analizar el nivel de la enzima encontraron que era 50 veces menor a los de las plantas salvajes o *wild-type*. Esta observación evidenció que las copias introducidas del gen no se estaban expresando, y tampoco el gen endógeno de la planta, motivo por el cual denominaron al fenómeno observado “co-supresión”. Un fenómeno equivalente fue descrito dos años después en el hongo *Neurospora crassa*, donde copias extra de un gen producían la pérdida del color naranja (Romano & Macino, 1992). Estas observaciones fueron mejor caracterizadas por Andrew Fire y Craig Mello, quienes descubrieron que tras la inyección de dsRNA al nematodo *Caenorhabditis elegans*, se producía un silenciamiento de la expresión de genes

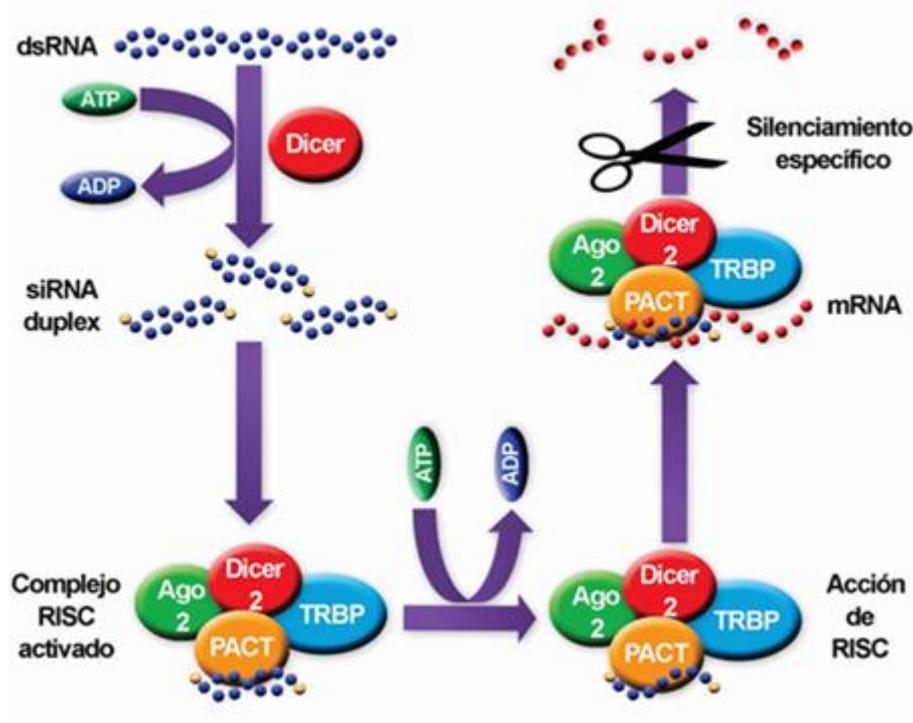
de manera secuencia-específico, logrando inhibir la expresión del gen que presenta la misma secuencia que el dsRNA incorporado (Fire et al., 1998). Los resultados de estos experimentos permitieron explicar el fenómeno de silenciamiento por interferencia del RNA (RNAi). Posteriormente, el mecanismo del RNAi fue descrito *in vitro* utilizando extractos de la mosca *Drosophila melanogaster* (Hammond et al., 2000). Estos estudios revelaron que moléculas largas de dsRNA eran cortadas en fragmentos pequeños con una estructura específica y eran responsables de desencadenar o mediar el proceso de interferencia del RNA (Benstein et al., 2001; Zamore et al., 2000). Estas moléculas fueron denominadas RNA interferentes pequeños (en inglés, *Small interfering RNA*, siRNA).

A partir de estos primeros antecedentes, la técnica de RNAi se implementó como herramienta para silenciar la expresión de genes en varios organismos, pero no fue hasta el año 2001 cuando utilizando siRNA se logró inducir el mecanismo de silenciamiento en células de mamíferos (Elbashir et al., 2001).

#### **4.1.3. Mecanismo de acción del silenciamiento de genes mediante RNAi**

El mecanismo de acción de RNAi se puede explicar en tres etapas principales: i) escisión de dsRNA, ii) entrada de siRNA en RISC y iii) secuencia específica de escisión para el mRNA blanco.

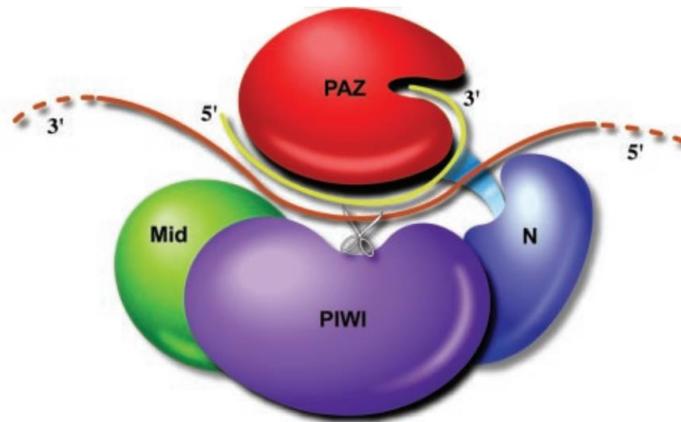
En esta primera etapa la enzima endonucleasa *Dicer* corta progresivamente el dsRNA para generar duplex de siRNA, los cuales son fragmentos de RNA de entre 21 a 23 pb con 2 nucleótidos sobresalientes en el extremo terminal 3'OH y 5'PO<sub>4</sub> (Nicholson, 1999, Bernstein et al., 2001, Elbashir et al., 2001) (Figura 55). *Dicer* es una enzima endonucleasa dependiente de ATP que pertenece a la familia RNasa III. Contiene cuatro dominios distintos: (i) un dominio helicasa N-terminal; (ii) un dominio PAZ que comparte con la familia de proteínas RDE1/QDE2/Argonata, las que han sido genéticamente vinculadas a RNAi; (iii) un doble motivo de RNasa III, y (iv) un dominio de unión a dsRNA (Tabara et al., 1999; Catalanotto et al., 2000). Se han identificado homólogos a *Dicer* evolutivamente conservados en diferentes organismos (Golden et al., 2002) y algunas de estas proteínas recombinantes han sido examinadas *in vitro* en plantas, hongos y mamíferos (Bernstein et al., 2001; Fisher et al., 2001).



**Figura 55.** Modelo simplificado del sistema de silenciamiento génico mediante RNAi. Imagen extraída de Paptic et al. (2015).

En la segunda etapa, los siRNA generados en el paso anterior se unen a un complejo protéico denominado “complejo de silenciamiento inducido por ARN” (en inglés *RNA-induced silencing complex*, RISC) (Elbashir et al., 2001), el cual se compone de proteínas endonucleasas llamadas *Argonautas*. RISC tiene una helicasa dependiente de ATP que despliega el duplex siRNA. Como estos fragmentos son de doble cadena, en teoría, cada cadena sería un siRNA funcional. Sin embargo, solo una de las cadenas, que es conocida como la hebra guía, se une a la proteína *Argonauta* y dirige el silenciamiento génico, mientras que la hebra antisentido se degrada durante la activación de RISC (Figura 55).

En el complejo RISC se diferencian dos grandes dominios: PAZ y PIWI. El dominio PAZ es el que sostendría el extremo 3’ del siRNA, proporcionando la orientación correcta para el reconocimiento y la escisión de mRNA, mientras que PIWI contiene el sitio activo para escindir el mRNA (Nykanen et al., 2001) (Figura 56). La escisión del mRNA diana comienza en un sitio específico 10 nucleótidos río arriba del extremo 5’ de los residuos del dúplex siRNA-mRNA (Elbashir et al., 2001). Esta última parte del proceso es independiente de ATP (Ghildiyal & Zamore, 2009; Senapedis et al., 2011) (Figura 55).



**Figura 56.** Representación esquemática del complejo RISC. El siRNA se muestra en amarillo, el mRNA en marrón. El sitio activo en el dominio PIWI se muestra como unas tijeras. Figura modificada a partir de Song et al. (2004).

En la tercera etapa, el complejo RISC activado promueve la síntesis de siRNA a través de un proceso dependiente de ATP. El sitio de rompimiento específico de mRNA, mediado por RISC, se define con respecto a donde el extremo 5' de la hebra antisentido se une a la secuencia blanco de mRNA. RISC escinde el mRNA complementario en el centro, diez nucleótidos arriba del apareamiento con el extremo 5' de la guía de siRNA. La guía de siRNA proporciona la región diana a RISC, la cual se escinde y luego el siRNA sale intacto con el complejo RISC (Schwarz et al., 2002). La participación de polimerasas de RNA dependientes de RNA (en inglés *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRP) permite desencadenar el silenciamiento génico a partir de RNA de cadena sencilla (en inglés *single-stranded RNA*, ssRNA), además de amplificar la señal de éste, gracias a su capacidad de generar moléculas dsRNA a partir de ssRNA (Cogoni & Macino, 1999; Dalmay et al., 2000).

Se han descrito variaciones de este complejo mecanismo en los diferentes reinos de la vida, y se ha demostrado que los mediadores de la interferencia pueden viajar desde las células en que se producen hasta otras células del organismo y lograr el silenciamiento generalizado de la expresión de un gen en el organismo completo, aunque la inducción original haya sido sectorizada (Baulcombe, 2004; Barnard et al., 2012; Pan et al., 2012; Ivashuta et al., 2015). En algunas especies, como el gusano *C. elegans*, el silenciamiento es heredable (Fire et al., 1998; Grishok et al., 2000; Hunter & Hunter, 2006; Wang et al., 2017).

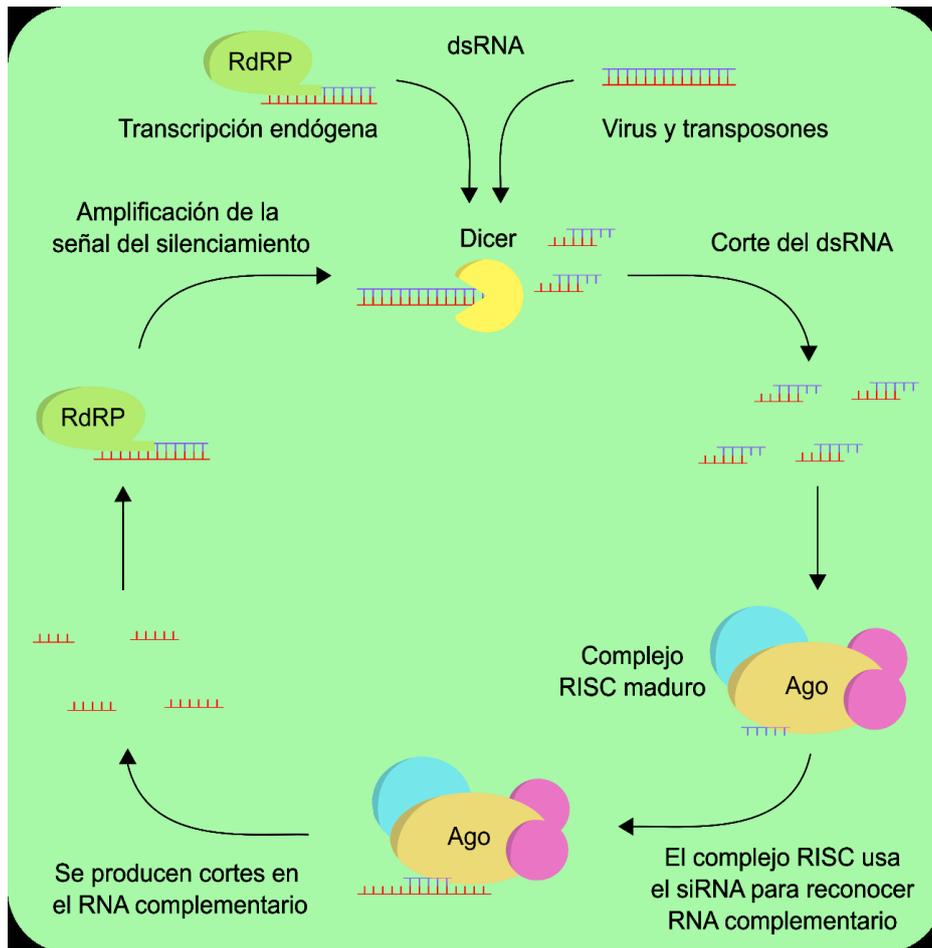
#### **4.1.4. El RNAi como estrategia para inhibir la expresión de genes**

Antes de la aparición de la técnica de RNAi, la inducción de mutaciones en un gen previamente caracterizado a nivel de secuencia nucleotídica representaba una de las principales estrategias para el

estudio de su función o participación en distintos mecanismos celulares. Mediante esta técnica, se generan productos del gen (o sea, permite su expresión) y a la vez se ocasiona la pérdida de función de la proteína (McClure et al., 2017; Wang et al., 2017; Chávez et al., 2019). Una segunda técnica ampliamente utilizada para el estudio de función, es el *knock out*, que se refiere a “noquear” o deleccionar un gen (Bouché & Bouchez, 2001; Hall et al., 2009; Houdebine, 2014), impidiendo su expresión. Las técnicas mencionadas constituyen algunos ejemplos de mecanismos que permiten estudiar la función de un gen mediante modificaciones en la información a nivel del ADN. Alternativamente, la técnica de RNAi ha demostrado ser una herramienta muy eficiente para reducir la expresión de un gen a nivel de transcripción y de esta manera explorar la función del mismo, sin alterar la información genómica (Kim & Rossi, 2008; Huvenne & Smagghe, 2010; Setten et al., 2019). La bibliografía describe dos tipos de mecanismos de interferencia en función de su temporalidad: los denominados “transitorios”, donde la expresión del gen se interfiere solo temporalmente y los “estables”, en el que la expresión génica es interferida de manera permanente (Miki & Shimamoto, 2004; Fewell & Schmitt, 2006; Wang et al., 2017). En el primer caso suelen utilizarse siRNA sintetizados químicamente; para el segundo se requiere que la célula incorpore en su genoma los elementos necesarios para fabricar una molécula de ARN de doble cadena que llegue hasta el citoplasma. La síntesis de los siRNA puede hacerse por varias vías (Puglise et al., 2016; Huang et al., 2017; Vlogiannitis et al., 2021; Muntaabski et al., 2022). En el caso de plantas e invertebrados, se pueden utilizar moléculas grandes de dsRNA (que serán procesadas a siRNA dentro de la célula), siendo la síntesis química la fuente más común de estos dsRNA (Nganso et al., 2020; Adeyinka et al., 2020; Hung et al., 2021). Por el contrario, en vertebrados, es necesario producir directamente moléculas de siRNA (Nikam & Gore, 2018; Hu et al., 2020).

#### **4.1.5. Silenciamiento génico en artrópodos y Acari**

En los artrópodos el RNAi evolucionó como un mecanismo antiviral natural (Niu et al., 2014), sin embargo, ante la necesidad de desarrollar alternativas amigables con el ambiente para el control de ácaros plaga y evitar la generación de resistencia a tratamientos químicos (Van Leeuwen et al., 2010), se comenzaron a explorar nuevos enfoques y estrategias. Desde la primera aplicación de RNAi mediante inyección en el ácaro *Tetranychus urticae*, silenciando el gen *Distal-less* (Khila et al., 2007), se ha demostrado que un número creciente de especies de ácaros herbívoros y también depredadores son susceptibles a RNAi (Grbic et al., 2011; Marr et al., 2015; Hoy et al., 2016; Mondal et al., 2018). Parece evidente que en varias especies de ácaros existe una expansión de los genes *ago* y la presencia de genes *RdRp* (que codifican para la enzima que cataliza la replicación del ARN a partir de una plantilla de ARN; Figura 57), lo que sugiere una presión de selección o una ruta de evolución diferente para la ruta del RNAi en los ácaros en comparación con los insectos (Nganso et al., 2021).



**Figura 57.** Mecanismo de silenciamiento génico descrito en ácaros. Se muestra el mecanismo general de silenciamiento génico y sus distintos componentes, junto con las moléculas de RNA y las distintas modificaciones que sufren. Se representa con color rojo el RNA (hebra sentido respecto a la transcripción) y en azul el RNA antisentido. Extraído de Ruiz (2021).

La aplicación experimental de RNAi para el silenciamiento génico en Acari utiliza la vía del siRNA, que se activa principalmente a través de la administración exógena de dsRNA sintéticos específicos (de la Fuente et al., 2007; Barnard et al., 2012; Sagi et al., 2013; Joga et al., 2016; Niu et al., 2018; Nguyen et al., 2018; Nganso et al., 2020). El éxito del silenciamiento génico está dado principalmente por tres procesos celulares: la captación de dsRNA por la célula diana, la amplificación de los siRNA y el transporte de estos últimos a células distantes para inducir el silenciamiento génico en todo el organismo, un fenómeno denominado RNAi sistémico (Barnard et al., 2012). Estos procesos involucran un número de proteínas esenciales, sin embargo, la información sobre el número de proteínas involucradas, su estructura y función aún es escasa en esta subclase (Galay et al., 2016; Niu et al., 2018; Nganso et al., 2020). Si bien se han informado casos exitosos de silenciamiento génico y RNAi sistémico en algunas especies de Acari utilizando la vía siRNA, los resultados han sido variables en la intensidad de la disminución de la expresión de genes (revisado en Galay et al., 2016; Niu et al., 2018;

Nganso et al., 2020). La variación en el éxito de esta técnica entre especies puede ser en parte explicada por la diferencia en estructura y función de las proteínas involucradas en los procesos, como fue sugerido para insectos (revisado en Joga et al., 2016). La complejidad de las interacciones entre las cascadas de genes participantes en el silenciamiento génico mediado por RNAi ha sido escasamente explorada en Acari (Nganso et al., 2020).

#### **4.1.6. Silenciamiento génico en *V. destructor* - Antecedentes**

Se han descrito varios estudios de silenciamiento génico en *V. destructor*. Campbell et al. (2010) probaron por primera vez la eficiencia de RNAi utilizando el gen *mu-class glutathione S-transferase* (*VdGST-mu1*), mediante el método de inyección de hembras adultas con dsRNA. Si bien su eficacia fue muy alta (97%), el método de inyección causó una alta mortalidad en los ácaros, mostrando que solo un 50% habían sobrevivido a las 48 horas posteriores a la inyección. Estos autores optaron por sumergir los ácaros en una solución de dsRNA como forma de administración alternativa, con resultados más promisorios. En efecto, un estudio más reciente llevado a cabo por el mismo grupo de investigación, y utilizando el método de inmersión, demostró que dos genes neuronales (el gen de *alostatina* y el gen *crustacean hyperglycaemic hormone (CHH-like)* pueden ser el objetivo del dsRNAi para el control potencial de los ácaros (Campbell et al., 2016). Aplicando el mismo método de entrega, Singh et al. (2016) silenciaron el gen *PRTF-like*, un candidato para la quimiodetección del huésped (*A. mellifera*). Si bien la inhibición no alcanzó el 100%, se pudo observar un efecto significativo e inverso con respecto a la expresión del gen de la vitelogenina. Estas evidencias permitieron proponer una segunda función del gen *PRTF-like* asociada al mecanismo de regulación de la vitelogenina en el ácaro. Posteriormente, Huang et al. (2017) identificaron dos genes putativos involucrados en la supervivencia de *V. destructor* (*da* y *pros265*) y cuatro genes candidatos para la reproducción (*rpL8*, *rpL11*, *rpP0* y *rpS13*) mediante el suministro dsRNA específico usando el método de inyección. Por su parte, Vlogiannitis et al. (2021), tratando de imitar el patrón de expresión de las CYP de una población de *V. destructor* resistente a cumafós (un acaricida ampliamente usado en la apicultura), lograron silenciar mediante el método de inmersión, el gen *CYP4EP4* y disminuir la toxicidad del químico en una población de ácaros susceptibles. Una forma alternativa de administración del dsRNA que se ha probado es a través de la alimentación. Al respecto, Garbian et al. (2012) demostraron que los dsRNA ingeridos por las abejas se transfieren a *Varroa* y viceversa. Estos autores informaron que la alimentación de abejas adultas parasitadas con dsRNA de varios genes produjo un efecto letal en los ácaros. Esto mismo fue replicado por Muntaabski et al. (2022) utilizando un número menor de genes y el mismo método de alimentación, suministrando dsRNA sintetizado por bacterias (Cedeño et al., 2015).

#### 4.1.7. Aplicación de RNAi como método de control de la varroosis

Los antecedentes arriba mencionados apoyan el uso del RNAi como una herramienta alternativa de control hacia el ácaro. Es importante considerar que el éxito de una herramienta como esta depende en gran medida de la producción masiva de dsRNA a bajo costo, del tipo de administración y de la elección de los genes a silenciar. Se sabe que utilizando el método de alimentación de abejas con jarabe fue posible suministrar dsRNA sintetizado por bacterias y silenciar correctamente los genes targets en *V. destructor* (Cedeño et al., 2015; Muntaabski et al., 2022). Asimismo, los métodos de administración de dsRNA por inyección e inmersión pueden resultar en un silenciamiento génico significativo (Campbell et al., 2010;2016; Huang et al., 2017).

Bayer Crop Science ha desarrollado un dsRNA de 372 pares de bases homólogo a una región de la secuencia del gen de la calmodulina de *V. destructor* (Inberg & Mahak, 2016), una proteína esencial de unión al calcio que regula múltiples proteínas diana. El producto prototipo está formulado como una solución de sacarosa al 80% que se coloca en la colonia de abejas melíferas. Las abejas nodrizas consumen la solución de sacarosa que contiene el dsRNA y la entregan a las celdas de cría. Los ácaros están expuestos al dsRNA a través del contacto con la solución de sacarosa depositada por las abejas melíferas adultas, el alimento de cría elaborado con la solución de sacarosa y/o mediante el consumo de los cuerpos grasos de larvas o adultos (Ramsey et al., 2019; Garbian et al., 2012).

La identificación de genes candidatos adecuados que muestren una alta especificidad sobre los ácaros y que no produzcan efectos perjudiciales en organismos no objetivos, especialmente especies benéficas, es crucial para aplicar esta tecnología en un programa de Manejo integrado de plagas. Actualmente, no existe un marco estándar para la evaluación de riesgos de esta tecnología, por lo que es de suma importancia realizar una evaluación integral de los posibles riesgos de su uso. Si bien los datos genómicos y transcriptómicos disponibles están en constante crecimiento, el número de especies de invertebrados cuyo genoma ha sido secuenciado aún es limitado. Además, todavía no hay consenso sobre la homología exacta de siRNA/mRNA diana que se necesita para un silenciamiento eficiente. Hasta que esta información fundamental esté disponible, el uso potencial de la bioinformática para predecir posibles efectos silenciadores no deseados en organismos no objetivos es limitado (Niu et al., 2018).

En este Capítulo se presentan los principales resultados de un ensayo de silenciamiento génico mediante RNA de interferencia en hembras de *V. destructor* en fase reproductiva. Exploramos el efecto del silenciamiento de genes candidatos asociados al éxito reproductivo a partir de la información generada en el Capítulo anterior.

## 4.2. MATERIALES y MÉTODOS

### 4.2.1. Selección de genes candidatos para el ensayo de silenciamiento

En base a los resultados obtenidos en el Capítulo 3 de esta Tesis se seleccionaron genes candidatos para realizar el ensayo de silenciamiento génico en *V. destructor*. Esta selección se realizó particularmente sobre los genes diferencialmente expresados (GDE) entre ácaros reproductivos y no reproductivos, considerando sus funciones predichas y los principales antecedentes bibliográficos (Cabrera et al., 2013a). Los genes candidatos seleccionados fueron: *ptch1*, *ap-1*, *larp6* y *chisal*, vinculados con la maduración del embrión y la segmentación embrionaria, y *vg1* y *vg6*, asociados con la maduración del ovocito, especialmente con la vitelogénesis según Cabrera et al. (2013a).

### 4.2.2. Análisis de patrones de expresión de los genes candidatos

Se analizaron los patrones de expresión de los seis genes candidatos en ácaros en fase reproductiva a lo largo de 5 días consecutivos luego de su entrada a la celda de cría (infestación artificial). Para la obtención de estos ácaros, se realizaron infestaciones artificiales según la metodología descrita en la sección 1.2.2.4.1 (Capítulo 1). A las 24 horas de la infestación artificial, los cuadros que contenían las celdas infestadas se retiraron de cada colmena. Las celdas de cría fueron revisadas y los ácaros fueron retirados de las mismas en grupos de 5. Cada grupo de 5 ácaros (réplica biológica) fue colocado inmediatamente en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y almacenado a -80 °C. Este mismo procedimiento se repitió cada 24 hs luego de la infestación artificial, hasta el día cinco inclusive.

Se establecieron cinco réplicas biológicas para cada día (días 1, 2, 3, 4 y 5 post infestación artificial). Se extrajo el ARN total de cada réplica y se sintetizó el cDNA según la metodología descrita en la sección 3.2.3.1. (Capítulo 3). Utilizando cebadores específicos (Tabla 8), se amplificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) los seis fragmentos correspondientes a los genes candidatos elegidos de *V. destructor* (*ptch1*, *ap-1*, *larp6*, *chisal*, *vg1* y *vg6*). Las reacciones de qPCR y el análisis de expresión se realizaron siguiendo la metodología descrita en la sección 3.2.3.3. (Capítulo 3).

Los niveles de expresión de cada gen candidato se compararon entre los días de permanencia en la celda luego de la infestación artificial. Debido a que al día cuatro se puede determinar si una hembra fundadora es fértil o infértil (en función de la visualización del primer huevo sobre la cría o en la celda), analizamos los grupos por separado: el patrón de expresión correspondiente a los ácaros de los días uno, dos y tres post-infestación, y el patrón de expresión correspondiente a los ácaros de los días cuatro y cinco, fueron analizados por otro lado. Los mismos análisis estadísticos se aplicaron a ambos set de datos, de acuerdo a lo descrito en la sección 3.2.3.3.. Los resultados de estos análisis fueron tenidos en cuenta en la planificación del ensayo de silenciamiento génico.

### 4.2.3. Ensayo de silenciamiento génico

#### 4.2.3.1. Síntesis de dsRNA

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas de cada gen candidato mediante el empleo de la herramienta de búsqueda “Blastn” del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) con la finalidad de identificar posibles secuencias nucleotídicas *target* no deseadas. Específicamente, se realizó esta búsqueda para *Apis mellifera* (taxid:7460) y *Homo sapiens* (taxid: 9606). La extracción del ARN y la síntesis de cDNA fue realizada de acuerdo con la metodología explicada en la sección 3.2.3.1 (Capítulo 3). Para cada gen candidato se diseñaron al menos tres pares de cebadores específicos. Se obtuvieron los fragmentos de los genes candidatos mediante PCR de punto final, usando como molde el cDNA sintetizado (Tabla 12). Las longitudes esperadas de los productos de PCR en pares de bases (pb) son 346 pb (*ptch1*), 307 pb (*ap-1*), 288 pb (*larp6*), 274 pb (*chisal*), 293 pb (*vg1*) y 294 pb (*vg6*). Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo las siguientes condiciones de ciclado: 92 °C durante 5 min, 35 ciclos de 92 °C durante 1 min, temperatura de hibridación específica durante 40 s, 72 °C durante 1 min y 72 °C durante 5 min.

Los fragmentos de PCR obtenidos se purificaron con el QIAquick® PCR Purification Kit (Quiagen) siguiendo el protocolo del fabricante y se clonaron individualmente en el vector pGem-T Easy (Promega), según la metodología indicada en la sección 2.2.5. (Capítulo 2). Para su amplificación se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  con las construcciones plasmídicas y posteriormente, se realizó una miniprep de acuerdo a la metodología de la sección 2.2.5.7. (Capítulo 2). Los fragmentos clonados se secuenciaron utilizando cebadores promotores T7 y Sp6 para verificar el correcto clonado e identificación del inserto. Una vez obtenidos estos plásmidos se realizó una nueva PCR con cebadores que contenían colas en la región 5' del promotor T7 (*forward*: 5'-TTCGGCAATCATTATAAGCCC-3' y *reverse* 5'-GTTGGTGCAGGTACGAGGGCC-3'). Para la síntesis del control de dsGFP se utilizó un plásmido pL4440-GFP que contenía el fragmento del gen de la proteína fluorescente verde (GFP). Al igual que con los otros fragmentos, se utilizaron cebadores que tuvieran en sus colas la región 5' del promotor T7 (Gamboa Cedeño et al., 2015).

**Tabla 12.** Cebadores específicos usados para la amplificación por PCR de punto final de los fragmentos correspondientes a los genes candidatos a silenciar.

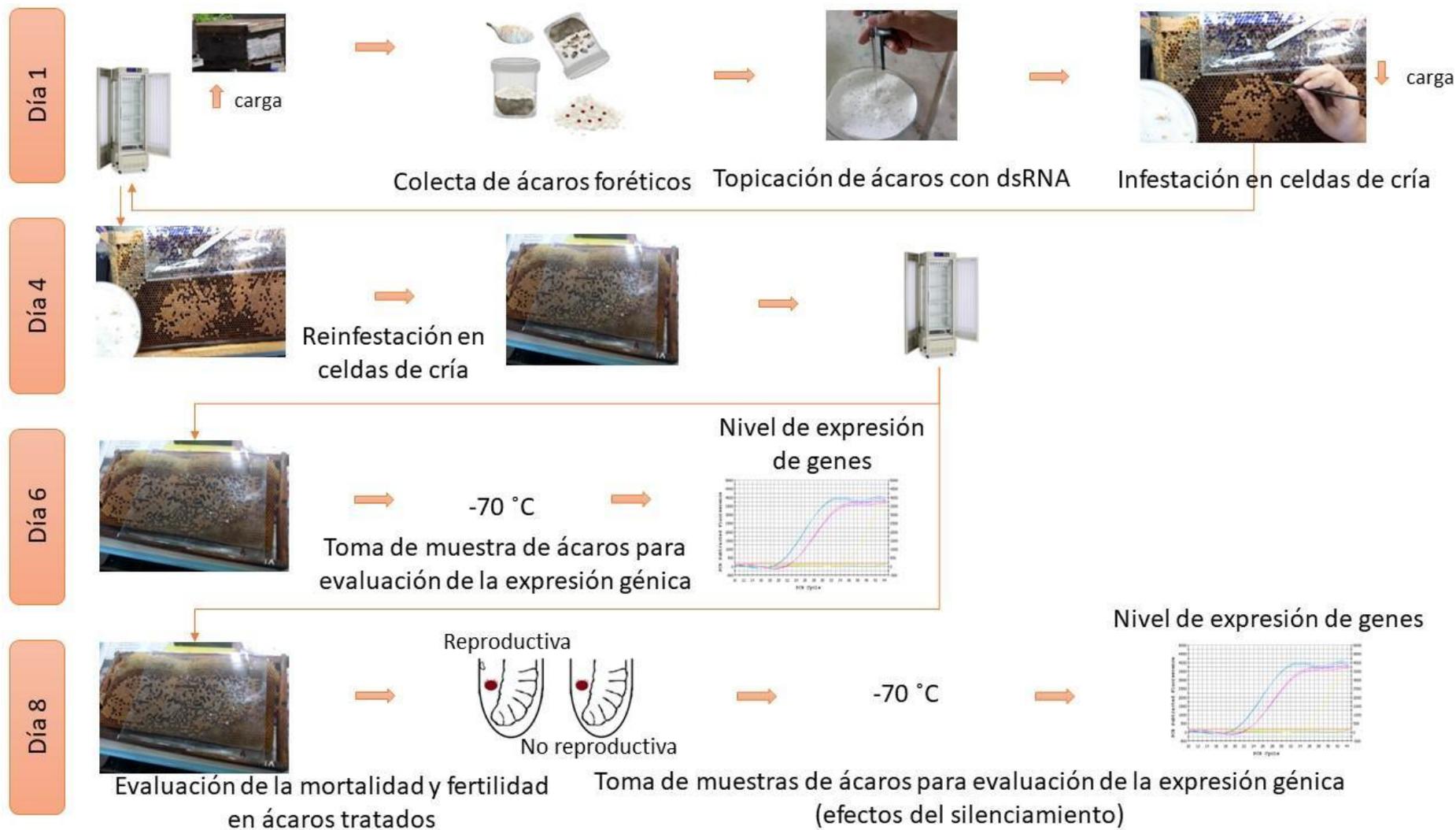
Nombre del gen	N° de Acceso	Nombre del cebador	Secuencia del cebador 5´-3´	Tamaño del amplicón (pb)	Ta(°C)
<i>protein patched homolog 1-like</i>	LOC111252634	ds-ptch1-F	TCAGCGTTTTGCTTGCAAGTC	346	60
		ds-ptch1-R	GCCGTGAAGGCTAGAACCAT		
<i>transcription factor AP-1-like</i>	LOC111243751	ds-ap-1-F	AGAGCCTTGCTCGTGACAAA	307	60
		ds-ap-1-R	GTCTGCATTTTGCCCCACAG		
<i>la-related protein 6-like</i>	LOC111245737	ds-larp6-F	TGTGTTTTCGGCTGCCATTG	288	60
		ds-larp6-R	TAGCGGATGAGCGGATACCT		
<i>endochitinase-like</i>	LOC111255436	ds-chisal-F	CCGTGCCGACAAAGAAAACC	274	60
		ds-chisal-R	TCATGCCCTGGGAAACAGTC		
<i>vitellogenin 1</i>	LOC111249970	ds-vg1-F	TTTACAAGTCGTTGAGGGCG	293	60
		ds-vg1-R	GAACCTGGTTCTGGAACAGGG		
<i>vitellogenin-6-like</i>	LOC111244790	ds-vg6-F	CGATAACGAGACGGTTT	294	58,4
		ds-vg6-R	CGTTCGGACACGACCTTAAT		

El dsRNA se sintetizó a partir de los fragmentos amplificados por PCR con las secuencias opuestas del promotor T7 mediante transcripción *in vitro* utilizando el kit MEGAscript T7 (ThermoFisher, Waltham, MA, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, los dsRNA se purificaron mediante extracción con el método de fenol/cloroformo seguida de precipitación con etanol, puesta a punto en nuestro laboratorio. Se usó acetona para disolver el dsARN y la concentración se ajustó a 2.5 µg/µL.

#### 4.2.3.2. Administración de dsRNA a ácaros en fase reproductiva

Para evaluar la funcionalidad de los genes candidatos se realizó un diseño experimental basado en la cría a semi-campo descrita en la sección 3.2.2. (Capítulo 3) (Figura 59). Se colectaron ácaros en estado forético de colonias con altas cargas parasitarias, mediante el método del azúcar impalpable (Dietemann et al., 2013) (Figura 58). Los ácaros recolectados se llevaron al laboratorio para su acondicionamiento, y se mantuvieron en cajas de petri con larvas de abejas como sustrato. Se topicó individualmente a cada ácaro con 1 µL de la mezcla de dsARN (dsARN+acetona) mediante el uso de una jeringa 50 µL (serie 7000) asociada a un dispensador (o pulsador) a repetición (modelo PB 6000)

marca Hamilton (en ingles PB 600 Hamilton push button repeating dispenser) (Figura 58). Cada ácaro recibió uno solo de los nueve tratamientos ensayados: control sin topicación, control del vehículo o solvente (acetona), control con dsGFP y dsARN de alguno de los 6 genes candidatos (*dsptch1*, *dsap-1*, *dslarp6*, *dschisal*, *dsvg6* y *dsvg1*).



**Figura 58.** Diseño experimental realizado para el ensayo de silenciamiento génico de los genes candidatos de *V. destructor* asociados a la reproducción.

Para cada tratamiento, se realizaron cinco réplicas biológicas de 30 ácaros cada una. Luego de la aplicación de los tratamientos, los ácaros fueron infestados artificialmente en celdas de cría (Figura 58) provenientes de cinco colonias diferentes previamente seleccionadas por su baja carga parasitaria. Los cuadros con las celdas de cría experimentales fueron conservados en una cámara con condiciones controladas de temperatura y humedad (35 °C y 60%, respectivamente) en oscuridad durante tres días para permitir que el dsARN pudiera tener su efecto. La elección de este tiempo se basó en la experiencia previa en ensayos de silenciamiento en insectos realizados en el laboratorio (Wulff et al., 2021).

Al día cuatro de aplicado el tratamiento y de realizada la infestación artificial, los ácaros fueron sacados de sus celdas y re-infestados en nuevos cuadros provenientes de las mismas cinco colonias de abejas (Figura 58). Los cuadros fueron colocados nuevamente en la cámara de cría bajo las mismas condiciones mencionadas. A los dos días de la re-infestación (sexto día de la aplicación de los tratamientos) se extrajo una submuestra de ácaros (tres réplicas biológicas de cuatro ácaros cada una) para verificar el efecto de los tratamientos sobre los niveles de expresión de los genes candidatos (Figura 58). A los cuatro días de la re-infestación (octavo día de la aplicación de los tratamientos) se revisaron todas las celdas registrando la presencia o ausencia de huevos (fertilidad) y la mortalidad de los ácaros. Los ácaros fueron separados en dos grupos de acuerdo a su estatus reproductivo (ácaros fértiles o reproductivos, y ácaros infértiles o no reproductivos). Todos los ácaros vivos muestreados fueron almacenados a -80 °C.

#### **4.2.3.3. Cuantificación de la expresión de los genes candidatos silenciados**

De acuerdo a lo descrito en la sección anterior, a los 6 y 8 días de iniciado el ensayo (administración del dsRNA o los tratamientos control), se tomaron muestras de ácaros para la evaluación de los niveles de expresión de los genes candidatos. Específicamente, se armaron de cinco a ocho grupos (réplicas biológicas, de cuatro ácaros cada una) por cada tratamiento y estado reproductivo (fértiles e infértiles). Se realizaron las extracciones de RNA de todas las muestras y se sintetizó el cDNA según la metodología descrita en la sección 3.2.3.1. (Capítulo 3). La cuantificación de la expresión mediante qPCR y el análisis estadístico se realizaron siguiendo la metodología ya descrita en la sección 3.2.3.3. (Capítulo 3). Además, siguiendo la metodología propuesta por Huang et al. (2017), se calculó la eficiencia del *knockdown* siguiendo esta ecuación:  $\{1 - [2^{-(CT \text{ gen de referencia} - CT \text{ target})}] / [2^{-(CT \text{ gen de referencia} - CT \text{ GFP})}]\} * 100$ . Para la amplificación por qPCR se utilizaron los cebadores indicados en la Tabla 8.

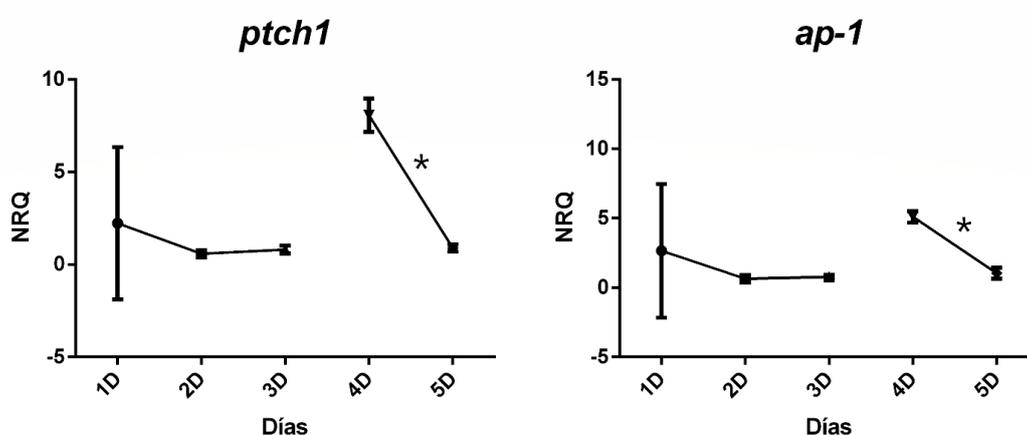
#### 4.2.3.4. Evaluación del efecto de los tratamientos

La mortalidad y la fertilidad de las hembras fundadoras se analizaron mediante el uso de un modelo lineal mixto general (GLMM) con una función binomial o de distribución y enlace logit (vivas vs. muertas, y reproductivas vs. no reproductivas) considerando el tratamiento (control, acetona, dsGFP, *dsptch1*, *dsap-1*, *dslarp6*, *dschisal*, *dsvg1* y *dsvg6*) como factores fijos y las colonias y los días de ensayo como factores aleatorios. Se realizaron múltiples comparaciones usando Fisher LSD ( $\alpha = 0.05$ ). En todos los casos se analizó la dispersión de los residuos. Los residuos aleatorios se analizaron con la prueba de Shapiro-Wilks. Para obtener la estructura de varianza más adecuada, se utilizó el criterio de información de Akaike. Todos los análisis se realizaron utilizando la función glmer en el paquete R "lme4" (Bates, 2015; R Core Team, 2017).

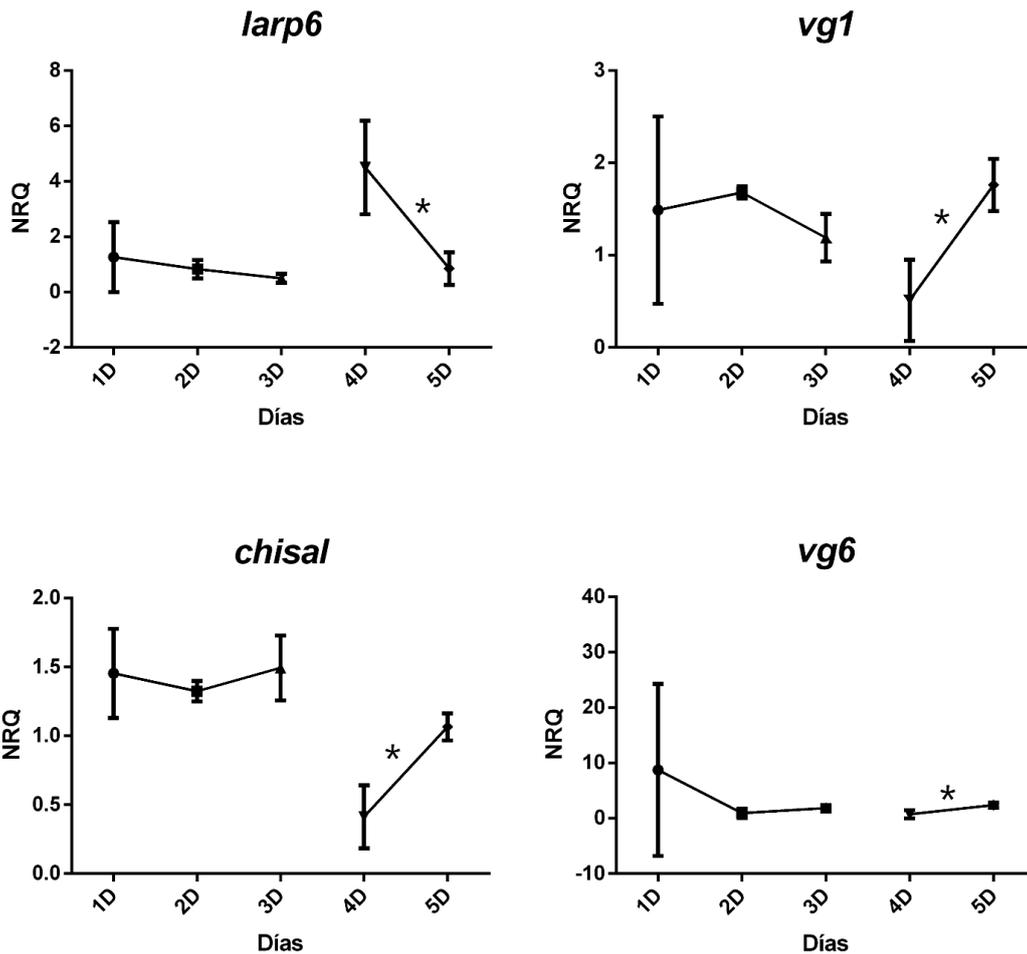
### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Patrones de expresión de los genes candidatos en *V. destructor* durante los primeros días dentro de la celda de cría

Los resultados de la dinámica de la expresión de los genes candidatos de *V. destructor* a lo largo de los 5 días posteriores a la infestación de los ácaros en las celdas de cría se muestran en la Figura 59. Se observa para todos los genes que los niveles de expresión se mantienen relativamente constantes entre los días 1 y 3 post-infestación. En efecto, no se detectaron diferencias significativas para ninguno de los genes durante estos primeros días dentro de las celdas de cría (Test de Kruskal-Wallis;  $P=0,3070$  (*ptch1*);  $P=0,2771$  (*ap-1*);  $P=0,3475$  (*larp6*);  $P=0,436$  (*chisal*);  $P=0,1139$  (*vg1*);  $P=0,4803$  (*vg6*)), a pesar de la variación observada específicamente en los niveles de expresión de *vg1* en este rango temporal (Figura 59). Contrariamente, todos los genes candidatos analizados mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los días cuatro y cinco, consistentemente con los resultados obtenidos en el Capítulo 3 (Test de Dunn;  $P<0,0001$  (*ptch1*);  $P=0,0007$  (*ap-1*);  $P=0,0030$  (*larp6*);  $P=0,0373$  (*chisal*);  $P=0,0297$  (*vg1*);  $P=0,0286$  (*vg6*)). Específicamente los genes *chisal*, *vg1* y *vg6* muestran un aumento de la expresión en el día cinco comparados con el día cuatro post-infestación, mientras que *ptch1*, *ap-1* y *larp6* muestran el patrón contrario: un descenso significativo de la expresión génica hacia el día cinco. En términos descriptivos, se puede observar que los niveles de expresión de los genes *ptch1*, *ap-1* y *larp6* son más altos en el día cuatro en comparación con los primeros días analizados (Figura 59).



**Figura 59.** Dinámica de la expresión de los genes candidatos de *V. destructor* asociados a la reproducción. Se grafica el valor de NRQ (*normalized relative quantity*) en función de los días de la entrada del ácaro a la celda de cría (infestación artificial).



**Figura 59.** (Continuación) Dinámica de la expresión de los genes candidatos de *V. destructor* asociados a la reproducción. Se grafica el valor de NRQ (*normalized relative quantity*) en función de los días de la entrada del ácaro a la celda de cría (infestación artificial).

#### 4.3.2. Silenciamiento de genes candidatos de *V. destructor*

##### 4.3.2.1. Efecto del silenciamiento sobre los niveles de expresión génica

Al día dos post-infestación, primer momento en que se evaluó el efecto del silenciamiento, la expresión de todos los genes candidatos en los ácaros sometidos a los tratamientos con los dsRNA (*dsptch1*, *dsap-1*, *dslarp6*, *dschisal*, *dsvg1* y *dsvg6*) mostró una disminución significativa respecto a los controles (control, acetona y dsGFP) (Figura 60). En efecto, la eficiencia promedio del *knockdown* fue de 95,15% para *dsptch1*, 89,52% para *dsap-1*, 95,46% para *dslarp6*, 97,38% para *dschisal*, 97,31% para *dsvg1* y 97,27% para *dsvg6* (Tabla Suplementaria 29). Más aún, la disminución en los niveles de expresión de todos los genes mencionados se mantuvo al día cuatro post-infestación, segundo momento del ensayo en que se evaluó la efectividad del silenciamiento (Figura 60). Dado que durante

la toma de muestras en este día fue posible distinguir las hembras fértiles de las infértiles, el análisis de la expresión génica se realizó individualmente para cada uno de estos dos grupos (Figura 60). La eficiencia promedio del *knockdown* fue del 83,95% para *dsptch1*, 98,07% para *dsap-1*, 98,23% para *dslarp6*, 94,50% para *dschisal*, 95,15% para *dsvg1* y 94,38% para *dsvg6* para ácaros fértiles y del 92,98% para *dsptch1* 92,05% para *dsap-1*, 91,72% para *dslarp6*, 97,41% para *dschisal*, 95,94% para *dsvg1* y 95,44% para *dsvg6* para ácaros infértiles (Tabla Suplementaria 29).

En líneas generales podemos observar que para todos los genes, excepto para *vg1*, hay una diferencia significativa en los niveles de expresión entre las hembras fértiles (reproductivas) y las infértiles (no reproductivas) al día cuatro post-infestación. Acorde a lo descrito para la dinámica de expresión de los genes *ptch1*, *ap-1* y *larp6*, los cuales evidencian una mayor expresión en el cuarto día de la fase reproductiva (Figura 60), se observó que estos genes muestran un mayor nivel de expresión en las hembras reproductivas en comparación con las no reproductivas. Estos resultados evidencian lo relevante que es una alta expresión de estos genes en este momento del ciclo reproductivo de *V. destructor* para una efectiva reproducción del ácaro dentro de la celda de cría. Excepto para *vg1*, el nivel de expresión de los genes analizados no muestra diferencias significativas entre los días seis y ocho (para los ácaros no reproductivos) luego de la aplicación de los tratamientos.

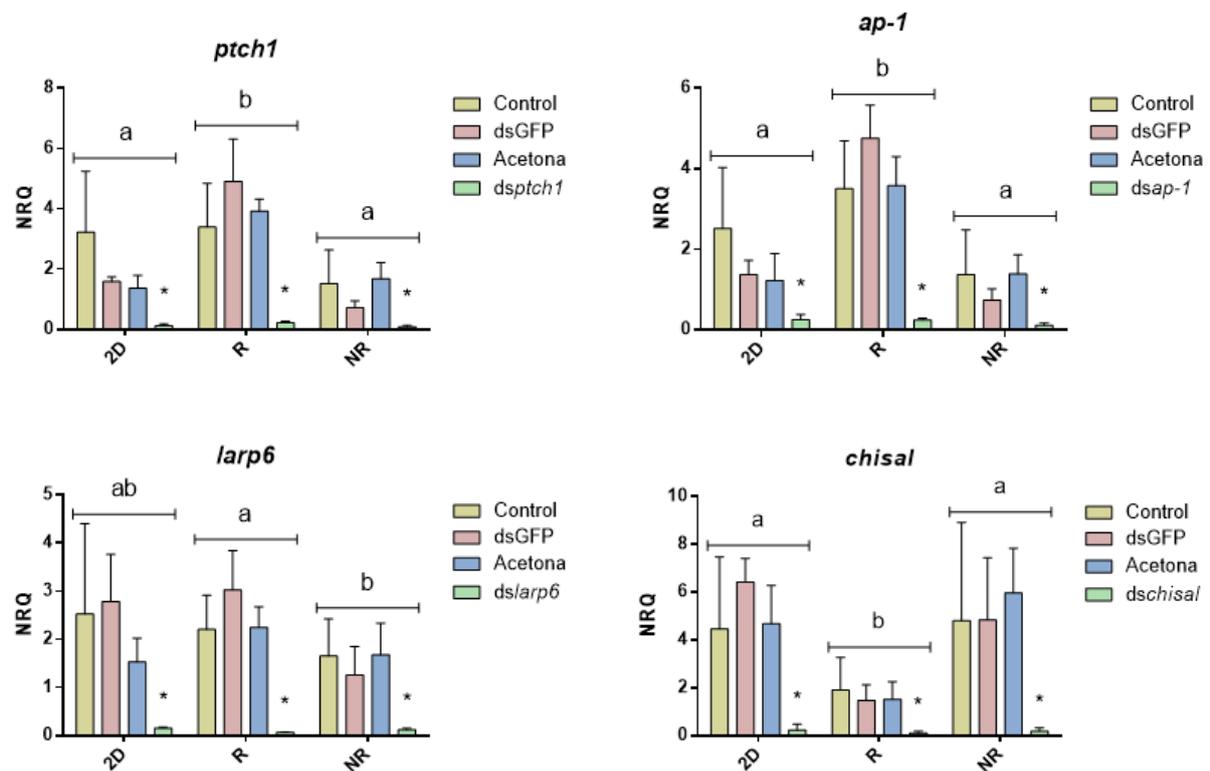
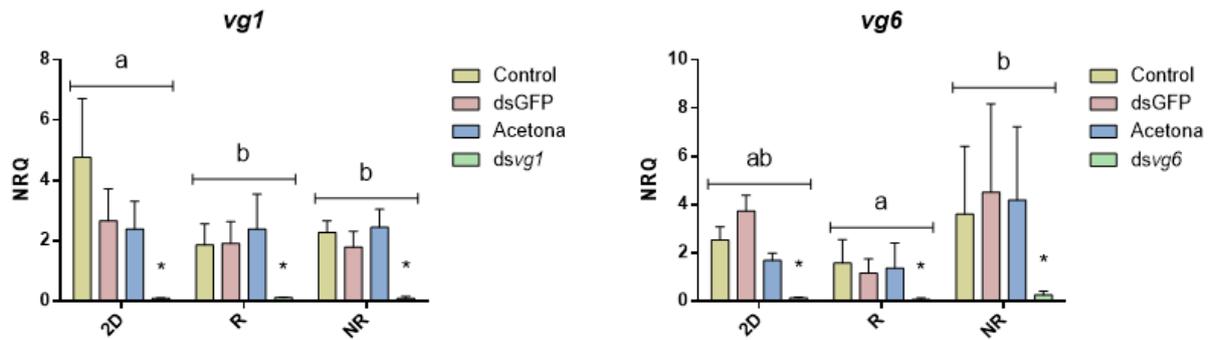


Figura 60. Niveles de expresión de los genes candidatos de *V. destructor* asociados a la reproducción.

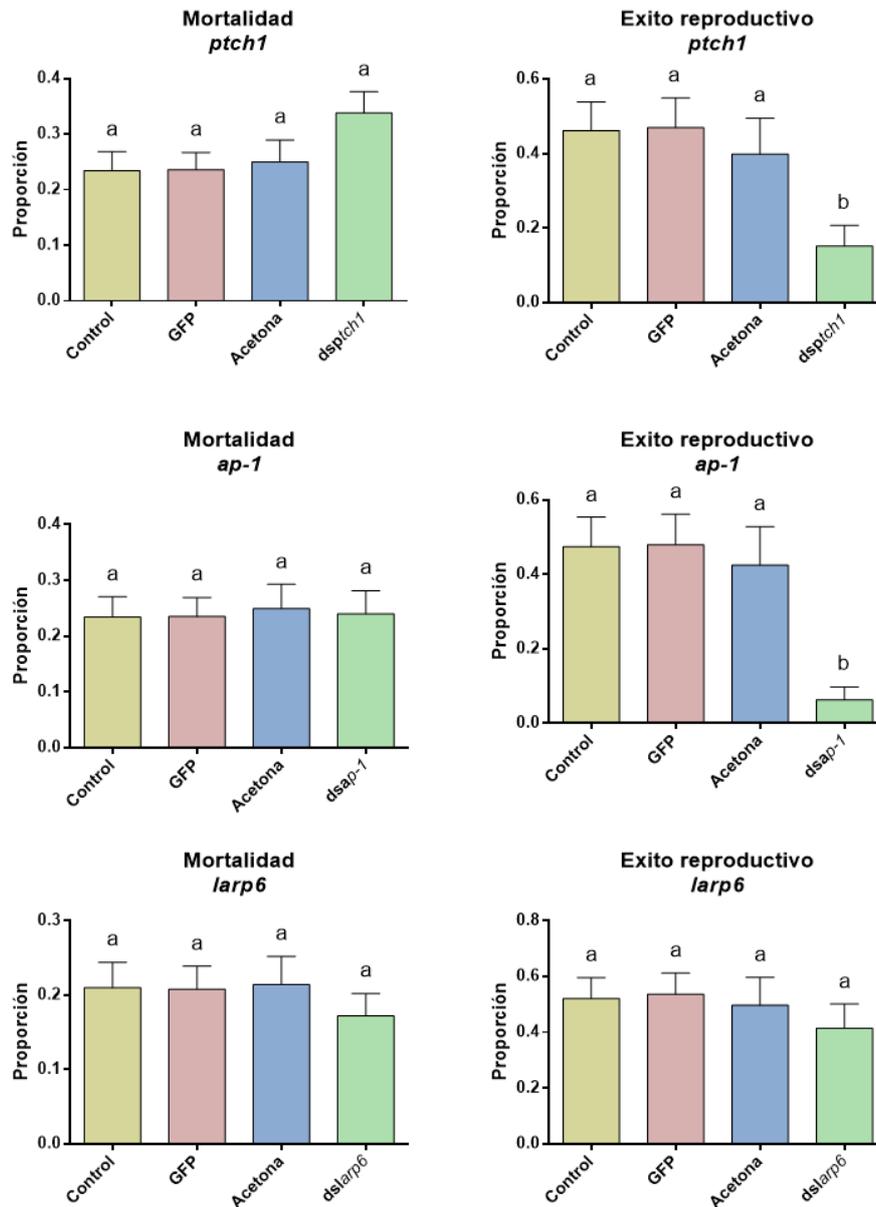


**Figura 60.** (Continuación) Niveles de expresión de los genes candidatos de *V. destructor* asociados a la reproducción. Se grafica el valor de NRQ (*normalized relative quantity*) de los tratamientos ensayados: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación), GFP (control dsGFP) y dsRNA específicos para cada gen. Se muestran los resultados de expresión génica en ácaros a los dos días (2D) post-infestación (día seis de la aplicación de los tratamientos) y a los cuatro días (4D) post-infestación (día ocho de la aplicación de los tratamientos). R: hembras fértiles al día cuatro post-infestación; NR: hembras infértiles al día cuatro post-infestación. Genes: *ptch1*, *ap-1*, *larp6*, *chisal*, *vg1* y *vg6*. Letras diferentes indican diferencias entre los grupos comparados (2D, 4D: R, 4D:NR) y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada grupo.

#### 4.3.2.2. Efecto del silenciamiento génico sobre la mortalidad y fertilidad de los ácaros

La mortalidad de los ácaros dentro de las celdas de cría no difirió entre los tratamientos ensayados para ninguno de los genes (resultados GLMM;  $P=0,05825$  (*ptch1*);  $P=0,98544$  (*ap-1*);  $P=0,6857$  (*larp6*);  $P=0,98372$  (*vg1*);  $P=0,9485$  (*vg6*)), excepto cuando se administró el dsRNA del gen *dschisal* (resultados GLM;  $P=0,01339$ ). El silenciamiento de dicho gen aumentó significativamente la supervivencia de los ácaros respecto a los tratamientos control y dsGFP (Figura 61) (Tabla Suplementaria 30, 31, 32, 33, 34 y 35).

Se evidenciaron diferencias significativas en la fertilidad de los ácaros que fueron tratados con dsRNA de los genes *ptch1*, *ap-1* y *vg1* en comparación con los ácaros control (resultados GLMM;  $P=0,001169$  (*ptch1*);  $P=2,661e-07$  (*ap-1*);  $P=0,70960$  (*larp6*);  $P=0,30371$  (*chisal*);  $P=0,002086$  (*vg1*);  $P=0,9629$  (*vg6*)) (Figura 60). Producto del silenciamiento de estos 3 genes, se observaron disminuciones de 79,14% (*ptch1*), 92,54% (*ap-1*) y 77,79% (*vg1*) en la probabilidad de que una hembra tratada sea fértil. Así, la disminución de la expresión de estos 3 genes compromete significativamente el éxito reproductivo de *V. destructor*, apoyando el rol central que éstos tendrían dentro de la maquinaria reproductiva del ácaro (Tablas Suplementarias 36, 37, 38, 39, 40 y 41).



**Figura 61.** Mortalidad y éxito reproductivo de *V. destructor* frente a los tratamientos ensayados: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación), GFP (control dsGFP) y dsRNA específicos para cada gen. Se muestran para cada tratamiento la proporción de ácaros muertos (columna de la izquierda) y de ácaros reproductivos (fértiles) al día cuatro post-infestación (día ocho de la aplicación de los tratamientos). Genes: *ptch1*, *ap-1*, *larp6*, *chisal*, *vg1* y *vg6*. Letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos de acuerdo a los resultados de GLMM.

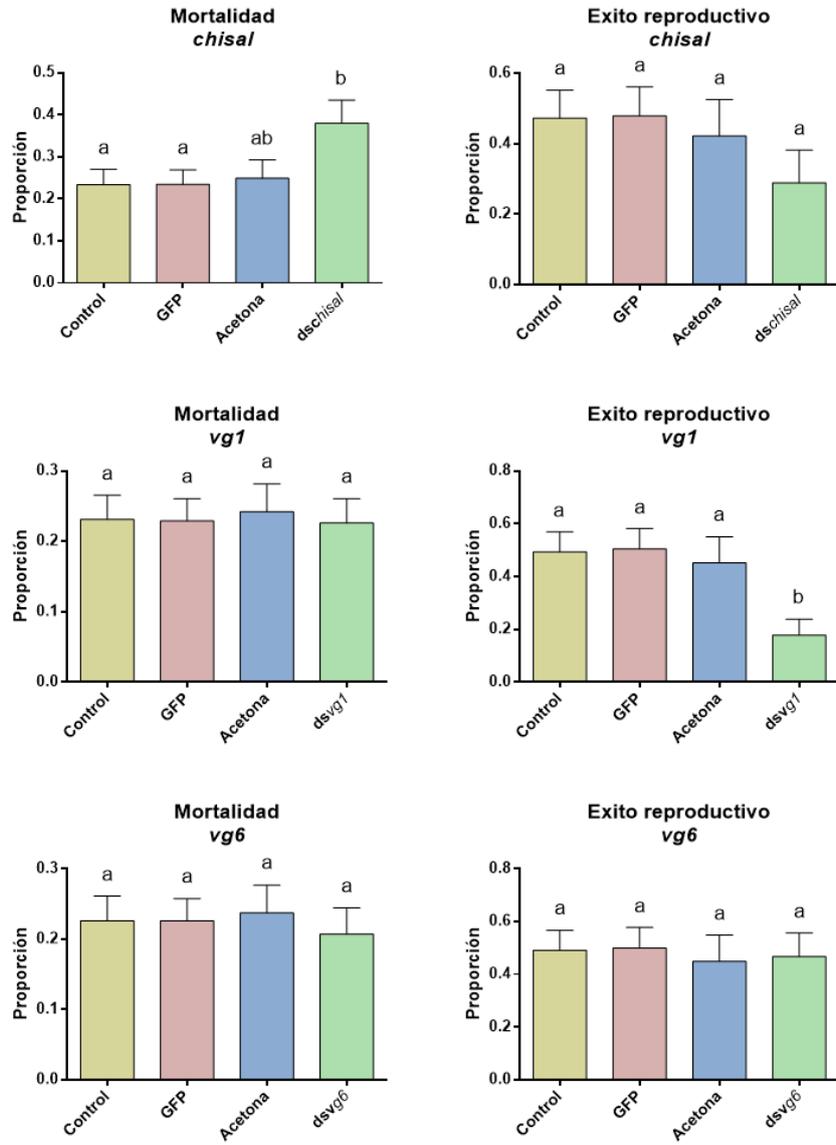


Figura 61. Continuación

#### 4.4. DISCUSIÓN

En este capítulo, se presentaron los resultados obtenidos del ensayo de silenciamiento génico para *V. destructor* mediado por siRNA. Los mismos demuestran que el uso de la estrategia de silenciamiento en conjunto con la forma de administración del dsRNA aplicada fueron exitosas en inhibir específicamente la transcripción de los genes candidatos seleccionados. En particular, se evaluó el efecto del silenciamiento de dos genes candidatos a estar vinculados a la maduración del ovocito, específicamente a la vitelogénesis (*vg1* y *vg6*) (Cabrera et al., 2013a) y de cuatro genes candidatos a participar de las vías metabólicas relacionadas con la maduración del embrión, la segmentación y desarrollo embrionario (*ptch1*, *ap-1*, *larp6* y *chisal*), sobre la fertilidad y la mortalidad de los ácaros. Los resultados generados permiten iniciar la caracterización funcional de estos genes y reforzar su estatus como candidatos asociados al éxito reproductivo de *V. destructor*.

##### 4.4.1. Consideraciones sobre el método de administración del dsRNA

El silenciamiento génico mediado por siRNA aquí aplicado representa una estrategia desarrollada con éxito en estudios previos en *V. destructor* (Campbell et al., 2010; 2016; Garbian et al., 2012; Singh et al., 2016; Huang et al., 2017; Vlogiannitis et al., 2021; Muntaabski et al., 2022). Sin embargo, la forma de administración (mediante topicación externa) y el solvente usado como vehículo del dsRNA (acetona), desarrollados en el presente ensayo, resultan completamente nuevos para *V. destructor*. Nuestros resultados evidencian que esta estrategia de administración, probada con éxito en otros artrópodos (Pridgeon et al., 2008a; Puglise et al., 2016), resulta también efectiva en esta especie de ácaro. Mediante esta estrategia, se puede disminuir la alta mortalidad en los ácaros observada cuando el dsRNA es entregado por inyección (Campbell et al., 2010; Huang et al., 2017) o inmersión (Campbell et al., 2010; 2016; Singh et al., 2016; Vlogiannitis et al., 2021). El método de inyección, en particular, es laborioso y lento, y no es posible aplicarlo a un número elevado de individuos, como es el caso del presente ensayo. El método de inmersión, por su parte, si bien fue el más utilizado en estudios previos en *V. destructor* y ha mostrado altos niveles de efectividad, requiere de concentraciones y volúmenes de dsRNA muy elevadas para lograr un efecto significativo de silenciamiento, haciéndolo inviable desde el punto de vista económico en ensayos de gran magnitud. En relación al método de administración oral, podemos afirmar que, de acuerdo a estudios previos, se trata de una estrategia eficiente para obtener un efecto sistémico de silenciamiento, y permite trabajar con un número relativamente elevado de ácaros (Garbian et al., 2012; Muntaabski et al., 2022). Sin embargo, constituye un método laborioso que requiere de la evaluación de distintas dosis que puedan alcanzar de forma efectiva el ácaro con el previo pasaje por la abeja (Garbian et al., 2012; Muntaabski et al., 2022). El método de administración por topicación aquí aplicado resulta altamente efectivo ya que

logra reducir significativamente los niveles de expresión de los genes diana con bajas concentraciones de dsRNA y sin causar la mortalidad de los ácaros ni interferir en su reproducción. Esto es evidente en la no detección de diferencias significativas en la mortalidad ni fertilidad de los ácaros sometidos a los tratamientos control y acetona. Por otro lado, este método de administración resulta de fácil aplicación y permite evaluar el efecto fenotípico del silenciamiento en un entorno natural como es la celda de cría de la abeja, donde se desarrolla la fase reproductiva del ácaro. En este sentido, nuestros resultados arrojan un método alternativo de administración del dsRNA para el desarrollo de ensayos de silenciamiento en *V. destructor*, que justifican su inclusión como métodos estandarizados de investigación en la especie, principalmente aquellos que involucran el estudio de la interacción ácaro-abeja.

#### **4.4.2. Efecto del silenciamiento génico en los ácaros en fase reproductiva**

Los resultados sobre el efecto de los tratamientos con dsRNA mostraron un descenso significativo de la expresión de cada uno de los seis genes *target* estudiados, tanto a los seis como a los ocho días de aplicado el tratamiento de dsRNA, indicando que el silenciamiento de los genes fue exitoso y se mantuvo a lo largo del experimento. El efecto prolongado del silenciamiento también se observó en un estudio sobre el crustáceo *Macrobrachium nipponense* (Zhang et al., 2013), que demostró que la eficiencia del ARNi podía mantenerse durante más de 7 días. A diferencia de otros experimentos de silenciamiento génico realizados en *V. destructor*, nuestros resultados muestran que para la ventana temporal de los 6 a los 8 días de aplicado el tratamiento con dsRNA (2 y 4 días post-infestación en las celdas de cría de abejas), no hay diferencias en los niveles de silenciamiento logrados (excepto para *vg1*, en donde el efecto del silenciamiento parece aumentar hacia el día 8). En el caso del estudio realizado por Huang et al. (2017), la reducción de la expresión génica fue significativamente mayor a las 72 que a las 24 horas de aplicado el tratamiento de silenciamiento. Si bien en ambos estudios los genes blanco silenciados y las metodologías de administración fueron diferentes, en conjunto, los resultados obtenidos permiten sugerir que los tratamientos de RNAi aplicados en este trabajo de Tesis tuvieron un efecto significativo en la reducción de la expresión de los genes blanco desde la infestación artificial de los ácaros dentro de las celdas de cría hasta el final del ensayo. En relación a la eficiencia del ensayo, los resultados indican un nivel de silenciamiento (85-99%) comparable con el de otros estudios, los cuales aplicaron otras metodologías de administración. Por ejemplo, la eficiencia de *knockdown* de los genes *target* fue de 62 a 84% en Campbell et al. (2010), de 55 a 85% en Campbell et al. (2016) y de 70 a 90% en Huang et al. (2017). Además, nuestros resultados indican que ni la técnica ni los tratamientos control tuvieron un efecto en la expresión de los genes *target* ni en la supervivencia o fertilidad de los ácaros, sugiriendo una buena elección de los controles y del método

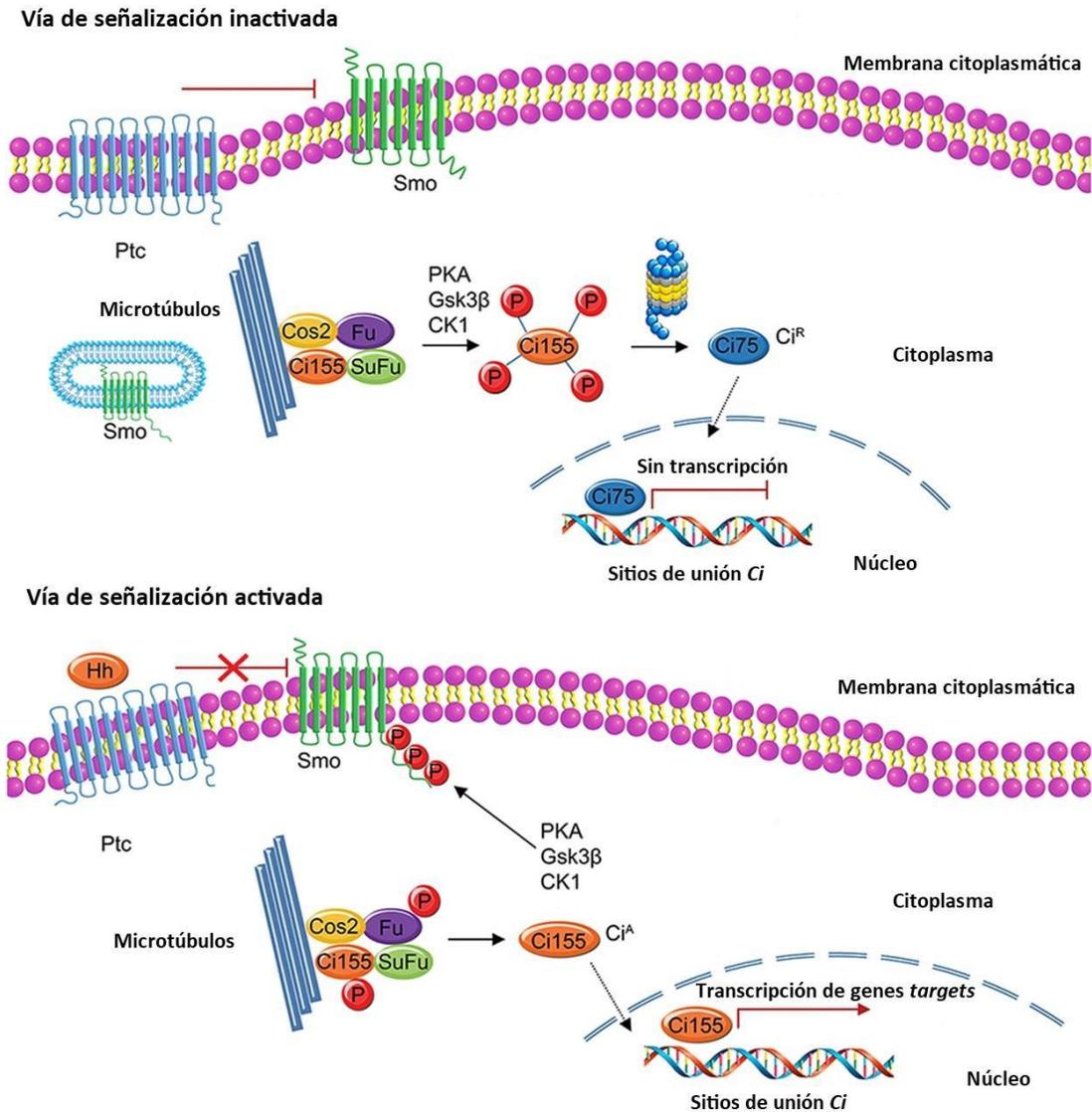
de introducción del dsRNA y una alta especificidad de la técnica en lograr un silenciamiento gen-específico.

Como principales hallazgos de este ensayo, evidenciamos el efecto fenotípico del silenciamiento génico sobre las características asociadas al *fitness* evaluadas en el ácaro. En particular, se detectó que el silenciamiento de los genes *ptch1*, *ap-1* y *vg1* tiene un impacto significativo en la fertilidad de *V. destructor*. El descenso observado en la fertilidad de los ácaros pone de manifiesto una asociación entre la expresión de estos genes y la maquinaria reproductiva de *V. destructor*, y que la supresión de su expresión compromete el éxito reproductivo del ácaro dentro de la celda de cría de la abeja. Si bien el silenciamiento de los otros genes evaluados no afectó la fertilidad, sabemos que su expresión difiere entre ácaros reproductivos y no reproductivos (resultados del Capítulo 3), y por lo tanto, siguen considerándose parte de las rutas moleculares que definen el estatus reproductivo de *V. destructor*. Como perspectiva, es necesario profundizar en este tipo de estudios que incluyan el silenciamiento conjunto de alguno de estos genes, continuar con la caracterización funcional de los mismos, y particularmente, descifrar cuál es su rol específico en la reproducción del ácaro y las potenciales interacciones que mantienen con el resto de los genes involucrados.

El efecto que tuvo el silenciamiento del gen *vg1* sobre la fertilidad es consistente con estudios previos y refuerza el rol clave que tiene este gen en el inicio y avance de la reproducción exitosa de *V. destructor*. La vitelogénesis es un proceso crítico en la maduración del ovocito y se ha demostrado que la expresión temprana del gen *vg1* en la fase reproductiva del ácaro es fundamental para un correcto inicio de la vitelogénesis (Cabrera et al., 2013a). Asimismo, estudios previos evidenciaron que sin los niveles adecuados de vitelogenina, los huevos de *V. destructor* quedan en un estado previtelogénico que no les permite madurar (Garrido & Rosenkranz, 2003; Cabrera et al., 2013). Es importante considerar que la sincronización entre el ciclo de vida de *V. destructor* y el desarrollo de su hospedador, *A. mellifera*, es tan fina que cualquier desfase de tiempos, conlleva a una reproducción anormal del parásito (Steiner et al., 1994; Garrido & Rosenkranz, 2003). Se sabe, incluso, que hay una señal de interrupción a las 48 horas post-operculado que inhibe cualquier evento reproductivo que implique una descendencia no viable del ácaro (Frey et al., 2013). Para que la cascada de genes que activa *vg1* en el ácaro sea exitosa, son necesarios los estímulos olfativos de la celda de cría y la alimentación de una larva L5 de abeja que esté por empupar. Sin estos estímulos, la cascada de los genes *Halloween* no se inicia y por consiguiente la expresión de *vg1* queda truncada (Cabrera et al 2013a; 2015). Nosotros sugerimos que al silenciar la expresión de *vg1* tempranamente (previo a la entrada del ácaro a la celda de cría), una alta proporción de las hembras fundadoras habría sufrido un arresto de sus huevos en un estado previtelogénico y de esta manera, truncado el inicio de la oviposición.

Aunque hay poca información disponible sobre los genes asociados con la ovogénesis (Cabrera et al., 2013a) y la embriogénesis en *V. destructor*, los aspectos citológicos de estos procesos se han estudiado en detalle (Steiner & Diehl, 1994; Steiner et al., 1994; 1995; Steiner, 1995). Steiner et al. (1994) describieron el desarrollo del óvulo dentro de la hembra fundadora, que involucra dos etapas: (1) una ovogénesis con previtelogénesis, vitelogénesis y formación de la cáscara del huevo, y (2) una embriogénesis intraovárica con escisión, segmentación y diferenciación de extremidades. Este estudio pionero demostró que parte del proceso de embriogénesis tiene lugar dentro de la hembra fundadora. Considerando esto y nuestros resultados, podemos especular que el silenciamiento de los genes candidatos a estar involucrados en la regulación del desarrollo embrionario, podría producir un aborto temprano del embrión en desarrollo. En este sentido, nuestros resultados representan la primera evidencia de expresión de genes potencialmente vinculados a la embriogénesis intraovárica descrita para esta especie.

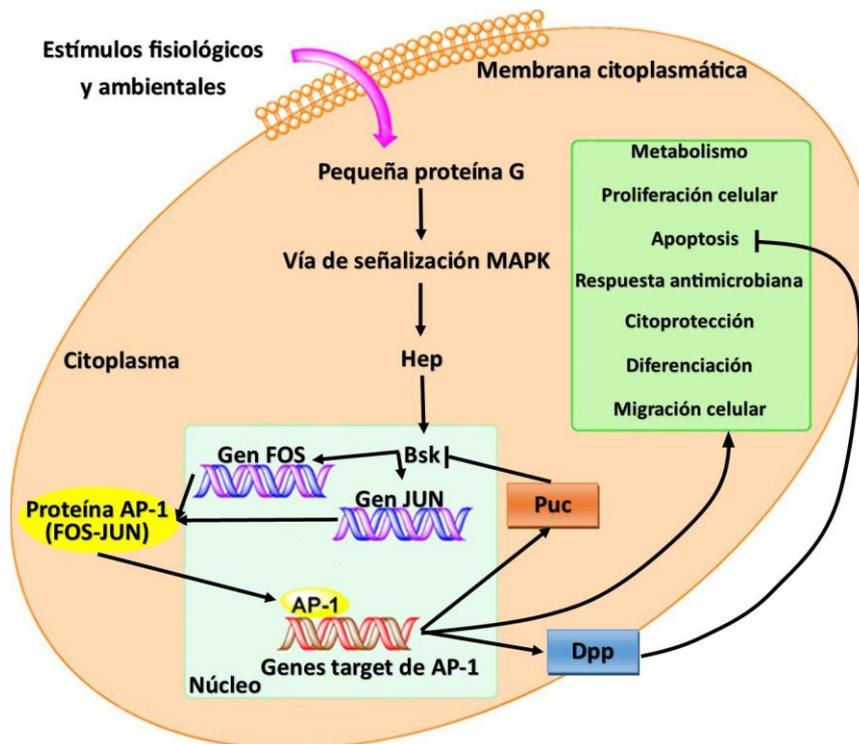
A diferencia de lo esperado para el gen de *vg1*, hasta el momento se desconocía el rol que podrían tener los genes *ptch1* y *ap-1* en la reproducción de *V. destructor*. Estos genes, cuyo silenciamiento provocó una disminución de la fertilidad de los ácaros tratados, parecen jugar un rol clave en el éxito reproductivo de *V. destructor*. Según antecedentes previos en organismos modelo, los productos de estos dos genes estarían vinculados a vías de señalización a nivel celular relacionadas entre sí. Por un lado, se ha descrito en *Drosophila* que el receptor intermembrana PTCH1 está involucrado en la regulación de la vía de señalización Hedgehog (Hh) y modula su inhibición (Akiyama-Oda & Oda, 2020) (Figura 62). Esta vía de señalización ha sido descrita como íntimamente relacionada con el crecimiento y la diferenciación celular, con funciones en la formación de patrones embrionarios y la homeostasis del tejido adulto (Lum & Beachy, 2004; Barnett & Thomas, 2018). Además, un producto de esta vía de señalización es *wg*, una proteína que activa la vía de señalización WNT, involucrada entre otras funciones, en la segmentación embrionaria. Por otro lado, AP-1 está descrito como un factor de transcripción que constituye el producto final de varias vías de señalización, entre ellas, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Figura 63). Los antecedentes en *Drosophila* muestran que la familia de las JNK juega un papel importante en programas celulares complejos tales como la proliferación, diferenciación y desarrollo, y la apoptosis (Kim & Ausubel, 2005; Yamamoto et al., 2008; Tong & Feng, 2018). En los artrópodos, estas dos vías de señalización (Hh y JNK) están íntimamente relacionadas con el desarrollo embrionario, concretamente con la segmentación del embrión (Kockel et al., 2001; Akiyama-Oda & Oda, 2020) y están interconectadas con la vía de señalización WNT, otra de las vías clave implicadas en la segmentación antero-posterior de los artrópodos (Clark et al., 2019).



**Figura 62.** Representación esquemática de la vía de señalización Hedgehog (Hh) en *Drosophila*. Los componentes centrales de la ruta de Hh en esta especie incluyen los ligandos de Hh; los receptores transmembrana Patched (Ptc) y Smoothened (Smo), y el factor de transcripción *Cubitus interruptus* (Ci). Arriba: Se muestra la vía de señalización inactiva en ausencia de un ligando de Hh. Smo es reprimida por Ptc. Los genes diana de la vía de señalización de Hh no se transcriben ni se expresan en esta condición. Abajo: Se muestra la vía de señalización activa. En presencia del ligando Hh, éste se une a Ptc y se desactiva la represión de Smo. El complejo de proteínas citoplasmáticas (como Su, SuFu y Cos2) se activa y el factor de transcripción Ci se transloca al núcleo, lo que lleva a la transcripción de los genes diana. Figura tomada de Yao et al. (2018).

Además de lo antes expuesto, se ha descrito que la vía JNK participa en la activación de la función apoptótica de AP-1 (Kim et al., 2005; Ye et al., 2014) (Figura 62) y a su vez Dpp, uno de los productos de la vía de señalización Hh, inhibe la vía JNK en *D. melanogaster* (Kockel et al., 2001; Ågren et al., 2004). A partir de estos antecedentes, podemos especular que el silenciamiento de *ptch1* y *ap-1* en *V.*

*destructor* pudo haber modificado el funcionamiento de estas dos vías de señalización, posiblemente desencadenando una apoptosis celular que podría conducir a un retraso temporal o a la inhibición de la postura de huevos por parte la hembra fundadora. En efecto, nuestros resultados sobre la dinámica de expresión a través del tiempo de estos dos genes candidatos, muestran un pico de expresión al cuarto día de la entrada del ácaro a la celda, indicando que la anulación de tal pico interfiere negativamente en la reproducción del ácaro.



**Figura 63.** Representación esquemática de la vía *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) en *Drosophila*. Esta vía se activa a través de numerosos estímulos fisiológicos y ambientales. Regula y promueve numerosos procesos fisiológicos clave que incluyen el metabolismo de cuerpos grasos, la proliferación celular, el control de la apoptosis, la respuesta antimicrobiana y la diferenciación celular. AP-1 regula positivamente la expresión de las enzimas Puckered (Puc), que a su vez regula negativamente la expresión de *ap-1*, y Decapentaplegic (Dpp), la cual inhibe la apoptosis. Figura tomada y modificada de Ye et al. (2014).

# Discusión general y perspectivas

Esta tesis está enfocada en el estudio de la interacción entre la abeja de la miel, *Apis mellifera* y el ácaro ectoparásito, *Varroa destructor*. El abordaje propuesto y el diseño experimental utilizado permitieron obtener resultados originales para ampliar en gran medida la información de cada una de las especies involucradas y, asimismo, contribuyeron a mejorar nuestro conocimiento sobre las complejas relaciones entre estas dos especies, cuyos comportamientos y fisiología son altamente dependientes de las condiciones externas y cuyos ciclos de vida se hallan estrechamente sincronizados. En particular, y orientados por los numerosos antecedentes en abejas, abocamos nuestros esfuerzos en construir nuestro sistema de estudio a partir de una caracterización inicial de los materiales apícolas disponibles, para posteriormente profundizar en aspectos fisiológicos y moleculares de los mecanismos reproductivos del ácaro, del cual existe escasa y particionada información.

En los siguientes párrafos se complementará la información vertida en cada uno de los capítulos, realizando una revisión integradora de los principales productos obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral y sus perspectivas a futuro.

### ***Apis mellifera***

Existe una extensa bibliografía sobre la caracterización de colonias de *A. mellifera* considerando diferentes aspectos de su biología en general, y su comportamiento, genética y genómica, en particular. Su introducción al continente americano, dirigida por la necesidad de desarrollar la actividad apícola fundamentalmente orientada a la producción de miel, también ha sido extensamente estudiada. Las subespecies *A. m. ligustica* y *A. m. carnica* (en mayor y menor medida, respectivamente) han constituido la base de la genética de esta especie en nuestro país, con una importante introgresión de material africanizado proveniente principalmente de Brasil. En esta Tesis abordamos la caracterización de colonias de abejas establecidas y adaptadas a clima templado. Dicha caracterización se realizó en la ecoregión mayormente explotada para la producción apícola en nuestro país, en donde se concentra la mayor cantidad de colmenas comerciales del territorio. Los resultados tanto de su comportamiento y dinámica poblacional, como sus aspectos genéticos, fueron acordes a lo esperado para esta latitud (Giacobino, 2015; Merke, 2016; Agra et al., 2018; Visintini et al., 2021). Respecto a su relación con *V. destructor*, las mencionadas colonias mostraron ser homogéneas en su respuesta a la parasitosis. Estas características las destacan como un material deseable para las investigaciones sobre la interacción con *V. destructor* a partir de los objetivos propuestos en este trabajo.

## ***Varroa destructor***

El ácaro *V. destructor* ha sido objeto de numerosas investigaciones desde la década de 1980, tras su introducción en las poblaciones de *A. mellifera* de Europa (Oldroyd, 1999). A pesar de la extensa literatura sobre el ácaro (ver Rosenkranz et al., 2010; Sammataro et al., 2000; Roth et al., 2020), la genética, fisiología y comportamiento reproductivo sobre su hospedador siguen siendo parcialmente desconocidos. El planteo técnicamente diverso y conceptualmente holístico de los experimentos presentados en esta Tesis, ha permitido en primer lugar, caracterizar la dinámica poblacional y reproductiva del parásito asociado a las colonias de abejas establecidas en un ambiente de clima templado. Estos estudios mostraron que la población y el comportamiento reproductivo del ácaro tienen una dinámica similar entre las colonias y acorde a la estacionalidad. Tales características de homogeneidad permitieron disponer de la cantidad de material vivo necesario para la realización de los ensayos en laboratorio o semi-campo en condiciones mejor controladas, y asimismo, mantener la reproducibilidad de los resultados producidos.

A partir del desarrollo y la aplicación de varios marcadores del ADNmt en *V. destructor*, se logró analizar por primera vez la variabilidad genética presente en poblaciones del ácaro distribuidas en diferentes regiones geográficas de nuestro país. La presencia de heteroplasmia de sitio y la identificación de un nuevo subhaplotipo mitocondrial en las poblaciones argentinas de *V. destructor*, a partir del análisis de una región previamente inexplorada en el ácaro (marcador ND4), nos permitieron conocer mejor la genética de este parásito y así centrarnos en el estudio de su comportamiento reproductivo a nivel genómico. Los resultados, que evidencian una baja variabilidad genética del ácaro, son consistentes con el hecho de que *A. mellifera* es una especie introducida, y con ésto, que sus patógenos representan, en términos de variabilidad genética, una submuestra de toda la diversidad conocida para la especie. Por otro lado, se sabe que existe diversidad ecológica en las poblaciones de *V. destructor* dentro de las colonias de abejas (revisado en Vilarem et al., 2021), por ejemplo, ciertas características morfológicas del ácaro varían de invierno a verano y parecen estar asociadas a la adaptación a cada estación (Akimov et al., 2004; Yevstafieva et al., 2020). Además, la presencia de virus vectorizados por *V. destructor* agrega otra dimensión de variación, ya que el ácaro puede estar libre de virus, tener una replicación viral activa o solo actuar como reservorio de virus. Esta variación fenotípica podría estar asociada a diferencias genéticas entre ácaros dentro de una misma colonia o de distintas colonias. En este sentido, el estudio de parámetros morfológicos, de comportamiento reproductivo, de resistencia a acaricidas y de virulencia de cada uno de los dos subhaplotipos del ácaro identificados en esta Tesis, constituye un reto a futuro de fundamental importancia para la toma de decisiones de manejo de las poblaciones de *V. destructor* en colmenas

comerciales de abejas. Además, los resultados aquí obtenidos exigen un seguimiento exhaustivo de la distribución de las variantes genéticas detectadas, su estabilidad temporal en las colonias de abejas melíferas y su posible influencia en la apicultura en distintas regiones de nuestro país.

### **Interacción *A. mellifera*: *V. destructor***

Desde su salto de hospedador de la abeja melífera asiática (*A. cerana*) a la europea (*A. mellifera*), el ácaro ectoparásito *V. destructor* se ha convertido en un problema devastador para la apicultura en todo el mundo. Debido a una corta historia de coevolución, la relación huésped-parásito entre *A. mellifera* y *V. destructor* no ha alcanzado un equilibrio. Por un lado, las abejas sufren de los efectos negativos de la infestación a nivel individual, colonia y población. Por otro lado, las poblaciones del ácaro fluctúan en colonias de abejas tolerantes o resistentes que generan una presión de selección para la evolución de las poblaciones del parásito.

Identificar los factores clave en las relaciones huésped-parásito en condiciones de laboratorio y poder trasladar estas conclusiones al campo es un propósito complejo y laborioso. Este es especialmente el caso de los estudios sobre especies eusociales con una dinámica completamente diferente a nivel de grupo (Lihoreau et al., 2019). Si bien no existe un método sistematizado para extrapolar los resultados de laboratorio al campo, se han propuesto enfoques holísticos de varios pasos, que incluyan a la vez una retroalimentación entre éstos. Recientemente, Vilarem et al. (2021) propuso un enfoque de este tipo que involucra cuatro pasos: (1) investigación y análisis *in silico* (modelización), (2) desarrollo de ensayos *in vitro*, (3) realización de ensayos a semi-campo, (4) pruebas a campo y vuelta a la modelización a partir de la generación de estos nuevos resultados, enriqueciendo los ya modelados. Un punto crítico para establecer los experimentos de laboratorio es encontrar un equilibrio entre estar cerca de las condiciones naturales con conclusiones complejas pero relevantes y reducir la complejidad natural para tratar de interpretar mejor los parámetros de interés. Para ahondar en esa dirección, las herramientas técnicas precisas para estudiar la relación entre el parásito y el huésped, son fundamentales y a veces todavía deficientes. En el caso del sistema bajo estudio, y dada la biología de *A. mellifera* y su parásito *V. destructor*, los métodos desarrollados en esta Tesis conservaron un alto porcentaje de ensayos en ambientes naturales a campo y semicampo además de incluir análisis *in silico* y de laboratorio.

Los experimentos sobre el análisis de expresión de genes en ácaros reproductivos, no reproductivos y foréticos, permitieron comenzar a explorar las vías metabólicas posiblemente implicadas en la reproducción del ácaro, en un momento clave de la parasitación de la cría de *A. mellifera*, el cuarto día luego del operculado de la celda. Hasta el momento, solo se disponía de información parcial sobre

la expresión de genes particulares asociados a la reproducción del ácaro (Cabrera et al., 2013a; 2015) o de conjuntos de genes diferencialmente expresados en ácaros una vez avanzada la reproducción dentro de la celda de cría (octavo día post-operculado) (Mondet et al., 2018). Nuestros resultados contribuyen al entendimiento de las vías y genes candidatos a estar involucrados en la etapa inicial de la reproducción del ácaro y también de los cambios fisiológicos potenciales que subyacen a este momento clave de su fase reproductiva.

Como último experimento de esta Tesis, y partiendo de los resultados del transcriptoma de *V. destructor* para la selección de genes candidatos por su función predicha, realizamos un ensayo de silenciamiento génico mediante RNAi en hembras de edad controlada y en fase reproductiva. Particularmente, el silenciamiento de tres de estos genes (*ap-1*, *ptch1*, *vg1*) tuvo un efecto significativo sobre el éxito reproductivo del ácaro, sugiriendo que las vías en las que éstos participan serían encargadas de modular el inicio de la reproducción del ácaro dentro de la celda de cría de las abejas. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos (Cabrera et al., 2013a; 2015) y a su vez proveen información novedosa sobre nuevos genes y vías metabólicas potencialmente involucradas. Además, sugieren que si bien cambios en la expresión de pocos genes estarían involucrados en el éxito reproductivo del ácaro, éstos formarían parte de un complejo entramado de vías de señalización.

En su conjunto, los hallazgos presentes destacan la notable adaptación que presenta el parásito a su hospedador, especialmente, mediante la regulación de vías moleculares clave para sincronizar su reproducción con las condiciones de la huésped (p. ej., desarrollo ontogenético) y representan pasos significativos en la identificación de posibles genes *target* para el desarrollo de estrategias alternativas e innovadoras de control de la varroosis en colonias de *A. mellifera*. Por otro lado, el desarrollo y puesta a punto de protocolos experimentales (cría en semi-campo del ácaro; método de incorporación del dsRNA; ensayos involucrando colonias) también representan avances significativos en el desarrollo técnico necesario para estudiar la interacción entre el ácaro y la abeja. Globalmente, nuestros desarrollos metodológicos y el conocimiento científico generado son de utilidad para su aplicación en la caracterización de otras poblaciones de *V. destructor* y de *A. mellifera* en pos del entendimiento integral del sistema y de sus particularidades en cada ambiente.

En línea con lo antes mencionado, esta Tesis posee perspectivas amplias en el estudio de la interacción parásito-hospedador desde una mirada holística. Elementos clave, como el desarrollo y ajuste de protocolos y metodologías que incluyan diferentes aproximaciones y herramientas, como así también, diferentes niveles de análisis (individual, colonia, población) permitirán abordar el sistema de estudio considerando la naturaleza de las especies y las condiciones agroecológicas en las que éstas se desarrollan. En otras palabras, dichos estudios de interacción deberán respetar y detectar las

particularidades comportamentales y genéticas del conjunto parásito-hospedador en diferentes ambientes (ecoregiones), ya que son las condiciones del ambiente las que determinan, en gran medida, la respuesta potencial del sistema y con esto, la implementación de ajustes dinámicos en prácticas de manejo apícola, considerando cada realidad ecológica y cultural. Asimismo, es necesario avanzar en el desarrollo del control integrado de la varroosis, haciendo uso de nuevas tecnologías (como el uso del RNAi) y de la información genómica del ácaro para obtener datos a gran escala y facilitar el entendimiento de las bases moleculares de mecanismos metabólicos complejos y de rasgos de interés, como el comportamiento reproductivo. En particular, consideramos fundamental continuar avanzando en la dilucidación de las funciones fisiológicas de los genes candidatos aquí identificados, mediante estudios genómicos más profundos que permitan conocer la estructura de los genes y sus regiones promotoras y reguladoras. Estos avances, en conjunto con otros estudios “ómicos”, como proteómica y metabolómica, nos acercará a la interpretación de los mecanismos de acción de las vías de señalización que se identificaron mediante este Trabajo de Tesis.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamovich, A., Díaz, N., & 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.
- Adeyinka, O. S., Riaz, S., Toufiq, N., Yousaf, I., Bhatti, M. U., Batcho, A., *et al.* (2020). Advances in exogenous RNA delivery techniques for RNAi-mediated pest control. *Molecular Biology Reports*, 47(8), 6309-6319.
- 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., & 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.
- Ågren, M., Kogerman, P., Kleman, M. I., Wessling, M., & Toftgård, R. (2004). Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene*, 330, 101-114.
- Agroindustria, M. D. (2016). Guía De Buenas Prácticas Apícolas Y De Manufactura.
- Aizen, M. A., & 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.
- Akimov, I. A., Benedyk, S. V., & Zaloznaya, L. M. (2004). Complex analysis of morphological characters of Gamasid mite *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidae).
- Akiyama-Oda, Y., & Oda, H. (2020). Hedgehog signaling controls segmentation dynamics and diversity via *msx1* in a spider embryo. *Science Advances*, 6(37), eaba7261.
- Albayrak, C., Jordi, C. A., Zechner, C., Lin, J., Bichsel, C. A., Khammash, M., & Tay, S. (2016). Digital quantification of proteins and mRNA in single mammalian cells. *Molecular cell*, 61(6), 914-924.
- Alberti, G., & Hänel, H. (1986). Fine structure of the genital system in the bee parasite, *Varroa jacobsoni* (Gamasida: Dermanyssina) with remarks on spermiogenesis, spermatozoa and capacitation. *Experimental & applied acarology*, 2(1), 63-104.
- Alburaki, M., Bertrand, B., Legout, H., Moulin, S., Alburaki, A., Sheppard, W. S., & 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., & Garnery, L. (2011). Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*, 42(5), 628-641.
- Al-Ghamdi, A. A., Nuru, A., Khanbash, M. S., & 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., & 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., & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & applied acarology*, 24(3), 165-189.
- Andrews, J., Garcia-Estefania, D., Delon, I., Lu, J., Mével-Ninio, M., Spierer, A., et al. (2000). OVO transcription factors function antagonistically in the *Drosophila* female germLine. *Development*, 127(4), 881-892.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., & Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of invertebrate pathology*, 93(1), 67-70.
- Arathi, H. S., & Spivak, M. (2001). Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behaviour in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour*, 62(1), 57-66.
- Arechavaleta-Velasco, M. E., & Guzmán-Novoa, E. (2001). Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, 32(2), 157-174.
- Arias, M. C., & 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.
- Arias, M. C., Brito, R. M., de Oliveira Francisco, F., Moretto, G., de Oliveira, F. F., Silvestre, D., & Sheppard, W. S. (2006). Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie*, 37(2), 259-274.
- Aumeier, P., Rosenkranz, P., & Francke, W. (2002). Cuticular volatiles, attractivity of worker larvae and invasion of brood cells by *Varroa* mites. A comparison of Africanized and European honey bees. *Chemoecology*, 12(2), 65-75.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Avise, J. C., Neigel, J. E., & Arnold, J. (1984). Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20(2), 99-105.
- Aydin, L., Gulegen, E., Cakmak, I., Girisgin, A. O., & 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.
- Bakonyi, T., Farkas, R., Szendrői, A., Dobos-Kovács, M., & Rusvai, M. (2002). Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*, 33(1), 63-74.
- Ballouz, S., Pavlidis, P., & Gillis, J. (2017). Using predictive specificity to determine when gene set analysis is biologically meaningful. *Nucleic acids research*, 45(4), e20-e20.
- Baracchi, D., & Cini, A. (2014). A socio-spatial combined approach confirms a highly compartmentalised structure in honeybees. *Ethology*, 120(12), 1167-1176.
- Baracchi, D., Fadda, A., & Turillazzi, S. (2012). Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies. *Journal of insect physiology*, 58(12), 1589-1596.
- Barnard, A. C., Nijhof, A. M., Fick, W., Stutzer, C., & Maritz-Olivier, C. (2012). RNAi in arthropods: insight into the machinery and applications for understanding the pathogen-vector interface. *Genes*, 3(4), 702-741.

- Barnett, A. A., & Thomas, R. H. (2018). Early segmentation in the mite *Archegozetes longisetosus* reveals conserved and derived aspects of chelicerate development. *Development genes and evolution*, 228(5), 213-217.
- Baruffi, L., Damiani, G., Guglielmino, C. R., Bandi, C., Malacrida, A. R., & Gasperi, G. (1995). Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*, 74(4), 425-437.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823*.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356-363.
- Beaurepaire, A. L., Krieger, K. J., & Moritz, R. F. (2017). Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 49-54.
- Bedascarrasbure, E. L. (1995). *Perspectivas de la apicultura en el NOA* (No. C016. 044). INTAPROAPI.
- Bensasson, D., Zhang, D. X., Hartl, D. L., & Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in ecology & evolution*, 16(6), 314-321.
- Béréños, C., Wegner, K. M., & Schmid-Hempel, P. (2011). Antagonistic coevolution with parasites maintains host genetic diversity: an experimental test. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1703), 218-224.
- DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, AND A. D. HYATT. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife: Threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443–449
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. 2001 Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409:363–366.
- Bianchi, E., Agra, M. N., García, C., Gennari, G., Maldonado, L., Rodríguez, G. A *et al.* (2021). Defensive Behavior and Morphometric Variation in *Apis mellifera* Colonies From Two Different Agro-Ecological Zones of North-Western Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 585.
- Bierzychudek, 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., *et al.* (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., & Moritz, R. F. (2018). Social response of healthy honeybees towards *Nosema ceranae*-infected workers: care or kill?. *Apidologie*, 49(3), 325-334.
- Bigio, G., Schürch, R., & Ratnieks, F. L. (2013). Hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. *Journal of economic entomology*, 106(6), 2280-2285.
- Bigio, G., Toufaily, H. A., Hughes, W. O., & Ratnieks, F. L. (2014). The effect of one generation of controlled mating on the expression of hygienic behaviour in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 563-568.

- Boecking, O., & Genersch, E. (2008). Varroosis—the ongoing crisis in bee keeping. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 3(2), 221-228.
- Boecking, O., & 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., & 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.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Boot, W. J., Driessen, R. G., Calis, J. N., & 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.
- Borsuk, G. (2009). Influence of increased division of labour among worker bees on dead brood removal. *Journal of Apicultural Science*, 53(2), 69-77.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., & Higes, M. (2013). Nosema spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary research*, 44(1), 1-15.
- Bouché, N., & Bouchez, D. (2001). Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Current opinion in plant biology*, 4(2), 111-117.
- Bouga, M., Harizanis, P. C., Kiliadis, G., & Alahiotis, S. (2005). Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR–RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*, 36(3), 335-344.
- Branco, M. R., Kidd, N. A., & Pickard, R. S. (1999). Development of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis mellifera iberica* in a Mediterranean climate. *Apidologie*, 30(6), 491-503.
- Brasacco, C., de Landa, G. F., Quintana, S., Junges, C., Di Gerónimo, V., Porrini, L., et al. (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.
- Brasacco, C., Quintana, S., Di Gerónimo, V., García, M. G., Sguazza, G., Bravi, M. E., et al. (2021). Deformed wing virus type a and b in managed honeybee colonies of Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, 111(1), 100-110.
- Brutscher, L. M., Baer, B., & 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., & Flenniken, M. L. (2016). The buzz about honey bee viruses. *PLoS Pathogens*, 12(8), e1005757.
- Büchler, R., Berg, S., & Le Conte, Y. (2010). Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie*, 41(3), 393-408.
- Bulacio Cagnolo, N., Basualdo, M., & 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., & Thurman, W. N. (2004). Economics and honey bee pollination markets. *American Bee Journal*.
- Cabrera Cordon, A. R., Shirk, P. D., Duehl, A. J., Evans, J. D., & Teal, P. E. A. (2013a). Variable induction of vitellogenin genes in the varroa mite, *Varroa destructor* (Anderson & Trueman), by the honeybee, *Apis mellifera* L, host and its environment. *Insect molecular biology*, 22(1), 88-103.
- Cabrera, A. R., Donohue, K. V., & Roe, R. M. (2009). Regulation of female reproduction in mites: a unifying model for the Acari. *Journal of Insect Physiology*, 55(12), 1079-1090.
- Cabrera, A. R., Shirk, P. D., Evans, J. D., Hung, K., Sims, J., Alborn, H., & Teal, P. E. A. (2015). Three Halloween genes from the *Varroa destructor* (Anderson & Trueman) and their expression during reproduction. *Insect molecular biology*, 24(3), 277-292.
- 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., & 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(1), 17-25.
- Calderone, N. W., Lin, S., & 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.
- Calfee, E., Agra, M. N., Palacio, M. A., Ramírez, S. R., & 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., & Ryrie, S. C. (1999). Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2-3), 111-124.
- Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S., & Snyder, M. (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS pathogens*, 6(4), e1000834.
- Campbell, E. M., Budge, G. E., & Bowman, A. S. (2010). Gene-knockdown in the honey bee mite *Varroa destructor* by a non-invasive approach: studies on a glutathione S-transferase. *Parasites & Vectors*, 3(1), 1-10.
- Campbell, E. M., Budge, G. E., Watkins, M., & Bowman, A. S. (2016). Transcriptome analysis of the synganglion from the honey bee mite, *Varroa destructor* and RNAi knockdown of neural peptide targets. *Insect biochemistry and molecular biology*, 70, 116-126.
- Campbell, E. M., McIntosh, C. H., & Bowman, A. S. (2016). A toolbox for quantitative gene expression in *Varroa destructor*: RNA degradation in field samples and systematic analysis of reference gene stability. *PLoS One*, 11(5), e0155640.
- Cao, Z., Pan, X., Yang, Y., Huang, Y., & Shen, H. B. (2018). The IncLocator: a subcellular localization predictor for long non-coding RNAs based on a stacked ensemble classifier. *Bioinformatics*, 34(13), 2185-2194.
- Castelli, L., Genchi García, M. L., Dalmon, A., Arredondo, D., Antúnez, K., Invernizzi, C., et al. (2021). Intra-Colonial Viral Infections in Western Honey Bees (*Apis mellifera*). *Microorganisms*, 9(5), 1087.

- Catalanotto, C., G. Azzalin, G. Macino, and C. Cogoni. 2000. Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404:245. Czech B, Hannon GJ. 2011. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet* 12:19–31
- Cedeño, A. G., Nakaya, P., Niz, J., Sciocco-Cap, A., & Salvador, R. (2015). Double-stranded RNA synthesized in bacteria can be transferred to bee and varroa tissues. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 99-100.
- Cepero, A., Ravoet, J., Gómez-Moracho, T., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., Bartolomé, C., *et al.* (2014). Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC research notes*, 7(1), 1-10.
- Cestaro, L. G., Alves, M. L. T. M. F., Silva, M. V. G. B., & Teixeira, É. W. (2017). Honey bee (*Apis mellifera*) health in stationary and migratory apiaries. *Sociobiology*, 64(1), 42-49.
- Chávez, A. S. O., Herron, M. J., Nelson, C. M., Felsheim, R. F., Oliver, J. D., Burkhardt, N. Y., . *et al.* (2019). Mutational analysis of gene function in the Anaplasmataceae: Challenges and perspectives. *Ticks and tick-borne diseases*, 10(2), 482-494.
- Chávez-Galarza, J., Henriques, D., Johnston, J. S., Azevedo, J. C., Patton, J. C., Muñoz, I., *et al.* (2013). Signatures of selection in the Iberian honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) revealed by a genome scan analysis of single nucleotide polymorphisms. *Molecular ecology*, 22(23), 5890-5907.
- Chen, G., Wang, S., Jia, S., Feng, Y., Hu, F., Chen, Y., & Zheng, H. (2021). A new strain of virus discovered in China specific to the parasitic mite *Varroa destructor* poses a potential threat to honey bees. *Viruses*, 13(4), 679.
- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D. A. W. N., & Pettis, J. S. (2009). Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera* L. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 142-147.
- Cheruiyot, S. K., Lattorff, H. M. G., Kahuthia-Gathu, R., Mbugi, J. P., & Muli, E. (2018). Varroa-specific hygienic behavior of *Apis mellifera scutellata* in Kenya. *Apidologie*, 49(4), 439-449.
- Chhuneja, P. K., & Gill, A. K. (2014, January). Influence of different factors on graft acceptance in *Apis mellifera* Linnaeus colonies during autumn in Punjab. In *Biological Forum* (Vol. 6, No. 1, p. 148). Research Trend.
- Chinnery, P. F., Thorburn, D. R., Samuels, D. C., White, S. L., Dahl, H. H. M., Turnbull, D. M., *et al.* (2000). The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both?. *Trends in Genetics*, 16(11), 500-505.
- Clark, E., Peel, A. D., & Akam, M. (2019). Arthropod segmentation. *Development*, 146(18), dev170480.
- Clarke, K. E., Rinderer, T. E., Franck, P., Quezada-Euán, J. G., & 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.
- Clarke, K. E., Rinderer, T. E., Franck, P., Quezada-Euán, J. G., & 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.

- Cogoni, C., & Macino, G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 399(6732), 166-169.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., *et al.* (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, 17(1), 1-19.
- Conlon, B. H., Aurori, A., Giurgiu, A. I., Kefuss, J., Dezmirean, D. S., Moritz, R. F., & 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, *et al.* (2008). Descripción de nuevas variante haplotípicas en poblaciones de *Apis mellifera* en Argentina. IX Simposio Iberoamericano Sobre Conservación Y Utilización De Recursos Zoogenéticos. 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.
- Cornman, R. S., Schatz, M. C., Johnston, J. S., Chen, Y. P., Pettis, J., Hunt, G., *et al.* (2010). Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. *BMC genomics*, 11(1), 1-15.
- Cornuet, J. M., Fresnaye, J., & 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., & 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.
- Cotter, S. C., Pincheira-Donoso, D., & Thorogood, R. (2019). Defences against brood parasites from a social immunity perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374(1769), 20180207.
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., *et al.* (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848), 283-287.
- Cremer, S. Armitage SAO& Schmid-Hempel P. 2007 Social immunity. *Curr. Biol*, 17, R693-R702.
- Cremer, S., & Pull, C. D. (2018). Social Immunity: Emergence and Evolution of Colony-Level. *Annu, Rev. Entomol*, 63, 105-23.
- Cremer, S., Armitage, S. A., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current biology*, 17(16), R693-R702.
- Cridland, J. M., Tsutsui, N. D., & 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., Pernal, S. F., & Guzmán-Novoa, E. (2010). Honey bee colony losses in Canada. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 104-106.
- Dahle, B. (2010). The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 124-125.

- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, *101*(5), 543-553.
- D'Alvise, P., Seeburger, V., Gihring, K., Kieboom, M., & Hasselmann, M. (2019). Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecology and evolution*, *9*(18), 10241-10252.
- Danka, R. G., Harris, J. W., & Dodds, G. E. (2016). Selection of VSH-derived "Pol-line" honey bees and evaluation of their *Varroa*-resistance characteristics. *Apidologie*, *47*(3), 483-490.
- Daughenbaugh, K. F., Martin, M., Brutscher, L. M., Cavigli, I., Garcia, E., Lavin, M., & Flenniken, M. L. (2015). Honey bee infecting Lake Sinai viruses. *Viruses*, *7*(6), 3285-3309.
- de Guzman, L. I., & Rinderer, T. E. (1999). Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees. *Apidologie*, *30*(2-3), 85-95.
- de Guzman, L. I., Rinderer, T. E., & Frake, A. M. (2008). Comparative reproduction of *Varroa destructor* in different types of Russian and Italian honey bee combs. *Experimental and Applied Acarology*, *44*(3), 227-238.
- de Guzman, L., Rinderer, T. E., Stelzer, J. A., & 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., & 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., & 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 la Fuente, J., Kocan, K. M., Almazán, C., & Blouin, E. F. (2007). RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends in parasitology*, *23*(9), 427-433.
- De La Rúa, P., Jiménez, Y., Galián, J., & Serrano, J. (2004). Evaluation of the biodiversity of honey bee (*Apis mellifera*) populations from eastern Spain. *Journal of Apicultural Research*, *43*(4), 162-166.
- De Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of invertebrate pathology*, *103*, S48-S61.
- De Miranda, J. R., Cornman, R. S., Evans, J. D., Semberg, E., Haddad, N., Neumann, P., & 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., et al. (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., Dainat, B., Locke, B., Cordoni, G., Berthoud, H., Gauthier, L., *et al.* (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., Drebot, M., Tyler, S., Shen, M., Cameron, C. E., Stoltz, D. B., & Camazine, S. M. (2004). Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *Journal of General Virology*, 85(8), 2263-2270.
- De Roode, J. C., & Lefèvre, T. (2012). Behavioral immunity in insects. *Insects*, 3(3), 789-820.
- Dechatre, H., Michel, L., Soubeyrand, S., Maisonnasse, A., Moreau, P., Poquet, Y., *et al.* (2021). To Treat or Not to Treat Bees? Handy VarLoad: A Predictive Model for *Varroa destructor* Load. *Pathogens*, 10(6), 678.
- DeJong, D., & 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 (USA)*.
- Delaplane, K. S., & Hood, W. M. (1999). Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA. *Apidologie*, 30(5), 383-395.
- Delaplane, K. S., Mayer, D. R., & Mayer, D. F. (2000). *Crop pollination by bees*. Cabi.
- Delfinado-Baker, M. (1988). Variability and biotypes of *Varroa jacobsoni* Oudemans.
- DeLuca, S. A. (2012). *Mitochondrial DNA genetics and the basis of maternal inheritance* (Doctoral dissertation, UCSF).
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., *et al.* (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.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani Jr, H. F., Evans, J. D., & Chen, Y. (2011). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, 92(1), 151-155.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, Y. C. (2010). InfoStat versión 2011. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. URL <http://www.infostat.com.ar>, 8, 195-199.
- Dietemann, V., Beaurepaire, A., Page, P., Yañez, O., Buawangpong, N., Chantawannakul, P., & Neumann, P. (2019). Population genetics of ectoparasitic mites *Varroa* spp. in Eastern and Western honey bees. *Parasitology*, 146(11), 1429-1439.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., *et al.* (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of apicultural research*, 52(1), 1-54.
- Ding, D., Parkhurst, S. M., Halsell, S. R., & Lipshitz, H. D. (1993). Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Molecular and cellular biology*, 13(6), 3773-3781.
- Ding, G., Fondevila, N., Palacio, M. A., Merke, J., Martinez, A., Camacho, B., *et al.* (2016). Prevalence of honeybee viruses in different regions of China and Argentina. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epi*, 35, 825-833.

- Dittmann, F., & Steiner, J. (1997). Intercellular connection between the lyrate organ and the growing oocyte in *Varroa jacobsoni* as revealed by Lucifer Yellow dye-coupling. *Journal of apicultural research*, 36(3-4), 145-149.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., *et al.* (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.
- Dogantzis, K. A., Tiwari, T., Conflitti, I. M., Dey, A., Patch, H. M., Muli, E. M., *et al.* (2021). Thrice out of Asia and the adaptive radiation of the western honey bee. *Science advances*, 7(49), eabj2151.
- Donzé, G., & Guerin, P. M. (1994). Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34(5), 305-319.
- Donzé, G., & Guerin, P. M. (1997). Time-activity budgets and space structuring by the different life stages of *Varroa jacobsoni* in capped brood of the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of insect behavior*, 10(3), 371-393.
- Doublet, V., Raimond, R., Grandjean, F., Lafitte, A., Souty-Grosset, C., & Marcadé, I. (2012). Widespread atypical mitochondrial DNA structure in isopods (Crustacea, Peracarida) related to a constitutive heteroplasmy in terrestrial species. *Genome*, 55(3), 234-244.
- Duay, P., De Jong, D., & 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., & Thiéry, R. (2020). Outcomes of honeybee pupae inoculated with deformed wing virus genotypes A and B. *Apidologie*, 51(1), 18-34.
- Dynes, T. L., De Roode, J. C., Lyons, J. I., Berry, J. A., Delaplane, K. S., & Brosi, B. J. (2017). Fine scale population genetic structure of *Varroa destructor*, an ectoparasitic mite of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 48(1), 93-101.
- Egan, A. N., Schlueter, J., & Spooner, D. M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American journal of botany*, 99(2), 175-185.
- 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. J. (2006). *Estrategias para el control de varroa* (No. C039. 010). Editorial MartínUniversidad Nacional de mar de plata.
- Eguaras, M., Cora, D., Ruffinengo, S., Faverin, C., & 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., & 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., & Fernández, N. (1994). Seasonal changes in *Varroa jacobsoni* reproduction in temperate climates of Argentina. *Bee Sci*, 3, 120-123.

- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20:6877–6888
- Elbeaino, T., Daher-Hjajj, N., Ismaeil, F., Mando, J., Khaled, B. S., & Kubaa, R. A. (2016). Occurrence of Deformed wing virus, Chronic bee paralysis virus and mtDNA variants in haplotype K of *Varroa destructor* mites in Syrian apiaries. *Experimental and Applied Acarology*, 69(1), 11-19.
- Elekonich, M. M., & Roberts, S. P. (2005). Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(4), 362-371.
- Eliash, N., Singh, N. K., Thangarajan, S., Sela, N., Leshkowitz, D., Kamer, Y., et al. (2017). Chemosensing of honeybee parasite, *Varroa destructor*: Transcriptomic analysis. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Ellis, J. D., Evans, J. D., & 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., & Westervelt, D. (2002). Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida. *American Bee Journal*, 142(4), 291-292.
- Elzen, P. J., Eischen, F. A., Baxter, J. R., Elzen, G. W., & Wilson, W. T. (1999). Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud.(Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie*, 30(1), 13-17.
- Engel, M. S. (1999). The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis).
- Engström, P. G., Steijger, T., Sipos, B., Grant, G. R., Kahles, A., Rättsch, G., et al. (2013). Systematic evaluation of spliced alignment programs for RNA-seq data. *Nature methods*, 10(12), 1185-1191.
- Es'kov, E. K., & 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(2), 98-102.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M., & 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.
- Evans, J. D., & Cook, S. C. (2018). Genetics and physiology of *Varroa* mites. *Current opinion in insect science*, 26, 130-135.
- Evans, J. D., & Lopez, D. L. (2002). Complete mitochondrial DNA sequence of the important honey bee pest, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental & applied acarology*, 27(1), 69-78.
- Evans, J. D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S62-S72.
- Evans, J. D., & 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.
- Everaert, C., Luypaert, M., Maag, J. L., Cheng, Q. X., Dinger, M. E., Hellemans, J., & Mestdagh, P. (2017). Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.

- FAO. (2018). Why bees matter. The importance of bees and other pollinators for food and agriculture. FAO (ed.). 16 pp.
- Farjamfar, M., Saboori, A., González-Cabrera, J., & Hernández Rodríguez, C. S. (2018). Genetic variability and pyrethroid susceptibility of the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Iran. *Experimental and Applied Acarology*, 76(1), 139-148.
- Feng, J., Li, W., & Jiang, T. (2010). Inference of isoforms from short sequence reads. In *Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology* (pp. 138-157). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Feng, M., Ren, F., Zhou, Y., Zhang, N., Lu, Q., Swevers, L., & Sun, J. (2019). Correlation in expression between LTR retrotransposons and potential host cis-targets during infection of *Antheraea pernyi* with ApNPV baculovirus. *Viruses*, 11(5), 421.
- Fernández, C. J., de Rosas, A. R. P., & García, B. A. (2013). Variation in mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 and NADH dehydrogenase subunit 4 genes in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(5), 893.
- Fernández, N., Eguaras, M., & Hernández, D. (1993). Distribution patterns of *Varroa jacobsoni* Oud on *Apis mellifera* L during winter in Argentina. *Apidologie*, 24(4), 397-401.
- Fewell, G. D., & Schmitt, K. (2006). Vector-based RNAi approaches for stable, inducible and genome-wide screens. *Drug discovery today*, 11(21-22), 975-982.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806-811.
- Fisher, G. J., Choi, H. C., Bata-Csorgo, Z., Shao, Y., Datta, S., Wang, Z. Q., *et al.* (2001). Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. *Journal of investigative dermatology*, 117(2), 219-226.
- Flores, J. M., Gámiz, V., Jiménez-Marín, Á., Flores-Cortés, A., Gil-Lebrero, S., Garrido, J. J., & 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.
- Formato, G., Rivera-Gomis, J., Bubnic, J., Martín-Hernández, R., Milito, M., Croppi, S., & Higes, M. (2022). Nosemosis Prevention and Control. *Applied Sciences*, 12(2), 783.
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S5-S9.
- Forsgren, E., Stevanovic, J., & 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., & 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., & 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., & Quezada-Euán, J. J. G. (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, *40*(3), 332-346.
- Frey, E., Odemer, R., Blum, T., & Rosenkranz, P. (2013). Activation and interruption of the reproduction of *Varroa destructor* is triggered by host signals (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, *113*(1), 56-62.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, *103*, S73-S79.
- Fries, I., & Bommarco, R. (2007). Possible host-parasite adaptations in honey bees infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, *38*(6), 525-533.
- Fries, I., & Camazine, S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, *32*(3), 199-214.
- Fries, I., & Rosenkranz, P. (1996). Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental & applied acarology*, *20*(2), 103-112.
- Fries, I., Camazine, S., & Sneyd, J. (1994). Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee world*, *75*(1), 5-28.
- Fries, I., Slemenda, S. B., da Silva, A., & Pieniazek, N. J. (2003). African honey bees (*Apis mellifera* scutellata) and nosema (*Nosema apis*) infections. *Journal of Apicultural Research*, *42*(1-2), 13-15.
- Furuno, M., Pang, K. C., Ninomiya, N., Fukuda, S., Frith, M. C., Bult, C., et al. (2006). Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS genetics*, *2*(4), e37.
- Gajger, I. T., Petrinc, Z., Pinter, L., & Kozarić, Z. (2009). Experimental treatment of nosema disease with "Nozevit" phyto-pharmacological preparation. *American Bee Journal*, *149*(5), 485-490.
- Gajić, B., Muñoz, I., De la Rúa, P., Stevanović, J., Lakić, N., Kulišić, Z., & Stanimirović, Z. (2019). Coexistence of genetically different *Varroa destructor* in *Apis mellifera* colonies. *Experimental and Applied Acarology*, *78*(3), 315-326.
- Gajic, B., Radulovic, Z., Stevanovic, J., Kulisic, Z., Vucicevic, M., Simeunovic, P., & Stanimirovic, Z. (2013). Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis. *Experimental and Applied Acarology*, *61*(1), 97-105.
- Gajić, B., Stevanović, J., Radulović, Ž., Kulišić, Z., Vejnović, B., Glavinić, U., & Stanimirović, Z. (2016). Haplotype identification and detection of mitochondrial DNA heteroplasmy in *Varroa destructor* mites using ARMS and PCR-RFLP methods. *Experimental and Applied Acarology*, *70*(3), 287-297.
- Galajda, R., Valenčáková, A., Sučík, M., & Kandráčová, P. (2021). Nosema Disease of European Honey Bees. *Journal of Fungi*, *7*(9), 714.
- Galay, R. L., Hernandez, E. P., Talactac, M. R., Maeda, H., Kusakisako, K., Umemiya-Shirafuji, R., et al. (2016). Induction of gene silencing in *Haemaphysalis longicornis* ticks through immersion in double-stranded RNA. *Ticks and tick-borne diseases*, *7*(5), 813-816.
- Galindo-Cardona, A., Carolina Monmany, A., Moreno-Jackson, R., Rivera-Rivera, C., Huertas-Dones, C., Caicedo-Quiroga, L., & 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., *et al.* (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.
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature methods*, 8(6), 469-477.
- Garbian, Y., Maori, E., Kalev, H., Shafir, S., & Sela, I. (2012). Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and *Varroa destructor*: *Varroa* gene silencing reduces *Varroa* population. *PLoS pathogens*, 8(12), e1003035.
- Garcia-Fernandez, P., Rodriguez, R. B., & 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.
- Garedew, A., Schmolz, E., & Lamprecht, I. (2004). The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35(4), 419-430.
- Garnery, L. (1992). *Variabilité de l'ADN mitochondrial de l'abeille domestique: Implications phylogénétiques* (Doctoral dissertation, Paris 6).
- GARNERY, L., and J.-M. CORNUET, 1994 Inter and intra lineage mitochondrial DNA variation in the honeybee *Apis mellifera*. XIIth IUSSI Congress, Paris, 428.
- Garnery, L., Franck, P., Baudry, E., Vautrin, D., Cornuet, J. M., & Solignac, M. (1998). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera* mellifera and A. m. iberica) II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution*, 30(Supplement), S49-S74.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., & Cornuet, J. M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49(11), 1016-1021.
- Garnery, L., Vautrin, D., Cornuet, J. M., & Solignac, M. (1991). Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*, 22(1), 87-92.
- Garrido, C., & Rosenkranz, P. (2003). The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*. *Experimental & applied acarology*, 31(3), 269-273.
- Garrido, C., Rosenkranz, P., Paxton, R. J., & Gonçalves, L. S. (2003). Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie*, 34(6), 535-541.
- Garrido, C., Rosenkranz, P., Stürmer, M., RübSam, R., & Büning, J. (2000). Toluidine blue staining as a rapid measure for initiation of oocyte growth and fertility in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 31(5), 559-566.
- Genersch, E. (2010) a. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S10-S19.
- Genersch, E. (2010) b. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(1), 87-97.
- Genersch, E., & Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary research*, 41(6), 54.

- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., *et al.* (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.
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews genetics*, 10(2), 94-108.
- Ghosh, R. C., Ball, B. V., Willcocks, M. M., & Carter, M. J. (1999). The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*, 80(6), 1541-1549.
- Giacobino, A. (2015). *Estudio de los factores de riesgo asociados a la presencia y difusión de la Varroosis en la Provincia de Santa Fe* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba).
- Giacobino, A., Molineri, A. I., Pacini, A., Fondevila, N., Pietronave, H., Rodríguez, G., *et al.* (2016). *Varroa destructor* and viruses association in honey bee colonies under different climatic conditions. *Environmental microbiology reports*, 8(3), 407-412.
- Giacobino, A., Molineri, A., Cagnolo, N. B., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., *et al.* (2015). Risk factors associated with failures of *Varroa* treatments in honey bee colonies without broodless period. *Apidologie*, 46(5), 573-582.
- Giacobino, A., Pacini, A., Molineri, A., Cagnolo, N. B., Merke, J., Orellano, E., *et al.* (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.
- Gillis, J., Mistry, M., & Pavlidis, P. (2010). Gene function analysis in complex data sets using ErmineJ. *Nature protocols*, 5(6), 1148-1159.
- Golden, T. A., S. E. Schauer, J. D. Lang, S. Pien, A. R. Mushegian, U. Grossniklaus, D. W. Meinke, and A. Ray. 2002. SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1/CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 130:808-822
- Gonzalez-Cabrera, J., Davies, T. E., Field, L. M., Kennedy, P. J., & Williamson, M. S. (2013b). An amino acid substitution (L925V) associated with resistance to pyrethroids in *Varroa destructor*. *PLoS one*, 8(12), e82941.
- Goulson, D., Lye, G., & Darvill, B. (2008). The decline and conservation of bumblebees. *Annual review of entomology*, 53, 191-208.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957.
- Govan, V. A., Leat, N., Allsopp, M., & Davison, S. (2000). Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology*, 277(2), 457-463.
- Gramacho, K. P., & Spivak, M. (2003). Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54(5), 472-479.
- Granberg, F., Vicente-Rubiano, M., Rubio-Guerri, C., Karlsson, O. E., Kukielka, D., Belák, S., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2013). Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: co-infection by aphid lethal paralysis, Israel acute paralysis and Lake Sinai viruses. *PLoS one*, 8(2), e57459.

- Grbić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R. M., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., *et al.* (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374), 487-492.
- Grishok, A., Tabara, H., & Mello, C. C. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *science*, 287(5462), 2494-2497.
- Grozinger, C. M., & 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., & Farina, W. M. (2009). The honeybee waggle dance: can we follow the steps?. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(5), 242-247.
- Guarna, M. M., Melathopoulos, A. P., Huxter, E., Iovinella, I., Parker, R., Stoyanov, N., *et al.* (2015). A search for protein biomarkers links olfactory signal transduction to social immunity. *BMC genomics*, 16(1), 1-16.
- Guerra Jr, J. C. V., Issa, M. R. C., Carneiro, F. E., Strapazzon, R., & Moretto, G. (2010). RAPD identification of *Varroa destructor* genotypes in Brazil and other regions of the Americas. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 303-308.
- Guichard, M., Neuditschko, M., Soland, G., Fried, P., Grandjean, M., Gerster, S., *et al.* (2020). Estimates of genetic parameters for production, behaviour, and health traits in two Swiss honey bee populations. *Apidologie*, 51(5), 876-891.
- Guil, S., & Esteller, M. (2012). Cis-acting noncoding RNAs: friends and foes. *Nature structural & molecular biology*, 19(11), 1068-1075.
- Gulledge, A. A., Roberts, A. D., Vora, H., Patel, K., & Loraine, A. E. (2012). Mining Arabidopsis thaliana RNA-seq data with integrated genome browser reveals stress-induced alternative splicing of the putative splicing regulator SR45a. *American journal of botany*, 99(2), 219-231.
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., MCGowan, J., Kelly, P. G., & Correa-Benítez, A. (2010). *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, 41(4), 443-450.
- Guzman-Novoa, E., Emsen, B., Unger, P., Espinosa-Montaño, L. G., & Petukhova, T. (2012). Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor* mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of invertebrate pathology*, 110(3), 314-320.
- Guzmán-Novoa, E., Vandame, R., & 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.
- Hall, B., Limaye, A., & Kulkarni, A. B. (2009). Overview: generation of gene knockout mice. *Current protocols in cell biology*, 44(1), 19-12.
- Hall, H. G., & Muralidharan, K. (1989). Evidence from mitochondrial DNA that African honey bees spread as continuous maternal lineages. *Nature*, 339(6221), 211-213.
- Hall, H. G., & 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.

- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symp. Ser.* (Vol. 41, pp. 95-98).
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*; 404: 293-6.
- Han, F., Wallberg, A., & 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.
- Harbo, J. R., & Harris, J. W. (2009). Responses to *Varroa* by honey bees with different levels of *Varroa* Sensitive Hygiene. *Journal of apicultural research*, 48(3), 156-161.
- Harpur, B. A., Chernyshova, A., Soltani, A., Tsvetkov, N., Mahjoorighasrodashti, M., Xu, Z., & Zayed, A. (2014). No genetic tradeoffs between hygienic behaviour and individual innate immunity in the honey bee, *Apis mellifera*. *PloS one*, 9(8), e104214.
- Harpur, B. A., Sobhani, M., & Zayed, A. (2013). A review of the consequences of complementary sex determination and diploid male production on mating failures in the Hymenoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146(1), 156-164.
- Harris, J. W. (2007). Bees with *Varroa* Sensitive Hygiene preferentially remove mite infested pupae aged  $\leq$  five days post capping. *Journal of Apicultural Research*, 46(3), 134-139.
- Harris, J. W., Danka, R. G., & Villa, J. D. (2012). Changes in infestation, cell cap condition, and reproductive status of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in brood exposed to honey bees with *Varroa* sensitive hygiene. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(3), 512-518.
- Hartmann, U., Forsgren, E., Charrière, J. D., Neumann, P., & Gauthier, L. (2015). Dynamics of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) infections in honey bees and relationships with other parasites. *Viruses*, 7(5), 2654-2667.
- Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page Jr, R. E., & 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., & Rosenkranz, P. (2020). Reproductive parameters of female *Varroa destructor* and the impact of mating in worker brood of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 51(3), 342-355.
- Häußermann, C. K., Ziegelmann, B., & Rosenkranz, P. (2016). Spermatozoa capacitation in female *Varroa destructor* and its influence on the timing and success of female reproduction. *Experimental and Applied Acarology*, 69(4), 371-387.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & 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., *et al.* (2021). Large-scale monitoring of resistance to coumaphos, amitraz, and pyrethroids in *Varroa destructor*. *Insects*, 12(1), 27.
- Herrero, S., Millán-Leiva, A., Coll, S., González-Martínez, R. M., Parenti, S., & González-Cabrera, J. (2019). Identification of new viral variants specific to the honey bee mite *Varroa destructor*. *Experimental and Applied Acarology*, 79(2), 157-168.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., *et al.* (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 & Comparative Immunology*, 58, 102-118.
- Hoshiba, H., & Kusanagi, A. (1978). Karyological study of honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 17(3), 105-109.
- Houdebine, L. M. (2014). Design of vectors for optimizing transgene expression. In *Transgenic Animal Technology* (pp. 489-511). Elsevier.
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Liang, X. J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-25.
- Huang, Z. Y., Bian, G., Xi, Z., & Xie, X. (2017). Genes important for survival or reproduction in *Varroa destructor* identified by RNAi. *Insect science*, 26(1), 68-75.
- Hunt, G. J., Amdam, G. V., Schlipalius, D., Emore, C., Sardesai, N., Williams, C. E., *et al.* (2006). Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense. *Naturwissenschaften*, 94(4), 247-267.
- Hunter, C. P., Winston, W. M., Molodowitch, C., Feinberg, E. H., Shih, J., Sutherlin, M., *et al.* (2006, January). Systemic RNAi in *Caenorhabditis elegans*. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 71, pp. 95-100). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Huvenne, H., & Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of insect physiology*, 56(3), 227-235.
- Ibrahim, A., & 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.
- Ibrahim, A., Reuter, G. S., & Spivak, M. (2007). Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*. *Apidologie*, 38(1), 67-76.
- Ifantidis, M. D. (1983). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honeybee brood cells. *Journal of Apicultural Research*, 22(3), 200-206.
- Ifantidis, M. D. (1988). Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. *Apidologie*, 19(4), 387-396.
- Ifantidis, M. D. (1990). Re-examination of some parameters concerning reproduction of the mite. *Varroa jacobsoni*, 20-26.

- Iglesias, A., Mitton, G., Szawarski, N., Cooley, H., Ramos, F., Arcerito, F. M., *et al.* (2020). Essential oils from *Humulus lupulus* as novel control agents against *Varroa destructor*. *Industrial Crops and Products*, 158, 113043.
- Inberg A, Mahak K, inventors. Monsanto Technology LLC and Beeologics, Inc. U.S. Patent 62156751. May 3, 2016
- 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.
- Ivanova, E. N., Bienkowska, M., & Petrov, P. P. (2010). Allozyme polymorphism and phylogenetic relationships in *Apis mellifera* subspecies selectively reared in Poland and Bulgaria. *Folia Biologica (Krakow)*, 59(3-4), 121-126.
- Ivashuta, S., Zhang, Y., Wiggins, B. E., Ramaseshadri, P., Segers, G. C., Johnson, S., *et al.* (2015). Environmental RNAi in herbivorous insects. *Rna*, 21(5), 840-850.
- Jack, C. J., & Ellis, J. D. (2021). Integrated Pest Management Control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), the Most Damaging Pest of (*Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae)) Colonies. *Journal of Insect Science*, 21(5), 6.
- Jean-Prost, P. (1987). Apiculture; connaitre l'abeille, conduire le rucher.
- Jean-Prost, P. (2007). *Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*. Mundi-Prensa Libros.
- Jiang, X., & Wang, X. (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual review of biochemistry*, 73.
- Joga, M. R., Zotti, M. J., Smagghe, G., & Christiaens, O. (2016). RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Frontiers in physiology*, 7, 553.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., *et al.* (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Kanbar, G., & 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(5), 349-354.
- Keeling, C. I., Slessor, K. N., Higo, H. A., & 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.
- Kerr, W. E., Del Rio, S. D. L., & 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., & Maciel, H. B. (1970). Biologia comparada entre as abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*) africana (*Apis mellifera adansonii*) e suas híbridadas. In CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA (Vol. 1, pp. 151-185).
- Khila, A., & Grbić, M. (2007). Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the Distal-less gene. *Development genes and evolution*, 217(3), 241-251.
- Kim, D. H., & Ausubel, F. M. (2005). Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of *Caenorhabditis elegans*. *Current opinion in immunology*, 17(1), 4-10.

- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, *44*(5), 613-616.
- Kim, T., Yoon, J., Cho, H., Lee, W. B., Kim, J., Song, Y. H., *et al.* (2005). Downregulation of lipopolysaccharide response in *Drosophila* by negative crosstalk between the AP1 and NF- $\kappa$ B signaling modules. *Nature immunology*, *6*(2), 211-218.
- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, *274*(1608), 303-313.
- Kockel, L., Homsy, J. G., & Bohmann, D. (2001). *Drosophila* AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene*, *20*(19), 2347-2364.
- Koeniger, G., Koeniger, N., Anderson, D. L., Lekprayoon, C., & Tingek, S. (2002). Mites from debris and sealed brood cells of *Apis dorsata* colonies in Sabah (Borneo) Malaysia, including a new haplotype of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, *33*(1), 15-24.
- Koeniger, N., & Koeniger, G. (2000). Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. *Apidologie*, *31*(2), 313-339.
- Kolde, R., & Vilo, J. (2015). GOsummaries: an R package for visual functional annotation of experimental data. *F1000Research*, *4*.
- Kraus, B. (1993). Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Journal of Apicultural Research*, *32*(2), 57-64.
- Kuenen, L. P. S., & Calderone, N. W. (1997). Transfers of varroa mites from newly emerged bees: Preferences for age-and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, *10*(2), 213-228.
- Lanzi, G., De Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., *et al.* (2006). Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of virology*, *80*(10), 4998-5009.
- Laomettachit, T., Liangruksa, M., Termsaithong, T., Tangthanawatsakul, A., & Duangphakdee, O. (2021). A model of infection in honeybee colonies with social immunity. *PloS one*, *16*(2), e0247294.
- Lapidge, K. L., Oldroyd, B. P., & Spivak, M. (2002). Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften*, *89*(12), 565-568.
- Laurent, J. C., & Santas, L. (1987). Etude du développement larvaire de *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, *18*(1), 53-60.
- Le Conte, 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.
- Le Conte, Y., Arnold, G., & Desenfant, P. H. (1990). Influence of brood temperature and hygrometry variations on the development of the honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Environmental Entomology*, *19*(6), 1780-1785.
- Le Conte, Y., De Vaublanc, G., Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J. C., & Bécard, J. M. (2007). Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie*, *38*(6), 566-572.

- Le Conte, Y., Ellis, M., & Ritter, W. (2010). Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?. *Apidologie*, 41(3), 353-363.
- Le Conte, Y., Huang, Z. Y., Roux, M., Zeng, Z. J., Christidès, J. P., & Bagnères, A. G. (2015). *Varroa destructor* changes its cuticular hydrocarbons to mimic new hosts. *Biology letters*, 11(6), 20150233.
- Leat, N., Ball, B., Govan, V., & Davison, S. (2000). Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology*, 81(8), 2111-2119.
- Lecocq, A., Jensen, A. B., Kryger, P., & Nieh, J. C. (2016). Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Lee, H. K., Braynen, W., Keshav, K., & Pavlidis, P. (2005). ErmineJ: tool for functional analysis of gene expression data sets. *BMC bioinformatics*, 6(1), 1-8.
- Lenth, R., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P., & Herve, M. (2018). Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. *R package version*, 1(1), 3.
- Lester, P. J., Felden, A., Baty, J. W., Bulgarella, M., Haywood, J., Mortensen, A. N., et al. (2022). Viral communities in the parasite *Varroa destructor* and in colonies of their honey bee host (*Apis mellifera*) in New Zealand. *Scientific Reports*, 12(1), 1-13.
- Levin, S., Galbraith, D., Sela, N., Erez, T., Grozinger, C. M., & Chejanovsky, N. (2017). Presence of Apis rhabdovirus-1 in populations of pollinators and their parasites from two continents. *Frontiers in microbiology*, 8, 2482.
- Levin, S., Sela, N., & Chejanovsky, N. (2016). Two novel viruses associated with the *Apis mellifera* pathogenic mite *Varroa destructor*. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Levin, S., Sela, N., Erez, T., Nestel, D., Pettis, J., Neumann, P., & Chejanovsky, N. (2019). New viruses from the ectoparasite mite *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Viruses*, 11(2), 94.
- Li, A. Y., Cook, S. C., Sonenshine, D. E., Posada-Florez, F., Noble, N. I., Mowery, J., et al. (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.
- Li, M., Rothwell, R., Vermaat, M., Wachsmuth, M., Schröder, R., Laros, J. F., et al. (2016). Transmission of human mtDNA heteroplasmy in the Genome of the Netherlands families: support for a variable-size bottleneck. *Genome research*, 26(4), 417-426.
- Li, Z. B., Cheng, T. Y., Xu, X. L., Song, L. L., & Liu, G. H. (2017). Genetic variation in mitochondrial genes of the tick *Haemaphysalis flava* collected from wild hedgehogs in China. *Experimental and Applied Acarology*, 71(2), 131-137.
- Li, Z. B., Fu, Y. T., Cheng, T. Y., Yao, G. M., Hou, Q. H., Li, F., et al. (2019). Mitochondrial gene heterogeneity and population genetics of *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) in China. *Acta Parasitologica*, 64(2), 360-366.
- Liendo, M. C., Muntaabski, I., Russo, R. M., Lanzavecchia, S. B., Segura, D. F., Palacio, M. A., et al. (2021). Temporal changes in volatile profiles of *Varroa destructor*-infested brood may trigger hygienic behavior in *Apis mellifera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(6), 563-574.

- Liggon, R. (2019). Observing the Cooperation of *Varroa destructor* and DNA Virus AmFV in the Onset of Colony Collapse Disorder in Emerging *Apis mellifera*.
- Lihoreau, M., Dubois, T., Gomez-Moracho, T., Kraus, S., Monchanin, C., & Pasquaretta, C. (2019). Putting the ecology back into insect cognition research. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 57, pp. 1-25). Academic Press.
- Lin, Z., Liu, Y., Chen, X., Han, C., Wang, W., Ke, Y., et al. (2020). Genome-wide identification of long non-coding RNAs in the gravid ectoparasite *Varroa destructor*. *Frontiers in genetics*, 1271.
- Lin, Z., Qin, Y., Page, P., Wang, S., Li, L., Wen, Z., et al. (2018). Reproduction of parasitic mites *Varroa destructor* in original and new honeybee hosts. *Ecology and evolution*, 8(4), 2135-2145.
- Lindauer, M. (1952). Ein beitrag zur frage der arbeitsteilung im bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 34(4), 299-345.
- Lipsitch, M., Siller, S., & Nowak, M. A. (1996). The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution*, 50(5), 1729-1741.
- Lister, R., Gregory, B. D., & Ecker, J. R. (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Current opinion in plant biology*, 12(2), 107-118.
- Liu, Z. Q., Liu, Y. F., Kuermanali, N., Wang, D. F., Chen, S. J., Guo, H. L., et al. (2018). Sequencing of complete mitochondrial genomes confirms synonymization of *Hyalomma asiaticum asiaticum* and *kozlovi*, and advances phylogenetic hypotheses for the Ixodidae. *PloS one*, 13(5), e0197524.
- 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., & 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., & Spreafico, M. (1995). Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*, 26(1), 67-72.
- Lohse, M., Drechsel, O., Kahlau, S., & Bock, R. (2013). OrganellarGenomeDRAW—a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic acids research*, 41(W1), W575-W581.
- Lotfi, A., Jamshidi, R., Aghdam Shahryar, H., & Yousefkhani, M. (2009). The prevalence of nosemosis in honey bee colonies in Arasbaran region (Northwestern Iran). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5(2), 255-257.
- Lum, L., & Beachy, P. A. (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *science*, 304(5678), 1755-1759.
- Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., et al. (2018). Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(51), 13039-13044.

- Maggi, M. D., Ruffinengo, S. R., Damiani, N., Sardella, N. H., & 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., & 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., et al. (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., et al. (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.
- Magnus, R. M., Tripodi, A. D., & Szalanski, A. L. (2011). Mitochondrial DNA diversity of honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from queen breeders in the United States. *Journal of Apicultural Science*, 55(1), 5-14.
- Magnus, R. M., Tripodi, A. D., & Szalanski, A. L. (2014). Mitochondrial DNA diversity of honey bees (*Apis mellifera*) from unmanaged colonies and swarms in the United States. *Biochemical genetics*, 52(5), 245-257.
- MAGYP. (2021). Estimaciones Agrícolas. Subsecretaria de Agricultura, Dirección Nacional de Agricultura, Dirección de Estimaciones Agrícolas.
- Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., et al. (2007). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra-and inter-species recombination. *Journal of General Virology*, 88(12), 3428-3438.
- Marcangeli, J. A. (2000). Aplicación de una nueva técnica para determinar los niveles de infección de *Varroa jacobsoni* en colmenas de *Apis mellifera*. *Natura Neotropicalis*, 31(1-2), 81-85.
- Marcangeli, J. A., Eguaras, M. J., & Fernandez, N. A. (1992). Reproduction of *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata: Varroidae) in temperate climates of Argentina. *Apidologie*, 23(1), 57-60.
- Mariani, F., Maggi, M., Porrini, M., Fuselli, S., Caraballo, G., Brasesco, C., et al. (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., & 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.
- Marr, E. J., Sargison, N. D., Nisbet, A. J., & Burgess, S. T. (2015). Gene silencing by RNA interference in the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Molecular and cellular probes*, 29(6), 522-526.
- Martin, S. J. (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental & applied acarology*, 18(2), 87-100.

- Martin, S. J. (2001). *Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK. *Experimental & applied acarology*, 25(4), 321-325.
- Martin, S. J., & Brettell, L. E. (2019). Deformed wing virus in honeybees and other insects. *Annu. Rev. Virol*, 6(1), 49-69.
- Martin, S. J., Hawkins, G. P., Brettell, L. E., Reece, N., Correia-Oliveira, M. E., & Allsopp, M. H. (2020). *Varroa destructor* reproduction and cell re-capping in mite-resistant *Apis mellifera* populations. *Apidologie*, 51(3), 369-381.
- Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., et al. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086), 1304-1306.
- Martínez Fhürer, C., & 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).
- Masta, S. E. (2000). Mitochondrial sequence evolution in spiders: intraspecific variation in tRNAs lacking the TΨC arm. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7), 1091-1100.
- Mastrantonio, V., Latrofa, M. S., Porretta, D., Lia, R. P., Parisi, A., Iatta, R., et al. (2019). Paternal leakage and mtDNA heteroplasmy in Rhipicephalus spp. ticks. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.
- Mayagoitia Penagos, M., & Otero Molina, G. (1995). Niveles de infestación y tasa reproductiva de *Varroa jacobsoni* en abejas africanas, europeas e híbridos. Memorias del VII seminario Americano de Apicultura, Colima.
- McAfee, A., Chan, Q. W., Evans, J., & Foster, L. J. (2017). A *Varroa destructor* protein atlas reveals molecular underpinnings of developmental transitions and sexual differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(12), 2125-2137.
- McCarthy, D. J., Chen, Y., & Smyth, G. K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic acids research*, 40(10), 4288-4297.
- McClure, C., McPeak, M. B., Youssef, D., Yao, Z. Q., McCall, C. E., & El Gazzar, M. (2017). Stat3 and C/EBPβ synergize to induce miR-21 and miR-181b expression during sepsis. *Immunology and cell biology*, 95(1), 42-55.
- Medici, S. K., Maggi, M. D., Sarlo, E. G., Ruffinengo, S., Marioli, J. M., & 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.
- Meraner, A., Brandstätter, A., Thaler, R., Aray, B., Unterlechner, M., Niederstätter, H., et al. (2008). Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: I. Ancient clade splitting revealed by mitochondrial haplotype markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3), 825-837.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews genetics*, 10(3), 155-159.
- 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).

- Message, D., & Goncalves, L. S. (1980). Efeito das condicoes climaticas a da colonia no compotamento higienico em abelhas *Apis mellifera* (africanizadas). In *Anais do 5º Congresso Brasileiro de Apicultura (Minas Gerais)* (p. 55).
- Michel, A. P., Grushko, O., Guelbeogo, W. M., Lobo, N. F., Sagnon, N. F., Costantini, C., & Besansky, N. J. (2006). Divergence with gene flow in *Anopheles funestus* from the Sudan Savanna of Burkina Faso, West Africa. *Genetics*, *173*(3), 1389-1395.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). JHU press.
- Miki, D., & Shimamoto, K. (2004). Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology*, *45*(4), 490-495.
- Milani, N., & Chiesa, F. (1990). Some factors affecting the reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. under laboratory conditions. *Apicultura*, (6), 33-42.
- Millán-Leiva, A., Marín, Ó., De la Rúa, P., Muñoz, I., Tsagkarakou, A., Eversol, H., *et al.* (2021). Mutations associated with pyrethroid resistance in the honey bee parasite *Varroa destructor* evolved as a series of parallel and sequential events. *Journal of Pest Science*, *94*(4), 1505-1517.
- Momot, J. P., & Rothenbuhler, W. C. (1971). Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *Journal of Apicultural Research*, *10*(1), 11-21.
- Mondal, M., Klimov, P., & Flynt, A. S. (2018). Rewired RNAi-mediated genome surveillance in house dust mites. *PLoS genetics*, *14*(1), e1007183.
- Mondet, F., Beaufrepaire, A., McAfee, A., Locke, B., Alaux, C., Blanchard, S., *et al.* (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.
- Mondet, F., Rau, A., Klopp, C., Rohmer, M., Severac, D., Le Conte, Y., & Alaux, C. (2018). Transcriptome profiling of the honeybee parasite *Varroa destructor* provides new biological insights into the mite adult life cycle. *BMC genomics*, *19*(1), 1-19.
- Mondragón, L., Spivak, M., & 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., & Piola, G. A. (1976). A new enemy of bees. *Varroasis, a honey bee disease*. *Apimondia Publishing House, Bucharest*, 36-38.
- Moon, J. S., Domier, L. L., McCoppin, N. K., D'Arcy, C. J., & Jin, H. (1998). Nucleotide Sequence Analysis Shows that *Rhopalosiphum padi* Virus Is a Member of a Novel Group of Insect-Infecting RNA Viruses. *Virology*, *243*(1), 54-65.
- Moretto, G., Gonçalves, L. S., & Dejong, D. (1993). HERITABILITY OF AFRICANIZED AND EUROPEAN HONEY-BEE DEFENSIVE BEHAVIOR AGAINST THE MITE VARROA-JACOBSONI. *Revista Brasileira de Genetica*, *16*(1), 71-77.
- Moretto, G., Gonçalves, L. S., & Jong, D. D. (1991). Africanized bees are more efficient at removing *Varroa jacobsoni*: Preliminary data. *American bee journal (USA)*.

- Muhammad, I. I., Kong, S. L., Akmar Abdullah, S. N., & Munusamy, U. (2020). RNA-seq and ChIP-seq as complementary approaches for comprehension of plant transcriptional regulatory mechanism. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 167.
- Munoz-Torres, M. C., Reese, J. T., Childers, C. P., Bennett, A. K., Sundaram, J. P., Childs, K. L., *et al* (2010). Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic acids research*, 39(suppl\_1), D658-D662.
- Muntaabski, I., Scannapieco, A. C., Liendo, M. C., Niz, J. M., Russo, R., & Salvador, R. (2022). Bacterially expressed dsRNA induces *Varroa destructor* gene knockdown by honey bee-mediated oral administration. *Journal of Apicultural Research*, 1-8.
- Muntaabski, I., Latorre Estivalis, J., Russo, R., Landi, L., Agra, M., Liendo, M. C., Lanzavecchia, S., & Scannapieco, A. C. (2022). Candidate genes and molecular pathways associated with *Varroa destructor* reproductive success. *Scientific Reports*, en prensa.
- Muñoz, I., Garrido-Bailón, E., Martín-Hernández, R., Meana, A., Higes, M., & De la Rúa, P. (2008). Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies. *Journal of apicultural research*, 47(4), 310-313.
- 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.
- Napoli, C.; Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 2: 279-289.
- 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., & 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., & Le Conte, Y. (2010). New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie*, 41(2), 181-193.
- Navajas, M., Conte, Y. L., Solignac, M., Cros-Arteil, S., & Cornuet, J. M. (2002). The complete sequence of the mitochondrial genome of the honeybee ectoparasite mite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). *Molecular biology and evolution*, 19(12), 2313-2317.
- Nazzi, F., & Le Conte, Y. (2016). Ecology of *Varroa destructor*, the major ectoparasite of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Annu. Rev. Entomol*, 61(1), 417-432.
- Nazzi, F., & Milani, N. (1994). A technique for reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud under laboratory conditions. *Apidologie*, 25(6), 579-584.
- Neumann, P., Yañez, O., Fries, I., & de Miranda, J. R. (2012). *Varroa* invasion and virus adaptation. *Trends in parasitology*, 28(9), 353-354.
- Nganso, B. T., Sela, N., & Soroker, V. (2020). A genome-wide screening for RNAi pathway proteins in Acari. *BMC genomics*, 21(1), 1-16.

- Nguyen, D. V., Christiaens, O., Bossier, P., & Smagghe, G. (2018). RNA interference in shrimp and potential applications in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 573-584.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1028-1042.
- Nikam, R. R., & Gore, K. R. (2018). Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic acid therapeutics*, 28(4), 209-224.
- Niu, J., Taning, C. N. T., Christiaens, O., Smagghe, G., & Wang, J. J. (2018). Rethink RNAi in insect pest control: challenges and perspectives. *Advances in insect physiology*, 55, 1-17.
- Noël, A., Le Conte, 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.
- Nunes, M. D., Dolezal, M., & Schlötterer, C. (2013). Extensive paternal mt DNA leakage in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular ecology*, 22(8), 2106-2117.
- 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.
- Nykänen, A., Haley, B., & Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107(3), 309-321.
- Oddie, M., Büchler, R., Dahle, B., Kovacic, M., Le Conte, Y., Locke, B., et al. (2018). Rapid parallel evolution overcomes global honey bee parasite. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8), 312-315.
- Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., et al. (2008). Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus research*, 132(1-2), 59-68.
- Ongus, J. R., Peters, D., Bonmatin, J. M., Bengsch, E., Vlak, J. M., & van Oers, M. M. (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 85(12), 3747-3755.
- Ongus, J. R., Peters, D., Bonmatin, J. M., Bengsch, E., Vlak, J. M., & van Oers, M. M. (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 85(12), 3747-3755.
- Orantes Bermejo, F., Garcia Fernandez, P., & Benitez Rodriguez, R. (1994). Population change of *Varroa* in bee colonies in Southern Spain. *Vida Apicola (Espana)*.
- Oudemans, A. C. (1904). On a new genus and species of parasitic acari. *Notes from the Leyden Museum*, 24(4), 216-222.
- Oxley, P. R., Spivak, M., & Oldroyd, B. P. (2010). Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 19(7), 1452-1461.
- Palacio, A. & Bedascarrasbure, E. (1998). Orígenes de las abejas. *Revista Super Campo* 4(45): 23-24.

- Palacio, M. A., Rodriguez, E., Goncalves, L., Bedascarrasbure, E., & 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.
- Pan, Q., Ramakrishnaiah, V., Henry, S., Fouraschen, S., de Ruiter, P. E., Kwekkeboom, J., *et al.* (2012). Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi). *Gut*, *61*(9), 1330-1339.
- Panini, M., Reguzzi, M. C., Chiesa, O., Cominelli, F., Lupi, D., Moores, G., & Mazzoni, E. (2019). Pyrethroid resistance in Italian populations of the mite *Varroa destructor*: a focus on the Lombardy region.
- Panziera, D., van Langevelde, F., & Blacquièrre, T. (2017). *Varroa* sensitive hygiene contributes to naturally selected *varroa* resistance in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, *56*(5), 635-642.
- Parakatselaki, M. E., & Ladoukakis, E. D. (2021). mtDNA Heteroplasmy: Origin, Detection, Significance, and Evolutionary Consequences. *Life*, *11*(7), 633.
- Payne, B. A., Wilson, I. J., Yu-Wai-Man, P., Coxhead, J., Deehan, D., Horvath, R., *et al.* (2013). Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA. *Human molecular genetics*, *22*(2), 384-390.
- Pérez-Sato, J. A., Châline, N., Martin, S. J., Hughes, W. O. H., & Ratnieks, F. L. (2009). Multi-level selection for hygienic behaviour in honeybees. *Heredity*, *102*(6), 609-615.
- Pernal, S. F., Baird, D. S., Birmingham, A. L., Higo, H. A., Slessor, K. N., & Winston, M. L. (2005). Semochemicals influencing the host-finding behaviour of *Varroa destructor*. *Experimental & 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.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, *29*(9), e45-e45.
- Pinto, M. A., Johnston, J. S., Rubink, W. L., Coulson, R. N., Patton, J. C., & Sheppard, W. S. (2003). Identification of Africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae) mitochondrial DNA: validation of a rapid polymerase chain reaction-based assay. *Annals of the Entomological Society of America*, *96*(5), 679-684.
- Pinto, M. A., Rubink, W. L., Coulson, R. N., Patton, J. C., & Johnston, J. S. (2004). Temporal pattern of Africanization in a feral honeybee population from Texas inferred from mitochondrial DNA. *Evolution*, *58*(5), 1047-1055.
- Pisa, V., Cozzolino, M., Gargiulo, S., Ottone, C., Piccioni, F., Monti, M., *et al.* (2009). The molecular chaperone Hsp90 is a component of the cap-binding complex and interacts with the translational repressor Cup during *Drosophila* oogenesis. *Gene*, *432*(1-2), 67-74.
- Politi, Y., Bar-On, B., & Fabritius, H. O. (2019). Mechanics of arthropod cuticle-versatility by structural and compositional variation. In *Architected Materials in Nature and Engineering* (pp. 287-327). Springer, Cham.
- Politi, Y., Gal, L., Kalifa, Y., Ravid, L., Elazar, Z., & Arama, E. (2014). Paternal mitochondrial destruction after fertilization is mediated by a common endocytic and autophagic pathway in *Drosophila*. *Developmental cell*, *29*(3), 305-320.

- Polovina, E. S., Parakatselaki, M. E., & Ladoukakis, E. D. (2020). Paternal leakage of mitochondrial DNA and maternal inheritance of heteroplasmy in *Drosophila* hybrids. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.
- Porrini, L. P., Quintana, S., Brasesco, C., Porrini, M. P., Garrido, P. M., Eguaras, M. J., *et al.* (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., *et al.* (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., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & 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., *et al.* (2017). Coumaphos residues in honey, bee brood, and beeswax after *Varroa* treatment. *Apidologie*, 48(5), 588-598.
- Pridgeon, J. W., Zhao, L., Becnel, J. J., Strickman, D. A., Clark, G. G., & Linthicum, K. J. (2014). Topically applied AaelAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *Journal of medical entomology*, 45(3), 414-420.
- Puglise, J. M., Estep, A. S., & Becnel, J. J. (2016). Expression profiles and RNAi silencing of Inhibitor of Apoptosis transcripts in *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 53(2), 304-314.
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., *et al.* (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, 13(1), 1-13.
- Råberg, L., Sim, D., & Read, A. F. (2007). Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science*, 318(5851), 812-814.
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., *et al.* (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792-1801.
- Rath, W., & 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.
- Rau, A., Gallopin, M., Celeux, G., & Jaffrézic, F. (2013). Data-based filtering for replicated high-throughput transcriptome sequencing experiments. *Bioinformatics*, 29(17), 2146-2152.
- Ravoet, J., De Smet, L., Wenseleers, T., & De Graaf, D. C. (2015). Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. *Virus Research*, 201, 67-72.
- Reams, T., & 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., & 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., Blacqui re, T., Holmes, E. C., Beekman, M., & Ashe, A. (2017). A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *Journal of Virology*, 91(16), e00158-17.
- Requier, F., Ant nez, K. (2020). P rdidas de colmenas en Latinoam rica. Resultados: 2016/2017 SOLATINA (Sociedad Latinoamericana de Instigaci n en Abejas) <https://solatina.org/perdi-das-2016-2017/> Accessed 20 August 2020
- Rewitz, K. F., Rybczynski, R., Warren, J. T., & Gilbert, L. I. (2006). The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochemical Society Transactions*, 34(6), 1256-1260.
- Reynaldi, F. J., Sguazza, G. H., Pecoraro, M. R., Tizzano, M. A., & Galosi, C. M. (2010). First report of viral infections that affect argentine honeybees. *Environmental Microbiology Reports*, 2(6), 749-751.
- Richards, E. H., Jones, B., & Bowman, A. (2011). Salivary secretions from the honeybee mite, *Varroa destructor*: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology*, 138(5), 602-608.
- Rinderer, T. E., de Guzman, L. I., Delatte, G. T., Stelzer, J. A., Lancaster, V. A., Kuznetsov, V. I. C. T. O. R., et al. (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.
- Roberts, J. M. K., Anderson, D. L., & Tay, W. T. (2015). Multiple host shifts by the emerging honeybee parasite, *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology*, 24(10), 2379-2391.
- Roberts, J. M., Simbiken, N., Dale, C., Armstrong, J., & Anderson, D. L. (2020). Tolerance of honey bees to Varroa mite in the absence of deformed wing virus. *Viruses*, 12(5), 575.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Robison, G. A., Balvin, O., Schal, C., Vargo, E. L., & Booth, W. (2015). Extensive mitochondrial heteroplasmy in natural populations of a resurging human pest, the bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of medical entomology*, 52(4), 734-738.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., & Zouros, E. (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(8), 411-417.
- Romano, N. and Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6: 3343-3353.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S96-S119.
- Rosenkranz, P., Kirsch, R., & 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, Ribeir o 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.
- Rothenbuhler, W. C. (1964). Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Animal behaviour*, 12(4), 578-583.
- 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., et al. (2014). Integrated Pest Management to control *Varroa destructor* and its implications to *Apis mellifera* colonies. *Zootecnia Tropical*, 32(2), 149-168.
- Ruffinengo, S. R., Maggi, M. D., Marcangeli, J. A., Eguaras, M. J., Principal, J., Barrios, C., et al. (2014). Integrated Pest Management to control *Varroa destructor* and its implications to *Apis mellifera* colonies. *Zootecnia Tropical*, 32(2), 149-168.
- Ruijter, A. D., & Kaas, J. P. (1983). Anatomy of the Varroa-mite. In *Varroa jacobsoni Oud. affecting honey bees: present status and needs: proceedings of a meeting of the EC Experts' Group, Wageningen, 7-9 February 1983/edited by R. Cavalloro*. Rotterdam: Published for the Commission of the European Communities by AA Balkema.
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R., & DeRisi, J. L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS one*, 6(6), e20656.
- Russo, R. M., Liendo, M. C., Landi, L., Pietronave, H., Merke, J., Fain, H., et al. (2020). Grooming behavior in naturally Varroa-resistant *Apis mellifera* colonies from north-central Argentina. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 361.
- 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., & Hänel, H. (1992). Active defense against Varroa mites in a Carniolan strain of honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie*, 23(2), 173-187.
- Ruttner, F., Tassencourt, L., & Louveaux, J. (1978). Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* LI Material and methods. *Apidologie*, 9(4), 363-381.
- Sagi, A., Manor, R., & Ventura, T. (2013). Gene silencing in crustaceans: from basic research to biotechnologies. *Genes*, 4(4), 620-645.
- Salina, M. D., Garcia, M. L. G., Bais, B., Bravi, M. E., Brasesco, C., Maggi, M., et al. (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.
- Sambrook, H. C. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sammataro, D., Gerson, U., & 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., & 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.
- Sanabria, J. L. (2007). *Índices de infestación, estatus racial y expresión de mecanismos de resistencia en colmenas sin control antivarroa* (Doctoral dissertation, Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana (UNAH)).
- Sanchez, C., Castignani, H., & Rabaglio, M. D. (2018). El mercado apícola internacional.
- Santillán-Galicia, M. T., Ball, B. V., Clark, S. J., & 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., & Cornejo, L. G. (1968). La abeja africana *Apis* (*Apis*) *adansonii* en América del Sur.. *Revista de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de La Plata (Argentina)*, 44(1), 17-35.
- Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(8), 1979-1984.
- Savard, J., Tautz, D., Richards, S., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Werren, J. H., et al. (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., & Palacio, M. A. (2016). Individual precocity, temporal persistence and taskspecialization of hygienic bees from selected colonies of *Apis mellifera*.
- Scannapieco, A. C., Mannino, M. C., Soto, G., Palacio, M. A., Cladera, J. L., & 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.
- Schiff, N. M., & 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, R., Salathé, R., Tognazzo, M., & Schmid-Hempel, P. (2011). Genetic exchange and emergence of novel strains in directly transmitted trypanosomatids. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 564-571.
- Schwartz, M., & Vissing, J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine*, 347(8), 576-580.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2002). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), 199-208.

- Scott Schneider, S., DeGrandi-Hoffman, G., & Smith, D. R. (2004). The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion.”
- Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., *et al.* (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of insect physiology*, 59(12), 1212-1221.
- Seeley, T.D. (1995). The wisdom of the hive. *Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.*
- Senapedis, W. T., Kennedy, C. J., Boyle, P. M., & Silver, P. A. (2011). Whole genome siRNA cell-based screen links mitochondria to Akt signaling network through uncoupling of electron transport chain. *Molecular biology of the cell*, 22(10), 1791-1805.
- Setten, R. L., Rossi, J. J., & Han, S. P. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(6), 421-446.
- Sguazza, G. H., Reynaldi, F. J., Galosi, C. M., & Pecoraro, M. R. (2013). Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 194(1-2), 102-106.
- Sheppard, W. S., Rinderer, T. E., Garnery, L., & Shimanuki, H. (1999). Analysis of Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin. *Genetics and Molecular Biology*, 22, 73-75.
- Sheppard, W. S., Soares, A. E. E., DeJong, D., & Shimanuki, H. (1991). Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie*, 22(6), 643-652.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Simone, M., Evans, J. D., & 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.
- Singh, N. K., Eliash, N., Stein, I., Kamer, Y., Ilia, Z., Rafaeli, A., & Soroker, V. (2016). Identification and gene-silencing of a putative odorant receptor transcription factor in *V. arvoa* destructor: possible role in olfaction. *Insect molecular biology*, 25(2), 181-190.
- 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, D. R., & Brown, W. M. (1988). Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia*, 44(3), 257-260.
- Smith, D. R., Crespi, B. J., & Bookstein, F. L. (1997). Fluctuating asymmetry in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of ploidy and hybridization. *Journal of Evolutionary Biology*, 10(4), 551-574.
- Smith, D. R., Palopoli, M. F., Taylor, B. R., Garnery, L., Cornuet, J. M., Solignac, M., & Brown, W. M. (1991). Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, 82(2), 96-100.
- Smith, D. R., Taylor, O. R., & Brown, W. M. (1989). Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA. *Nature*, 339(6221), 213-215.

- Solignac, M., Cornuet, J. M., Vautrin, D., Le Conte, Y., Anderson, D., Evans, J., *et al.* (2005). The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1561), 411-419.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *science*, 305(5689), 1434-1437.
- Song, Y., Fee, L., Lee, T. H., & Wharton, R. P. (2007). The molecular chaperone Hsp90 is required for mRNA localization in *Drosophila melanogaster* embryos. *Genetics*, 176(4), 2213-2222.
- Southwick, E. E., & 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., & Danka, R. G. (2021). Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. *Apidologie*, 52(1), 1-16.
- Spivak, M., & 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., & Gilliam, M. (1998a). 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., & Reuter, G. S. (1998). Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie*, 29(3), 291-302.
- Spivak, M., & 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., & 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., Fletcher, D. J., & Breed, M. D. (2019). *The African honey bee*. CRC Press.
- Stanimirović, Z., Glavinić, U., Ristanić, M., Aleksić, N., Jovanović, N., Vejnović, B., & Stevanović, J. (2019). Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. *Acta Veterinaria*, 69(1), 1-31.
- Steijger, T., Abril, J. F., Engström, P. G., Kokocinski, F., Hubbard, T. J., Guigó, R., *et al.* (2013). Assessment of transcript reconstruction methods for RNA-seq. *Nature methods*, 10(12), 1177-1184.
- Steiner, J. (1995). Leg formation in the honeybee broodmite *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae). *Entomologia generalis*, 179-183.
- Steiner, J., & Diehl, P. (1994). 83. Oogenese und Oosorption bei *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 25(5), 501-503.

- Steiner, J., Diehl, P. A., & Vlimant, M. (1995). Vitellogenesis in *Varroa jacobsoni*, a parasite of honey bees. *Experimental & applied acarology*, 19(7), 411-422.
- STEINER, J., DITTMANN, F., ROSENKRANZ, P., & ENGELS, W. (1994). The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Invertebrate reproduction & development*, 25(3), 175-183.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Radakovic, M., & Kovacevic, S. R. (2010). Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses. *Russian Journal of Genetics*, 46(5), 603-609.
- Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2021). Extreme heterogeneity of human mitochondrial DNA from organelles to populations. *Nature Reviews Genetics*, 22(2), 106-118.
- Strapazzon, R., Carneiro, F. E., Guerra Jr, J. C. V., & Moretto, G. (2009). Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 990-997.
- Stroeymeyt, N., Casillas-Pérez, B., & Cremer, S. (2014). Organisational immunity in social insects. *Current Opinion in Insect Science*, 5, 1-15.
- Sumpter, D. J., & Martin, S. J. (2004). The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 73(1), 51-63.
- Tabara, H., M. Sarkissian, W. G. Kelly, J. Fleenor, A. Grishok, L. Timmons, A. Fire, and C. C. Mello. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99:123-132
- Taylor Jr, O. R. (1977). The past and possible future spread of Africanized honeybees in the Americas. *Bee World*, 58(1), 19-30.
- Team, R. C. (2017). R: A language and environment for statistical computing.
- Techer, M. A., Rane, R. V., Grau, M. L., Roberts, J. M., Sullivan, S. T., Liachko, I., et al. (2019). Divergent evolutionary trajectories following speciation in two ectoparasitic honey bee mites. *Communications biology*, 2(1), 1-16.
- Techer, M. A., Roberts, J. M., Cartwright, R. A., & Mikheyev, A. S. (2022). The first steps toward a global pandemic: Reconstructing the demographic history of parasite host switches in its native range. *Molecular ecology*, 31(5), 1358-1374.
- Tewarson, N. C. (1982). Immunocytochemical localization of host (*Apis mellifera*) proteins in growing oocytes of a hemophagous mite (*Varroa jacobsoni*) by the unlabeled antibody—enzyme (PAP) method. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 5(6), 345-348.
- Thom, C., Gilley, D. C., Hooper, J., & Esch, H. E. (2007). The scent of the waggle dance. *PLoS biology*, 5(9), e228.
- Tong, S. M., & Feng, M. G. (2019). Insights into regulatory roles of MAPK-cascaded pathways in multiple stress responses and life cycles of insect and nematode mycopathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(2), 577-587.
- Trabalon, M., & Garcia, C. F. (2021). Transport pathways of hydrocarbon and free fatty acids to the cuticle in arthropods and hypothetical models in spiders. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 252, 110541.

- Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A., *et al.* (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., & Vighi, M. (2004). Coumaphos distribution in the hive ecosystem: Case study for modeling applications. *Ecotoxicology*, 13(6), 589-601.
- Tsuruda, J. M., Harris, J. W., Bourgeois, L., Danka, R. G., & Hunt, G. J. (2012). High-resolution linkage analyses to identify genes that influence *Varroa* sensitive hygiene behavior in honey bees. *PLoS One*, 7(11), e48276.
- Uboni, A., Bagnères, A. G., Christidès, J. P., & 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.
- Ujvari, B., Dowton, M., & Madsen, T. (2007). Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. *Biology Letters*, 3(2), 189-192.
- Ulrich, G. M., & Rembold, H. (1983). Caste-specific maturation of the endocrine system in the female honey bee larva. *Cell and tissue research*, 230(1), 49-55.
- Van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J. J., van Langevelde, F., & 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 Leeuwen, T. (2008). *Discourse and practice: New tools for critical discourse analysis*. Oxford university press.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., & Tirry, L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40(8), 563-572.
- Vandame, R., Otero-Colina, G., & 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.
- VanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., *et al.* (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*, 4(8), e6481.
- Vetharanim, I. (2012). Predicting reproduction rate of varroa. *Ecológica Modelling*, 224(1), 11-17.
- Vilarem, C., Piou, V., Vogelweith, F., & 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., & Harris, J. W. (2009). Simplified methods of evaluating colonies for levels of *Varroa* Sensitive Hygiene (VSH). *Journal of apicultural research*, 48(3), 162-167.
- Visintini, M., Pacini, A., Merke, J., Scannapieco, A., Molineri, A., Orellano, E., *et al.* (2021). Field evaluation of *Varroa*-resistance traits in surviving *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Parasitology research*, 120(12), 4013-4021.
- Visintini, M., Pacini, A., Merke, J., Scannapieco, A., Molineri, A., Orellano, E., *et al.* (2021). Field evaluation of *Varroa*-resistance traits in surviving *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Parasitology research*, 120(12), 4013-4021.

- Vlogiannitis, S., Jonckheere, W., Laget, D., de Graaf, D. C., Vontas, J., & Van Leeuwen, T. (2021). Pyrethroid target-site resistance mutations in populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from Flanders, Belgium. *Experimental and Applied Acarology*, *85*(2), 205-221.
- Vlogiannitis, S., Mavridis, K., Dermauw, W., Snoeck, S., Katsavou, E., Morou, E., *et al.* (2021). Reduced proinsecticide activation by cytochrome P450 confers coumaphos resistance in the major bee parasite *Varroa destructor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(6).
- Von Frisch, K. (1967). The dance language and orientation of bees. *Harvard University Press*, 566.
- Wallberg, A., Han, F., Wellhagen, G., Dahle, B., Kawata, M., Haddad, N., *et al.* (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., & Fries, I. (2003). Control of the mite *Varroa destructor* in honey bee colonies. *Pesticide Outlook*, *14*(2), 80-84.
- Wang, C., Tan, S., Liu, W. R., Lei, Q., Qiao, W., Wu, Y., *et al.* (2019). RNA-Seq profiling of circular RNA in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Molecular cancer*, *18*(1), 1-6.
- Wang, E., & Hunter, C. P. (2017). SID-1 functions in multiple roles to support parental RNAi in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *207*(2), 547-557.
- Wang, L., Feng, Z., Wang, X., Wang, X., & Zhang, X. (2010). DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, *26*(1), 136-138.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, *10*(1), 57-63.
- Ward, J. A., Ponnala, L., & Weber, C. A. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American journal of botany*, *99*(2), 267-276.
- Warrit, N., Smith, D. R., & Lekprayoon, C. (2006). Genetic subpopulations of *Varroa* mites and their *Apis cerana* hosts in Thailand. *Apidologie*, *37*(1), 19-30.
- Wassenegger, M. (2002). Gene silencing-based disease resistance. *Transgenic research*, *11*(6), 639-653.
- 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., & Bienefeld, K. (2016). Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Journal of insect physiology*, *91*, 1-9.
- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Worley, K. C., Evans, J. D., Maleszka, R., *et al.* (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, *443*(7114), 931-949.
- Wen, M., Peng, L., Hu, X., Zhao, Y., Liu, S., & Hong, Y. (2016). Transcriptional quiescence of paternal mtDNA in cyprinid fish embryos. *Scientific reports*, *6*(1), 1-7.
- White, D. J., Wolff, J. N., Pierson, M., & Gemmell, N. J. (2008). Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology*, *17*(23), 4925-4942.

- Whitfield, C. W., Behura, S. K., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Johnston, J. S., Sheppard, W. S., *et al.* (2006). Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314(5799), 642-645.
- Wilkinson, D., & 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., & 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. (1991). *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.
- 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., & Tarpy, D. R. (2018, November). Sharing the throne: Polygynous honey bee (*Apis mellifera*) colonies. In *Entomology 2018*. ESA.
- Wolff, J. N., Nafisinia, M., Sutovsky, P., & Ballard, J. W. O. (2013). Paternal transmission of mitochondrial DNA as an integral part of mitochondrial inheritance in metapopulations of *Drosophila simulans*. *Heredity*, 110(1), 57-62.
- Woyke, J. (1962). Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World*, 43(1), 21-25.
- Wu, J., Elsheikha, H. M., Tu, Y., Getachew, A., Zhou, H., Zhou, C., & Xu, S. (2020). Significant transcriptional changes in mature daughter *Varroa destructor* mites during infestation of different developmental stages of honeybees. *Pest Management Science*, 76(8), 2736-2745.
- Wulff, J. P., Segura, D. F., Devescovi, F., Muntaabski, I., Milla, F. H., Scannapieco, A. C., *et al.* (2021). Identification and characterization of soluble binding proteins associated with host foraging in the parasitoid wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. *PloS one*, 16(6), e0252765.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*, 80(1), 75-84.
- Xiong, H., Barker, S. C., Burger, T. D., Raoult, D., & Shao, R. (2013). Heteroplasmy in the mitochondrial genomes of human lice and ticks revealed by high throughput sequencing. *PloS one*, 8(9), e73329.
- Xu, J., Shu, J., & Zhang, Q. (2010). Expression of the *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) hsp83 gene and its relation to oogenesis during ovarian maturation. *Journal of Genetics and Genomics*, 37(8), 513-522.
- Xu, J., Shu, J., Qiu, X., Wang, Z., Zhao, F., Zhang, Z., & Zhang, Q. (2009). Effects of heat shock on ovary development and hsp83 expression in *Tribolium castaneum* (Coleoptera:

Tenebrionidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 70(3), 204-216.

Yamamoto, D. S., Tachibana, K., Sumitani, M., Lee, J. M., & Hatakeyama, M. (2008). Involvement of Mos–MEK–MAPK pathway in cytostatic factor (CSF) arrest in eggs of the parthenogenetic insect, *Athalia rosae*. *Mechanisms of development*, 125(11-12), 996-1008.

Yang, X., & 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.

Yang, Z. M., Yu, N., Wang, S. J., Korai, S. K., & Liu, Z. W. (2021). Characterization of ecdysteroid biosynthesis in the pond wolf spider, *Pardosa pseudoannulata*. *Insect Molecular Biology*, 30(1), 71-80.

Yañez, O., Piot, N., Dalmon, A., De Miranda, J. R., Chantawannakul, P., Panziera, D., *et al.* (2020). Bee viruses: Routes of infection in Hymenoptera. *Frontiers in Microbiology*, 11, 943.

Yao, Z., Han, L., Chen, Y., He, F., Sun, B., Zhang, Y., *et al.* (2018). Hedgehog signalling in the tumorigenesis and metastasis of osteosarcoma, and its potential value in the clinical therapy of osteosarcoma. *Cell death & disease*, 9(6), 1-12.

Ye, N., Ding, Y., Wild, C., Shen, Q., & Zhou, J. (2014). Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1) miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, 57(16), 6930-6948.

Yevstafieva, V. O., Nazarenko, O. S., Melnychuk, V. V., Zaloznaya, L. M., & Sobolta, A. G. (2020). Morphological variation of *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidae) in different seasons. *Biosystems Diversity*, 28(1), 18-23.

Yue, L., Karr, T. L., Nathan, D. F., Swift, H., Srinivasan, S., & Lindquist, S. (1999). Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in spermatogenesis. *Genetics*, 151(3), 1065-1079.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. 2000. RNAi: doublestranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*; 101: 25-33.

Zdobnov, E. M., Tegenfeldt, F., Kuznetsov, D., Waterhouse, R. M., Simão, F. A., Ioannidis, P., *et al.* (2017). OrthoDB v9. 1: cataloging evolutionary and functional annotations for animal, fungal, plant, archaeal, bacterial and viral orthologs. *Nucleic acids research*, 45(D1), D744-D749.

Zhang, B., Liu, J., Wang, X., & Wei, Z. (2018). Full-length RNA sequencing reveals unique transcriptome composition in bermudagrass. *Plant physiology and biochemistry*, 132, 95-103.

Zhang, Y., Jiang, S., Xiong, Y., Shengming, S. U. N., Hui, Q. I. A. O., Shubo, J. I. N., *et al.* U. (2013). Molecular cloning and expression analysis of extra sex combs gene during development in *Macrobrachium nipponense*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(2).

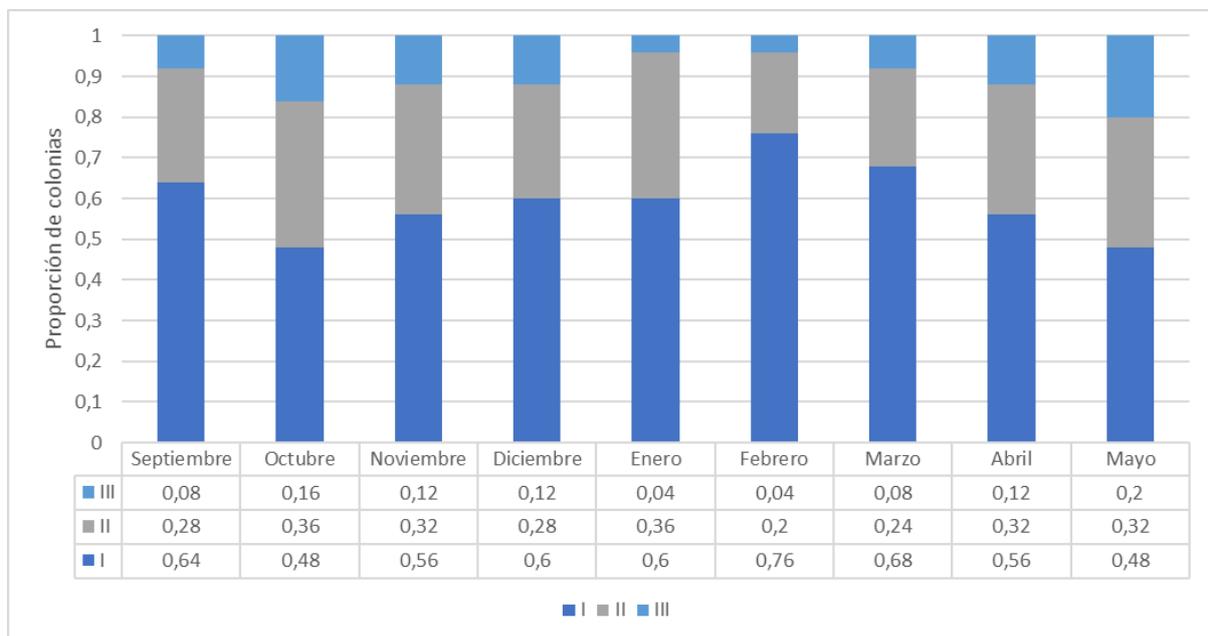
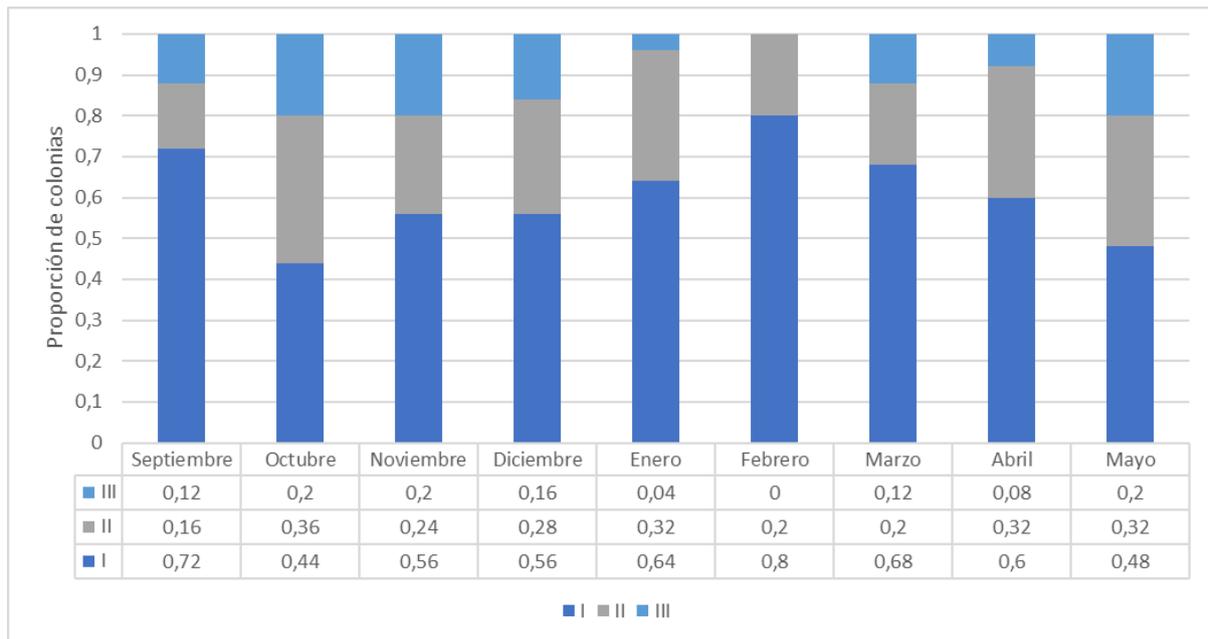
Zhao, Y., Heerman, M., Peng, W., Evans, J. D., Rose, R., DeGrandi-Hoffman, G., *et al.* (2019). The dynamics of deformed wing virus concentration and host defensive gene expression after *Varroa* mite parasitism in honey bees, *Apis mellifera*. *Insects*, 10(1), 16.

Zheng, H. Q., Gong, H. R., Huang, S. K., Sohr, A., Hu, F. L., & 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.

Zhou, T., Anderson, D. L., Huang, Z. Y., Huang, S., Yao, J., Ken, T., & Zhang, Q. (2004). Identification of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) infesting *Apis cerana* and *Apis mellifera* in China. *Apidologie*, 35(6), 645-654.

Ziegelmann, B., Lindenmayer, A., Steidle, J., & Rosenkranz, P. (2013). The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. *Apidologie*, 44(3), 314-323.

# MATERIAL SUPLEMENTARIO



**Figura Suplementaria 1.** Proporción de colonias de *A. mellifera* según su tamaño poblacional para cada mes evaluado. En colores se muestran las categorías de población: I (alta población), II (población media) y III (baja población). Dichas categorías son indicadoras de la fortaleza de la colonia. Se presentan los resultados de las temporadas 2016-2017 (arriba) y 2017-2018 (abajo).

**Tabla Suplementaria 1.** Resultados del GLMM para la evaluación de parámetros poblacionales de *A. mellifera*. Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen en qué mes es más probable encontrar una colonia en categoría I. Para cada comparación pareada entre meses se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el *Odd Ratio* (O.R.), el intervalo de confianza (I.C) y el P-valor.

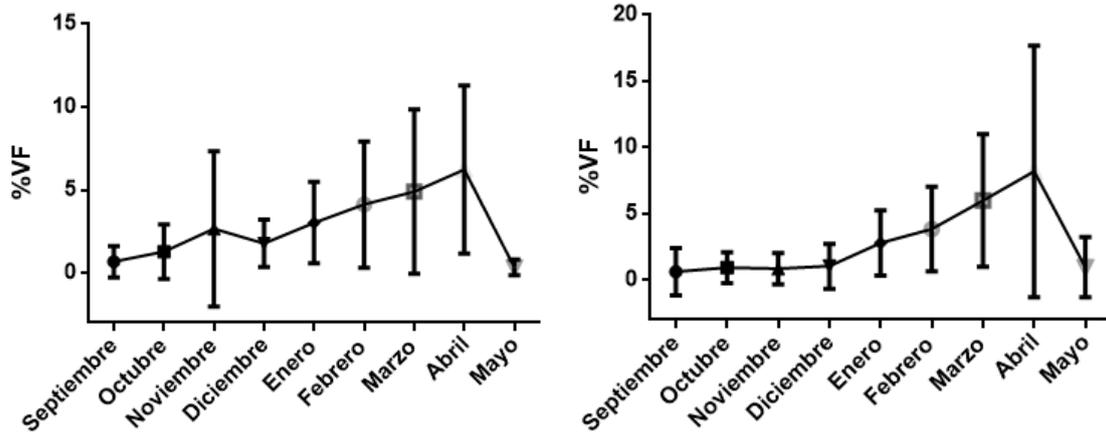
Meses	%		O.R.	I.C.		P
Abril / Diciembre	-57,600	186,000	1,101	0,424	2,860	1,000
Abril / Enero	-72,100	110,000	0,765	0,279	2,100	0,996
Abril / Febrero	-87,600	27,000	0,398	0,124	1,270	0,254
Abril / Marzo	-72,100	110,000	0,765	0,279	2,100	0,996
Abril / Mayo	-38,100	287,000	1,548	0,619	3,870	0,866
Abril / Noviembre	-53,000	210,000	1,206	0,470	3,100	1,000
Abril / Octubre	-38,100	287,000	1,548	0,619	3,870	0,866
Abril / Septiembre	-72,100	110,000	0,765	0,279	2,100	0,996
Diciembre / Enero	-74,300	88,000	0,695	0,257	1,880	0,970
Diciembre / Febrero	-88,600	15,000	0,361	0,114	1,150	0,135
Diciembre / Marzo	-74,300	88,000	0,695	0,257	1,880	0,970
Diciembre / Mayo	-43,000	247,000	1,407	0,570	3,470	0,962
Diciembre / Noviembre	-56,800	178,000	1,095	0,432	2,780	1,000
Diciembre / Octubre	-43,000	247,000	1,407	0,570	3,470	0,962
Diciembre / Septiembre	-74,300	88,000	0,695	0,257	1,880	0,970
Enero / Febrero	-84,300	72,000	0,520	0,157	1,720	0,751
Enero / Marzo	-65,000	186,000	1,000	0,350	2,860	1,000
Enero / Mayo	-22,700	429,000	2,023	0,773	5,290	0,359
Enero / Noviembre	-41,300	323,000	1,575	0,587	4,230	0,887
Enero / Octubre	-22,700	429,000	2,023	0,773	5,290	0,359
Enero / Septiembre	-65,000	186,000	1,000	0,350	2,860	1,000
Febrero / Marzo	-42,000	538,000	1,923	0,580	6,380	0,751
Febrero / Mayo	26,600	1.096,000	3,891	1,266	11,960	0,006
Febrero / Noviembre	-3,500	851,000	3,030	0,965	9,510	0,066
Febrero / Octubre	26,600	1.096,000	3,891	1,266	11,960	0,006

Febrero / Septiembre	-42,000	538,000	1,923	0,580	6,380	0,751
Marzo / Mayo	-22,700	429,000	2,023	0,773	5,290	0,359
Marzo / Noviembre	-41,300	323,000	1,575	0,587	4,230	0,887
Marzo / Octubre	-22,700	429,000	2,023	0,773	5,290	0,359
Marzo / Septiembre	-65,000	186,000	1,000	0,350	2,860	1,000
Mayo / Noviembre	-68,100	90,000	0,779	0,319	1,900	0,994
Mayo / Octubre	-57,800	137,000	1,000	0,422	2,370	1,000
Mayo / Septiembre	-81,100	29,000	0,494	0,189	1,290	0,359
Noviembre / Octubre	-47,300	213,000	1,284	0,527	3,130	0,994
Noviembre / Septiembre	-76,300	70,000	0,635	0,237	1,700	0,887
Octubre / Septiembre	-81,100	29,000	0,494	0,189	1,290	0,359

**Tabla Suplementaria 2.** Concentración e índices de calidad del ADN de *A. mellifera*. Se muestran las concentraciones de ADN (ng/μL) extraídas para cada individuo de las colonias analizadas en las dos temporadas. 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). Las letras A y B identifican las muestras de ADN de dos individuos de la misma colmena.

Temporada 1					Temporada 2				
Colonia	<i>A. mellifera</i>	ng/μL	260/280	260/230	Colonia	<i>A. mellifera</i>	ng/μL	260/280	260/230
1	A	358,55	1,83	1,67	1	A	428,73	1,89	1,96
1	B	146,22	1,71	1,63	1	B	802,8	1,9	1,74
2	A	779,38	1,94	1,67	2	A	517,05	1,93	2,30
2	B	674,53	1,92	1,9	2	B	634,36	1,92	2,41
3	A	139,17	1,76	0,63	3	A	1310,17	1,89	2,26
3	B	319,81	1,84	2	3	B	989,31	1,92	2,31
4	A	170,75	1,9	1,45	4	A	684,38	1,88	2,19
4	B	261,81	2,01	1,18	4	B	1461,11	1,92	2,27
5	A	1213,89	2,09	1,88	5	A	376,72	1,81	2,23
5	B	106,27	1,78	0,84	5	B	1252,31	1,78	2,24
6	A	129,29	1,84	0,93	6	A	708,68	1,87	2,31
6	B	154,61	1,74	0,63	6	B	1116,96	1,77	1,96
7	A	401,85	1,87	1,77	7	A	508,35	1,91	2,30
7	B	131,3	1,91	1,65	7	B	645,77	1,88	2,33
8	A	53,76	1,91	1,1	8	A	870,49	1,86	2,33
8	B	541,28	1,85	1,76	8	B	1311,73	1,88	2,21
9	A	1807,21	2,16	2,03	9	A	1577,5	1,95	2,31
9	B	999,37	2,11	1,83	9	B	900,98	1,86	2,24
10	A	1436,86	1,88	1,88	10	A	1280,96	1,96	2,31
10	B	1551,17	1,92	2,2	10	B	536,77	1,83	2,07
11	A	1075,01	1,91	2,13	11	A	654,25	1,93	2,29
11	B	552,36	1,86	1,84	11	B	727,57	1,81	2,10
12	A	1011,6	1,92	2,11	12	A	1373,83	1,90	2,20
12	B	803,71	1,95	1,7	12	B	1177,2	1,79	2,10
13	A	419,62	1,82	1,94	13	A	720,13	1,86	2,18

13	B	1346,54	1,87	1,57	13	B	599,35	1,71	2,12
14	A	1337,9	1,84	1,42	14	A	1062,96	1,80	2,15
14	B	1464,88	1,9	1,72	14	B	1004,62	1,85	2,16
15	A	425,11	1,88	1,98	15	A	844,41	1,79	2,12
15	B	802,8	1,9	1,74	15	B	538,9	1,68	2,02
16	A	1894,98	1,92	2,02	16	A	983,19	1,78	2,20
16	B	1139,91	1,86	1,58	16	B	1135,14	1,74	2,00
17	A	455,41	1,88	1,63	17	A	625,76	1,86	2,18
17	B	1425	1,9	1,94	17	B	283,08	1,93	2,55
18	A	1027,82	1,04	1,27	18	A	495,07	1,70	1,90
18	B	1118,01	1,12	1,41	18	B	581,22	1,84	2,25
19	A	773,73	1,94	2,48	19	A	517,55	1,82	2,36
19	B	869,91	1,90	2,31	19	B	400,33	1,87	2,40
20	A	1132,06	1,91	2,37	20	A	318,51	1,86	2,19
20	B	757,73	1,92	2,35	20	B	164,55	1,89	1,75
21	A	475,24	1,93	2,33	21	A	249,40	1,72	1,37
21	B	1091,18	1,92	2,28	21	B	285,82	1,77	1,76
22	A	530,67	1,90	2,29	22	A	455,47	1,88	2,39
22	B	993,21	1,92	2,38	22	B	181,60	1,83	2,15
23	A	852,96	1,91	2,19	23	A	409,40	1,86	2,06
23	B	830,64	1,81	1,72	23	B	122,26	1,85	1,41
24	A	800,42	1,92	2,38	24	A	119,48	2,01	2,11
24	B	639,22	1,94	2,22	24	B	412,84	1,99	2,16
25	A	818,08	1,91	2,27	25	A	389,82	1,88	2,51
25	B	571,06	1,89	1,96	25	B	977,07	1,91	2,01

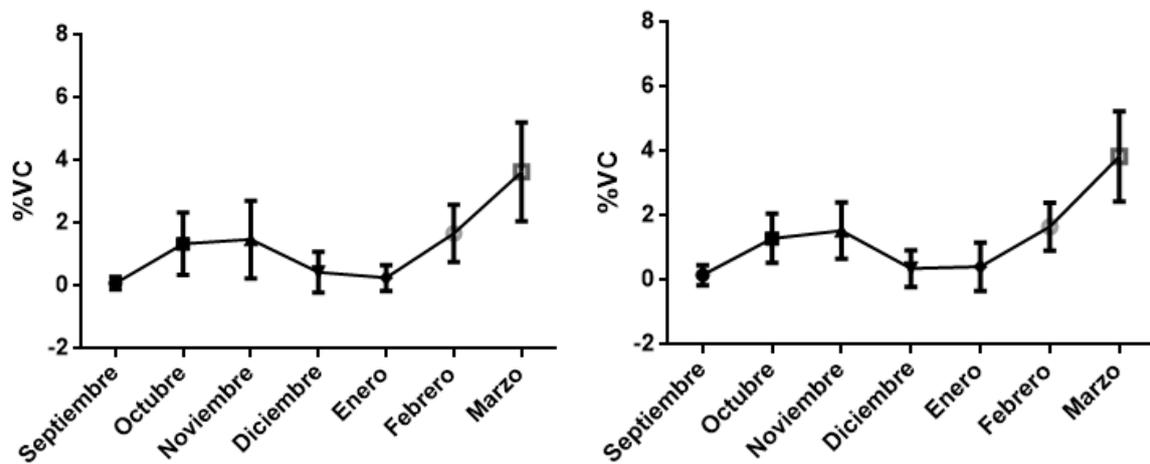


**Figura Suplementaria 2.** Valores promedios ( $\pm$  ES) del porcentaje de *V. destructor* en estado forético (%VF) en las colmenas de *A. mellifera* evaluadas. Se muestran los resultados para cada mes evaluado correspondientes a las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha).

**Tabla Suplementaria 3.** Resultados del GLMM para la evaluación de parámetros poblacionales de *V. destructor* (*Varroa* forética). Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen en qué mes es más probable encontrar una abeja adulta parasitada con *V. destructor*. Para cada comparación pareada entre meses se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), *Odd Ratio* (O.R), el intervalo de confianza (I.C.) y el P-valor.

Meses	%VF					P
	%		O.R.	I.C.		
Abril / Diciembre	189,000	791,700	5,077	2,890	8,917	<0,0001
Abril / Enero	44,400	284,500	2,356	1,444	3,845	<0,0001
Abril / Febrero	7,500	174,300	1,717	1,075	2,743	0,011
Abril / Marzo	-16,400	105,900	1,312	0,836	2,059	0,629
Abril / Mayo	489,100	2.255,700	11,781	5,891	23,557	<0,0001
Abril / Noviembre	147,900	635,300	4,269	2,479	7,353	<0,0001
Abril / Octubre	267,300	1.115,200	6,681	3,673	12,152	<0,0001
Abril / Septiembre	480,700	2.233,400	11,641	5,807	23,334	<0,0001
Diciembre / Enero	-74,500	-15,600	0,464	0,255	0,844	0,0024
Diciembre / Febrero	-81,100	-39,400	0,338	0,189	0,606	<0,0001
Diciembre / Marzo	-85,400	-54,300	0,258	0,146	0,457	<0,0001
Diciembre / Mayo	7,000	403,100	2,321	1,070	5,031	0,021
Diciembre / Noviembre	-55,600	59,200	0,841	0,444	1,592	0,995
Diciembre / Octubre	-33,800	161,700	1,316	0,662	2,617	0,946
Diciembre / Septiembre	5,700	397,500	2,293	1,057	4,975	0,025
Enero / Febrero	-56,300	21,500	0,729	0,437	1,215	0,594
Enero / Marzo	-66,200	-8,400	0,557	0,338	0,916	0,009
Enero / Mayo	142,100	932,300	5,000	2,421	10,323	<0,0001
Enero / Noviembre	1,600	223,000	1,812	1,016	3,230	0,039
Enero / Octubre	50,800	433,100	2,835	1,508	5,331	<0,0001
Enero / Septiembre	139,000	921,000	4,940	2,390	10,210	<0,0001
Febrero / Marzo	-52,600	23,100	0,764	0,474	1,231	0,709

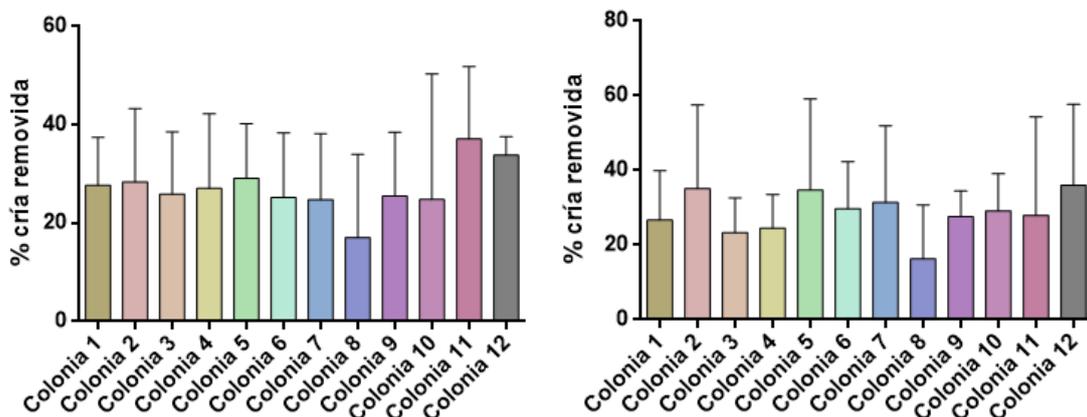
Febrero / Mayo	236,700	1.297,300	6,859	3,367	13,973	<0,0001
Febrero / Noviembre	41,700	336,100	2,486	1,417	4,361	<0,0001
Febrero / Octubre	110,100	620,400	3,890	2,101	7,204	<0,0001
Febrero / Septiembre	232,300	1.282,400	6,778	3,323	13,824	<0,0001
Marzo / Mayo	346,000	1.708,100	8,980	4,460	18,081	<0,0001
Marzo / Noviembre	87,600	464,600	3,254	1,876	5,646	<0,0001
Marzo / Octubre	178,100	832,600	5,092	2,781	9,326	<0,0001
Marzo / Septiembre	339,800	1.690,200	8,873	4,398	17,902	<0,0001
Mayo / Noviembre	-83,000	-22,700	0,362	0,170	0,773	0,001
Mayo / Octubre	-74,500	26,000	0,567	0,255	1,260	0,398
Mayo / Septiembre	-58,700	136,300	0,988	0,413	2,363	1,000
Noviembre / Octubre	-19,600	204,700	1,565	0,804	3,047	0,478
Noviembre / Septiembre	27,900	481,500	2,727	1,279	5,815	0,001
Octubre / Septiembre	-21,600	287,200	1,742	0,784	3,872	0,429



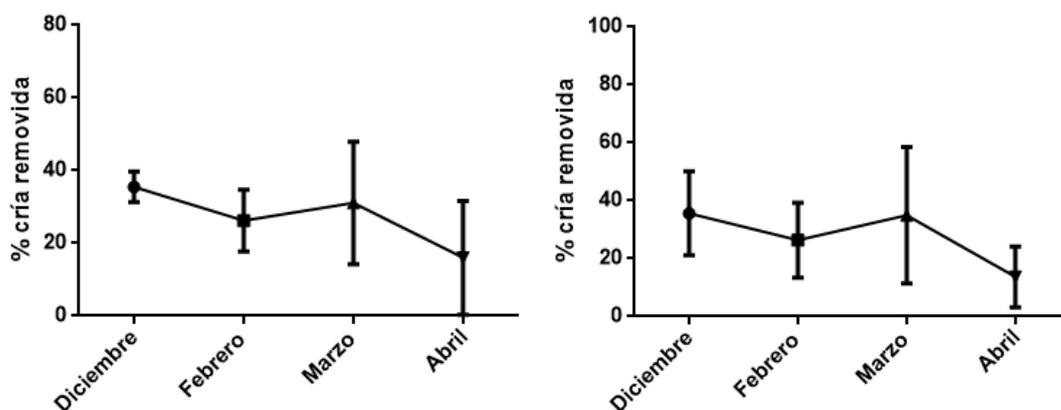
**Figura Suplementaria 3.** Valores promedios ( $\pm$  ES) del porcentaje de *V. destructor* en celdas de cría (%VC) de las colonias de *A. mellifera* evaluadas. Se muestran los resultados para cada mes evaluado correspondientes a las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha).

**Tabla Suplementaria 4.** Resultados del GLMM para la evaluación de parámetros poblacionales de *V. destructor* (Varroa en cría; %VC). Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen en qué mes es más probable encontrar una celda de cría de obrera parasitada con *V. destructor*. Para cada comparación pareada entre meses se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el *Odd Ratios* (O.R.), el intervalo de confianza (I.C.) y el p-valor.

Meses	%VC		O.R.	I.C.		P
	%					
Diciembre / Enero	-32,610	105,700	1,177	0,674	2,057	0,978
Diciembre / Febrero	-84,550	-64,100	0,236	0,155	0,359	<0,0001
Diciembre / Marzo	-93,130	-84,700	0,102	0,069	0,153	<0,0001
Diciembre / Noviembre	-82,940	-60,000	0,261	0,171	0,400	<0,0001
Diciembre / Octubre	-80,560	-53,800	0,300	0,194	0,462	<0,0001
Diciembre / Septiembre	47,150	576,800	3,156	1,472	6,768	0,0002
Enero / Febrero	-87,250	-68,600	0,200	0,128	0,314	<0,0001
Enero / Marzo	-94,340	-86,600	0,087	0,057	0,134	<0,0001
Enero / Noviembre	-85,920	-65,000	0,222	0,141	0,350	<0,0001
Enero / Octubre	-83,950	-59,700	0,254	0,161	0,403	<0,0001
Enero / Septiembre	22,960	484,300	2,680	1,230	5,843	0,004
Febrero / Marzo	-65,320	-45,600	0,435	0,347	0,544	<0,0001
Febrero / Noviembre	-15,430	45,300	1,109	0,846	1,453	0,921
Febrero / Octubre	-3,970	68,300	1,271	0,960	1,683	0,151
Febrero / Septiembre	572,920	2.565,900	13,394	6,729	26,659	<0,0001
Marzo / Noviembre	102,020	222,200	2,551	2,020	3,222	<0,0001
Marzo / Octubre	129,060	273,700	2,926	2,291	3,737	<0,0001
Marzo / Septiembre	1.470,150	5.950,700	30,823	15,702	60,507	<0,0001
Noviembre / Octubre	-13,930	52,800	1,147	0,861	1,528	0,798
Noviembre / Septiembre	505,410	2.311,100	12,082	6,054	24,111	<0,0001
Octubre / Septiembre	425,860	2.010,700	10,535	5,259	21,107	<0,0001



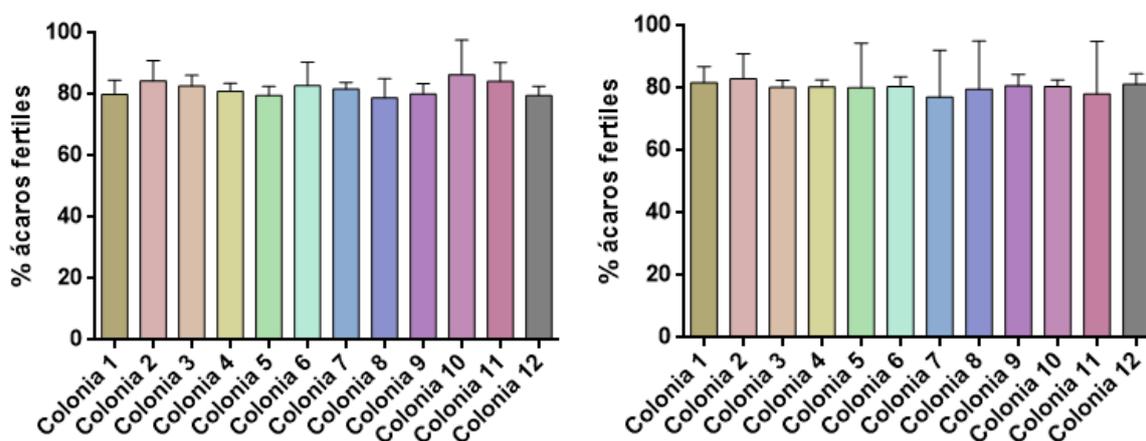
**Figura Suplementaria 4.** Porcentaje medio de celdas de cúa parasitada con *V. destructor* que fueron removidas por las abejas de cada colonia analizada. Se muestran los resultados de las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha). Cada barra muestra el promedio entre las múltiples medidas registradas.



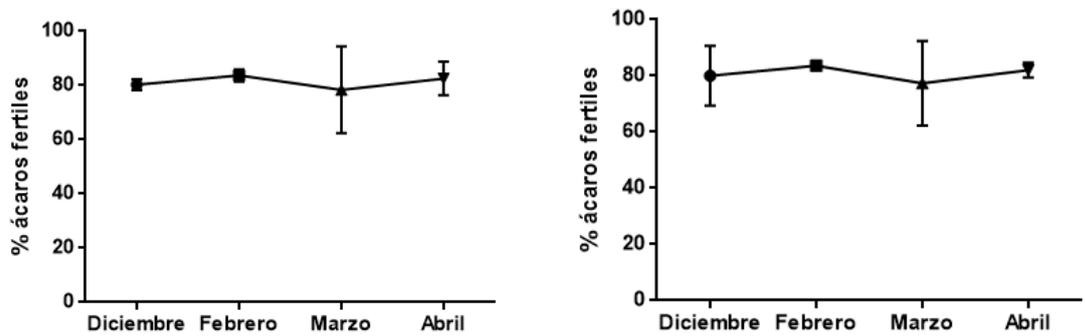
**Figura Suplementaria 5.** Porcentaje de celdas de cúa parasitada con *V. destructor* que fueron removidas por las abejas en función de los meses de la temporada apícola. Se muestran los valores medios de cada mes sobre todas las colonias evaluadas. Se presentan los resultados de las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha).

**Tabla Suplementaria 5.** Resultados del GLMM para la evaluación de la remoción de celdas de cría. Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen en qué mes es más probable encontrar una celda de cría de obrera, que fue parasitada por *V. destructor*, removida. Para cada comparación pareada entre meses se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el *Odd Ratio* (O.R.), el intervalo de confianza (I.C.) y el p-valor.

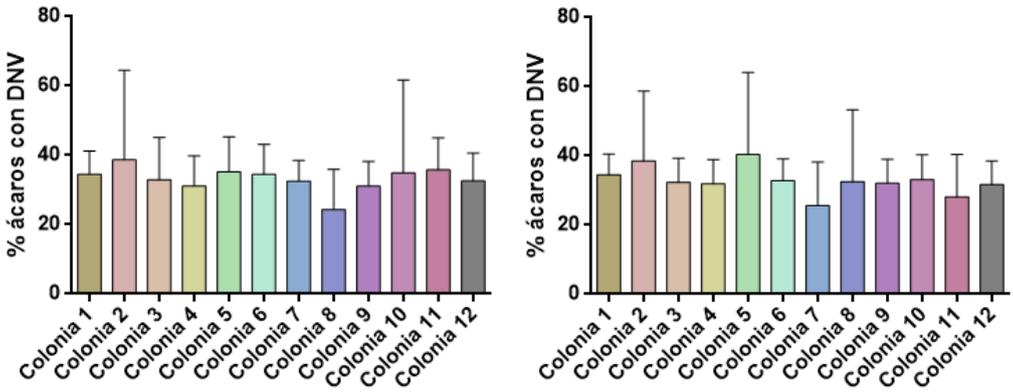
Remoción						
Meses	%		O.R.	I.C.		P
Abril / Diciembre	-74,400	-48,200	0,364	0,256	0,518	<0,0001
Abril / Febrero	-61,200	-17,900	0,564	0,388	0,821	0,001
Abril / Marzo	-75,900	-52,300	0,339	0,241	0,477	<0,0001
Diciembre / Febrero	13,400	111,800	1,549	1,134	2,118	0,002
Diciembre / Marzo	-29,100	22,100	0,931	0,709	1,221	0,905
Febrero / Marzo	-55,600	-18,800	0,601	0,444	0,812	0,0001



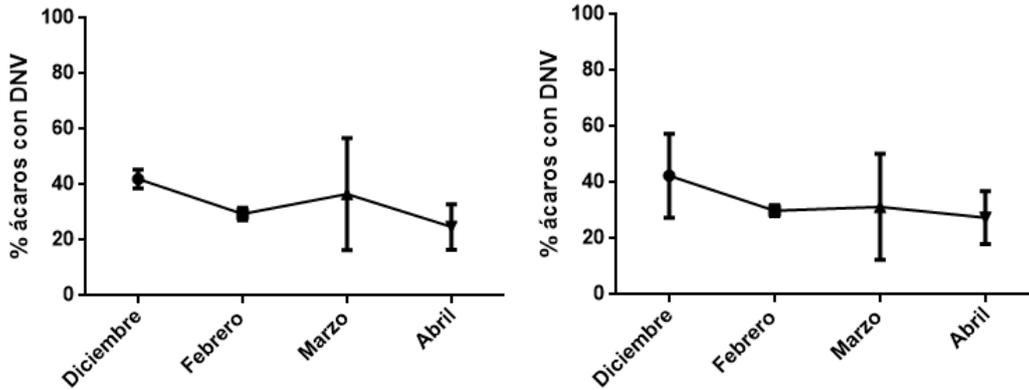
**Figura Suplementaria 6.** Porcentaje medio de ácaros fértiles de cada colonia analizada. Se muestran los resultados de las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha). Cada barra muestra el promedio entre las múltiples medidas registradas sobre cada colonia.



**Figura Suplementaria 7.** Porcentaje medio ( $\pm$ ES) de ácaros fértiles presentes en las celdas de cría no removidas por las abejas para los meses analizados. Se muestran los valores medios de cada mes sobre todas las colonias evaluadas. Se presentan los resultados de las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha).



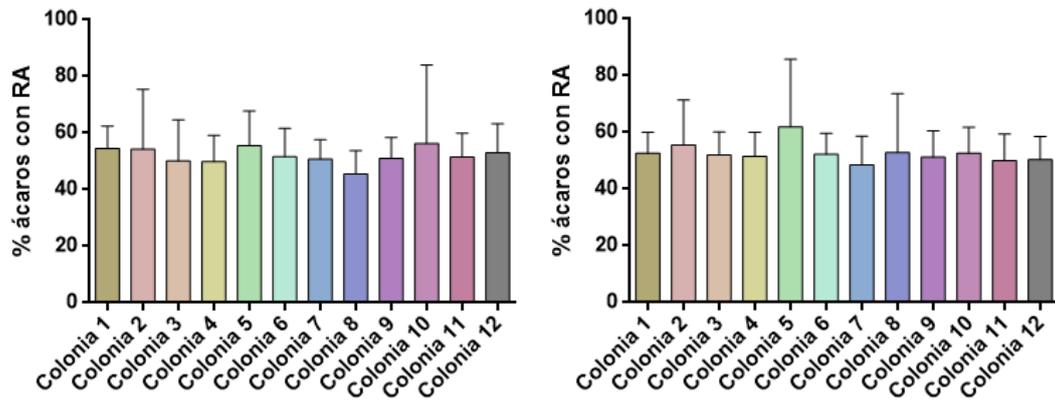
**Figura Suplementaria 8.** Valores medios ( $\pm$ ES) del porcentaje de ácaros con descendencia no viable (DNV) presentes en las celdas de cría no removida por las abejas. Cada barra se obtuvo de los múltiples registros realizados en cada colonia para las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha).



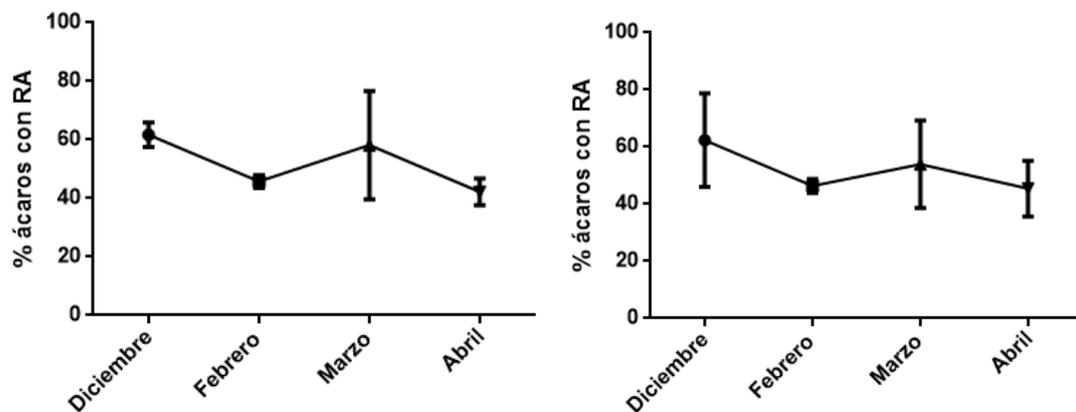
**Figura Suplementaria 9.** Porcentaje medio ( $\pm$ ES) de ácaros con descendencia no viable (DNV) presentes en las celdas de cría no removidas por las abejas para los meses analizados. Se muestran los valores medios de cada mes sobre todas las colonias evaluadas. Se presentan los resultados de las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha).

**Tabla Suplementaria 6.** Resultados del GLMM para la evaluación de parámetros reproductivos de *V. destructor* (DNV). Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen en qué mes es más probable encontrar una *Varroa* fundadora con descendencia no viable (DNV). Para cada comparación pareada entre meses analizados se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el *Odd Ratio*, el intervalo de confianza (C.I.) y el p-valor.

DNV						
Meses	%		O.R.	I.C.		P
Abril / Diciembre	-58,100	-39,800	0,502	0,419	0,602	<0,0001
Abril / Febrero	-31,600	-0,200	0,826	0,684	0,998	0,047
Abril / Marzo	-42,500	-17,600	0,688	0,575	0,824	<0,0001
Diciembre / Febrero	37,600	96,900	1,646	1,376	1,969	<0,0001
Diciembre / Marzo	15,700	62,500	1,371	1,157	1,625	<0,0001
Febrero / Marzo	-30,300	-0,500	0,833	0,697	0,995	0,042



**Figura Suplementaria 10.** Porcentaje de ácaros con reproducción anormal (RA) por colonia. Se muestran los resultados de las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha). Cada barra muestra el promedio entre las múltiples medidas registradas.



**Figura Suplementaria 11.** Porcentaje medio ( $\pm$ ES) de ácaros con reproducción anormal (RA) presentes en las celdas de cría no removidas por las abejas para los meses analizados. Se muestran los valores medios de cada mes sobre todas las colonias evaluadas. Se presentan los resultados de las temporadas 2016-2017 (izquierda) y 2017-2018 (derecha).

**Tabla Suplementaria 7.** Resultados del GLMM para la evaluación de parámetros reproductivos de *V. destructor* (RA). Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen en qué mes es más probable encontrar una *Varroa* fundadora con reproducción anormal (RA). Para cada comparación pareada entre meses analizados se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el *Odd ratio* (O.R.), el intervalo de confianza (C.I.) y el p-valor.

RA						
Meses	%		O.R.	I.C.		P
Abril / Diciembre	-56,500	-40,400	0,509	0,435	0,596	<0,0001
Abril / Febrero	-21,100	8,200	0,924	0,789	1,082	0,573
Abril / Marzo	-47,100	-28,200	0,616	0,529	0,718	<0,0001
Diciembre / Febrero	54,800	112,800	1,815	1,548	2,128	<0,0001
Diciembre / Marzo	3,700	41,200	1,210	1,037	1,412	0,008
Febrero / Marzo	-42,800	-22,200	0,667	0,572	0,778	<0,0001

**Tabla Suplementaria 8.** Concentración e índices de calidad del ADN de *V. destructor*. Se muestran las concentraciones de ADN (ng/μL) extraídas para cada individuo de las colonias analizadas en cada localidad. 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). Ci: Castelli; Fo: Formosa; Le: Leales; Fa: Famallá; Re: Reconquista; SF: Santa Fe; Ra: Rafaela; Ca: Castelar; Ba: Balcarce; As: Ascasubi.

Localidad	Colonia	ng/μL	260/280	260/230	Localidad	Colonia	ng/μL	260/280	260/230
Ci	A	14,83	1,51	1,11	Fa	W	34,55	1,35	0,62
Ci	A	24,68	1,8	0,69	Fa	W	28,23	1,37	0,41
Ci	A	45,83	1,89	0,99	Fa	W	21,09	1,74	0,76
Ci	B	31,97	1,91	0,66	Fa	X	22,5	1,8	0,51
Ci	B	39,41	1,92	0,8	Fa	X	22,7	1,83	0,52
Ci	B	31,37	2	0,9	Fa	X	21,39	1,83	0,59
Ci	C	46,43	2	0,91	Fa	Y	10,72	1,85	0,36
Ci	C	31,36	2,04	0,87	Fa	Y	22,15	1,89	0,37
Ci	C	27,36	2,05	0,6	Fa	Y	24,16	1,93	0,46
Ci	D	58,27	2,06	0,61	Fa	Z	20,51	2	0,68
Ci	D	59,38	2,06	0,78	Fa	Z	24,32	2,05	0,57
Ci	D	52,36	1,92	0,6	Fa	Z	11,07	2,07	0,43
Ci	E	47,85	1,96	0,61	Fa	AA	22,69	2,09	0,5
Ci	E	45,31	1,83	0,61	Fa	AA	16,39	2,04	0,43
Ci	E	37,84	1,93	0,73	Fa	AA	16,91	2,05	0,44
Ci	F	54,17	1,98	0,92	Fa	AB	13,26	2	0,35
Ci	F	53,63	1,86	1,06	Fa	AB	16,49	2,05	0,58
Ci	F	98,81	1,96	1,12	Fa	AB	46,54	2,06	0,93
Ci	G	60,91	1,98	0,69	Fa	AC	18,42	2,01	0,59
Ci	G	33,97	1,81	0,73	Fa	AC	12,82	1,93	0,41
Ci	G	89,74	2	1,33	Fa	AC	13,73	1,71	0,46
Ci	G	20,9	1,92	0,86	Re	AD	20,57	1,75	0,57
Fo	H	21,25	1,4	0,3	Re	AD	69,73	1,86	0,5
Fo	H	13,68	1,65	0,52	Re	AD	170,49	1,86	0,51
Fo	H	14,19	1,71	0,19	Re	AD	31,61	1,86	0,69

Fo	H	13,53	1,79	0,27	Re	AD	56,15	1,86	1
Fo	H	53,68	1,81	0,33	Re	AE	38	1,87	0,65
Fo	I	25,59	1,83	0,29	Re	AE	35,04	1,89	0,78
Fo	I	20,7	1,84	0,23	Re	AE	53,49	1,89	0,94
Fo	I	29,67	1,85	0,63	Re	AE	40,89	1,9	0,8
Fo	I	20,72	1,88	0,19	Re	AE	23,07	1,92	0,78
Fo	I	25,23	1,89	0,23	Re	AF	30,55	1,92	0,88
Fo	J	22,32	1,89	0,24	Re	AF	40,02	1,94	0,89
Fo	J	64,39	1,92	0,59	Re	AF	34	1,95	0,73
Fo	J	12,19	1,93	0,21	Re	AF	32,41	1,99	0,81
Fo	J	34,4	1,95	0,22	Re	AG	49,27	2,02	0,98
Fo	J	12,01	2,01	0,23	Re	AG	27,66	2,05	0,56
Fo	K	30,54	2,01	0,26	Re	AG	75,99	2,07	0,98
Fo	K	33,94	2,01	0,33	Re	AG	19,32	2,07	0,66
Fo	K	26,12	2,03	0,23	SF	AH	34,38	1,91	0,3
Fo	K	57,05	2,03	0,25	SF	AH	31,02	1,89	0,33
Fo	K	38,27	2,05	0,36	SF	AH	17,88	1,81	0,35
Fo	L	20,48	2,09	0,3	SF	AI	38,63	1,99	0,35
Fo	L	20,48	2,09	0,31	SF	AI	43,69	1,82	0,38
Fo	L	40,82	2,09	0,31	SF	AI	54,6	1,92	0,39
Fo	L	44,22	2,1	0,34	SF	AI	34,9	1,92	0,56
Fo	L	30,96	2,04	0,46	Ra	AJ	10,03	1,52	1,26
Fo	M	41,68	2,07	0,59	Ra	AJ	31,73	1,61	0,83
Fo	M	60,23	2,07	1,13	Ra	AJ	14	1,65	1,46
Fo	M	60,44	2,09	1,03	Ra	AK	87,46	1,76	1,09
Fo	M	16,13	2,02	0,19	Ra	AK	39,19	1,81	0,9
Fo	N	32,17	2,02	0,35	Ra	AK	20,65	1,82	1,45
Fo	N	12,32	2,03	0,2	Ra	AL	20,26	1,84	0,62
Fo	N	41,91	2,03	0,98	Ra	AL	25,34	1,85	0,67
Fo	N	52,05	2,05	0,97	Ra	AL	44,54	1,96	0,81

Fo	O	35,05	2,07	0,99	Ca	AM	89,44	1,88	1,55
Fo	O	29,44	2,08	0,86	Ca	AM	79,22	1,9	1,15
Fo	O	14,54	2,01	0,21	Ca	AM	28,17	1,98	0,72
Fo	O	47,84	2,06	0,97	Ca	AM	45,87	2	0,85
Le	P	29,26	1,64	0,47	Ca	AN	72,97	2	1,09
Le	P	11,53	1,74	0,22	Ca	AN	39,64	2,01	0,65
Le	P	30,64	1,77	0,77	Ca	AN	41,47	2,04	0,99
Le	P	23,73	1,84	0,35	Ca	AN	69,55	2,04	1,06
Le	P	41,78	1,92	0,72	Ca	AO	38,49	2,05	0,67
Le	Q	12,26	2,01	0,4	Ca	AO	95,65	2	0,9
Le	Q	20,11	2,02	0,3	Ca	AO	71,28	2,09	0,94
Le	Q	21,65	2,04	0,24	Ca	AO	40,06	2,09	1,46
Le	Q	12,86	2,05	0,36	Ca	AP	104,9	2,02	1,33
Le	Q	21,88	2,05	0,47	Ca	AP	38,96	2,08	0,67
Le	R	10,13	2,06	0,28	Ca	AP	31,05	2,09	0,72
Le	R	56,84	2,06	1,3	Ca	AP	22,75	2,05	1,86
Le	R	20,93	2,07	0,44	Ba	AQ	27,51	1,7	1,39
Le	R	19,76	2,08	0,37	Ba	AQ	30,38	1,71	1,19
Le	R	18,56	2	0,56	Ba	AQ	34,73	1,71	2,23
Le	S	24,38	2,04	0,76	Ba	AR	27,92	1,74	1,36
Le	S	39,37	2,08	0,89	Ba	AR	26,37	1,79	2,16
Le	S	12,02	2,09	0,41	Ba	AR	46,43	1,81	2,27
Le	S	39,72	2,01	0,64	Ba	AR	39,33	1,92	1
Le	S	40,08	2,01	0,99	Ba	AS	22,2	1,92	1,52
Le	T	44,47	2,03	0,8	Ba	AS	33,57	1,96	2,41
Le	T	17,46	2,02	0,32	Ba	AS	19,78	2	1,66
Le	T	29,61	2,04	0,7	Ba	AS	20,05	2	1,89
Le	T	40,4	2,06	0,59	As	AT	85,75	1,84	0,85
Le	U	34,87	2,07	0,58	As	AT	24,6	1,88	0,79
Le	U	18,5	2	0,32	As	AT	30,54	1,88	1,16

Le	U	15,58	2,06	0,27	As	AU	32,4	1,91	0,61
Le	U	13,09	1,66	0,36	As	AU	31,75	1,92	1,13
Le	V	15,73	1,91	0,55	As	AU	95,27	1,92	1,14
Le	V	24,29	1,95	0,61	As	AV	38,56	1,96	0,52
Le	V	14,69	1,68	0,25	As	AV	24,77	2,04	1,01
Le	V	11,59	1,94	0,36	As	AV	32,93	2,1	0,7

**Tabla Suplementaria 9.** Concentraciones e índices obtenidos en la purificación del producto de amplificación de *cox1* de *V. destructor*. Se muestran las concentraciones de cada purificado (ng/ $\mu$ L) para cada ácaro de las colonias analizadas en cada localidad. 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). Ci: Castelli; Fo: Formosa; Le: Leales; Fa: Famaillá; Re: Reconquista; SF: Santa Fe; Ra: Rafaela; Ca: Castelar; Ba: Balcarce; As: Ascasubi.

Localidad	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230	Localidad	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230
Ci	10,61	1,8	1,03	SF	27,41	1,81	1,39
Ci	19,52	1,83	1,07	SF	68,68	1,81	1,41
Ci	28,15	1,85	1,07	SF	74,92	1,81	1,42
Fo	13,84	1,74	1,08	Ra	54,12	1,8	1,43
Fo	14,21	1,9	1,11	Ra	39,66	1,87	1,48
Fo	67,08	1,83	1,24	Ra	61,06	1,89	1,51
Le	26,83	1,88	1,24	Ca	28,29	1,85	1,54
Le	60,34	1,82	1,26	Ca	64,7	1,82	1,55
Le	23,07	1,89	1,27	Ca	91,03	1,91	1,56
Fa	23,49	1,82	1,34	Ba	40,94	1,89	1,83
Fa	51,79	1,82	1,37	Ba	45,35	1,88	1,91
Fa	75,84	1,83	1,37	Ba	46,37	1,89	1,95
Re	24,47	1,98	1,37	As	65,8	1,82	1,96
Re	24,7	1,81	1,38	As	37,76	1,95	2,1
Re	15,38	1,87	1,38	As	84,7	1,9	2,3

**Tabla Suplementaria 10.** Concentraciones e índices obtenidos en la purificación del producto de amplificación de *nd4-nd4L* de *V. destructor*. Se muestran las concentraciones de cada purificado (ng/ $\mu$ L) para cada individuo de las colonias analizadas en cada localidad. 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). Ci: Castelli; Fo: Formosa; Le: Leales; Fa: Famaillá; Re: Reconquista; SF: Santa Fe; Ra: Rafaela; Ca: Castelar; Ba: Balcarce; As: Ascasubi.

Localidad	Colonia	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230	Localidad	Colonia	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230
Ci	A	302,5	1,58	1,04	Fa	W	231,88	1,49	0,87
Ci	A	259,3	1,58	1,08	Fa	W	193,58	1,46	0,79
Ci	A	35,24	1,89	1,08	Fa	W	190,78	1,43	0,75
Ci	B	280,7	1,59	1,12	Fa	X	118,3	1,36	0,56
Ci	B	29,98	1,94	1,17	Fa	X	83,06	1,32	0,46
Ci	B	279,1	1,61	1,24	Fa	X	160,56	1,41	0,68
Ci	C	269,2	1,63	1,39	Fa	Y	141,77	1,4	0,67
Ci	C	23,78	1,95	1,42	Fa	Y	101,69	1,4	0,71
Ci	C	31,32	1,76	1,46	Fa	Y	132,72	1,43	0,7
Ci	D	50,68	1,79	1,48	Fa	Z	165,1	1,44	0,78
Ci	D	39,95	1,85	1,53	Fa	Z	28,73	1,28	0,39
Ci	D	40,41	1,86	1,58	Fa	Z	47,24	1,44	0,72
Ci	E	41,03	1,87	1,6	Fa	AA	70,18	1,29	0,44
Ci	E	33,26	1,99	1,62	Fa	AA	208,48	1,46	0,82
Ci	E	41,2	1,96	1,62	Fa	AA	154,63	1,46	0,81
Ci	F	42,25	1,85	1,8	Fa	AB	118,17	1,4	0,69
Ci	F	48,43	1,99	2,08	Fa	AB	164,09	1,43	0,75
Ci	F	36,18	1,9	2,09	Fa	AB	112,83	1,39	0,6
Ci	G	70,9	1,89	2,18	Fa	AC	81,68	1,3	0,46
Ci	G	77,18	1,96	2,25	Fa	AC	84,52	1,36	0,54
Ci	G	79,87	1,95	2,35	Fa	AC	106,18	1,37	0,57
Ci	G	82,85	2	2,36	Re	AD	132,93	1,5	0,86
Fo	H	30,89	1,6	0,81	Re	AD	141,67	1,43	0,68
Fo	H	28,17	1,43	0,66	Re	AD	176,44	1,46	0,84
Fo	H	302,1	1,58	1,08	Re	AD	54,76	1,27	0,36
Fo	H	214,3	1,55	1,03	Re	AD	79,8	1,41	0,55
Fo	H	273,6	1,56	1,13	Re	AE	48,43	1,4	0,44

Fo	I	261,4	1,6	1,17	Re	AE	110,92	1,43	0,71
Fo	I	215,4	1,59	1,13	Re	AE	94,97	1,27	0,37
Fo	I	239,9	1,57	1,02	Re	AE	29,38	1,29	0,36
Fo	I	236,1	1,6	1,2	Re	AE	48,84	1,24	0,27
Fo	I	254	1,47	0,76	Re	AF	42,28	1,19	0,26
Fo	J	319,8	1,49	0,82	Re	AF	60,64	1,35	0,46
Fo	J	193,4	1,38	0,58	Re	AF	40,69	1,17	0,27
Fo	J	257,1	1,45	0,74	Re	AF	89,37	0,98	0,23
Fo	J	221,3	1,46	0,74	Re	AG	110,61	1,35	0,54
Fo	J	269,8	1,6	1,27	Re	AG	131,91	1,41	0,69
Fo	K	217,3	1,44	0,72	Re	AG	111,46	1,32	0,5
Fo	K	207,4	1,43	0,68	Re	AG	209,39	1,48	0,84
Fo	K	259,2	1,56	1,09	SF	AH	538,17	1,68	1,52
Fo	K	146,2	1,59	1,23	SF	AH	502,82	1,69	1,56
Fo	K	267,3	1,48	0,77	SF	AH	516,56	1,7	1,54
Fo	L	336,3	1,62	1,35	SF	AI	446,79	1,7	1,49
Fo	L	242,9	1,46	0,74	SF	AI	500,23	1,7	1,56
Fo	L	277,3	1,52	0,84	SF	AI	94,87	1,34	0,45
Fo	L	21,53	1,39	0,74	SF	AI	40,87	1,23	0,25
Fo	L	30,07	1,68	0,85	Ra	AJ	480,73	1,7	1,54
Fo	M	29,28	1,5	0,74	Ra	AJ	501,55	1,7	1,55
Fo	M	52,84	1,51	0,71	Ra	AJ	501,15	1,68	1,53
Fo	M	35,96	1,89	1,63	Ra	AK	428,08	1,69	1,51
Fo	M	281,7	1,61	1,26	Ra	AK	513,32	1,68	1,46
Fo	N	312,6	1,58	1,16	Ra	AK	496,94	1,66	1,48
Fo	N	276,3	1,48	0,83	Ra	AL	440,64	1,7	1,52
Fo	N	262,4	1,47	0,76	Ra	AL	75,36	1,87	2,09
Fo	N	221,1	1,44	0,7	Ra	AL	82,03	1,9	1,81
Fo	O	250,4	1,48	0,78	Ca	AM	123,06	1,42	0,67
Fo	O	243,5	1,6	1,35	Ca	AM	147,01	1,43	0,62
Fo	O	386,8	1,6	1,23	Ca	AM	100,05	1,43	0,64
Fo	O	272,8	1,6	1,26	Ca	AM	101,64	1,44	0,59

Le	P	262,3	1,56	1,05	Ca	AN	132,32	1,47	0,7
Le	P	255,1	1,56	1,08	Ca	AN	154,04	1,47	0,7
Le	P	310,3	1,5	1,08	Ca	AN	140,02	1,47	0,74
Le	P	299,2	1,56	1,09	Ca	AN	195,67	1,48	0,67
Le	P	237,3	1,58	1,1	Ca	AO	312,81	1,57	1,07
Le	Q	320,6	1,58	1,13	Ca	AO	106,57	1,59	0,71
Le	Q	322,3	1,58	1,13	Ca	AO	293,43	1,62	1,1
Le	Q	22,86	1,82	1,14	Ca	AO	315,78	1,62	1,12
Le	Q	240,3	1,59	1,16	Ca	AP	333,96	1,65	1,08
Le	Q	21,62	1,86	1,18	Ca	AP	356,55	1,65	1,16
Le	R	18,77	1,9	1,21	Ca	AP	104,51	1,85	2,31
Le	R	329,5	1,61	1,21	Ca	AP	82,59	1,98	2,64
Le	R	329,2	1,59	1,22	Ba	AQ	275,1	1,5	0,81
Le	R	29,28	1,08	1,23	Ba	AQ	221,33	1,46	0,7
Le	R	36,23	1,84	1,23	Ba	AQ	276,85	1,5	0,79
Le	S	40,03	1,85	1,34	Ba	AR	282,47	1,49	0,76
Le	S	24,54	1,82	1,36	Ba	AR	256,38	1,5	0,77
Le	S	22,18	1,91	1,4	Ba	AR	255,98	1,51	0,82
Le	S	34,49	1,83	1,52	Ba	AR	291,34	1,52	0,83
Le	S	31,1	1,95	1,55	Ba	AS	276,36	1,49	0,75
Le	T	31,6	1,92	1,61	Ba	AS	281,33	1,51	0,8
Le	T	38,98	1,81	1,65	Ba	AS	49,71	1,82	2,26
Le	T	35,84	1,99	1,66	Ba	AS	78,89	1,88	2,17
Le	T	35	1,88	1,67	As	AT	232,96	1,58	1,16
Le	U	280,6	1,62	1,82	As	AT	210,23	1,56	1,08
Le	U	27,07	1,92	1,9	As	AT	283,53	1,57	1,18
Le	U	68,08	1,86	2,07	As	AU	252,84	1,57	1,15
Le	U	59,95	1,93	2,11	As	AU	272,68	1,57	1,1
Le	V	63,75	1,93	2,13	As	AU	485,17	1,68	1,49
Le	V	63,21	1,91	2,15	As	AV	478,09	1,72	1,57
Le	V	67,29	1,93	2,16	As	AV	488,19	1,68	1,56
Le	V	66,27	1,9	2,29	As	AV	94,03	1,91	2,34

**Tabla Suplementaria 11.** Concentraciones e índices obtenidos en la purificación del producto de amplificación de *nd4* de *V. destructor*. Se muestran las concentraciones de cada purificado (ng/ $\mu$ L) para cada ácaro de las colonias analizadas en cada localidad. 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). Ci: Castelli; Fo: Formosa; Le: Leales; Fa: Famaillá; Re: Reconquista; SF: Santa Fe; Ra: Rafaela; Ca: Castelar; Ba: Balcarce; As: Ascasubi.

Localidad	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230	Localidad	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230
Ci	143,7	1,93	0,77	SF	228,4	1,49	0,83
Ci	135,7	1,92	1,47	SF	202,5	1,53	0,9
Ci	75,71	1,91	0,86	SF	231,9	1,49	0,87
Fo	93,18	1,91	1,02	Ra	160,6	1,41	0,68
Fo	110,1	1,9	0,91	Ra	70,18	1,29	0,44
Fo	102,7	1,88	1,18	Ra	154,6	1,46	0,81
Le	122,3	1,9	1,14	Ca	118,2	1,4	0,69
Le	47,89	1,89	0,71	Ca	164,1	1,43	0,75
Le	108,2	1,85	1,15	Ca	193,6	1,46	0,79
Fa	66,51	1,84	0,79	Ba	132,9	1,5	0,86
Fa	36,32	1,87	0,37	Ba	79,8	1,41	0,55
Fa	68,01	1,89	0,72	Ba	48,43	1,4	0,44
Re	45,42	1,88	0,7	As	110,9	1,43	0,71
Re	93,77	1,89	0,76	As	78,89	1,88	2,17
Re	240,5	1,55	0,95	As	70,9	1,89	2,18

**Tabla Suplementaria 12.** Concentraciones e índices obtenidos en la purificación del producto de amplificación de *nd5* de *V. destructor*. Se muestran las concentraciones de cada purificado (ng/μL) para cada ácido de las colonias analizadas en cada localidad. 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). Ci: Castelli; Fo: Formosa; Le: Leales; Fa: Famaillá; Re: Reconquista; SF: Santa Fe; Ra: Rafaela; Ca: Castelar; Ba: Balcarce; As: Ascasubi.

Localidad	ng/μL	260/280	260/230	Localidad	ng/μL	260/280	260/230
Ci	33,26	1,99	1,62	SF	36,18	1,9	2,09
Ci	35,84	1,99	1,66	SF	75,36	1,87	2,09
Ci	48,43	1,99	2,08	SF	68,08	1,86	2,07
Fo	41,2	1,96	1,62	Ra	82,03	1,9	1,81
Fo	23,78	1,95	1,42	Ra	42,25	1,85	1,8
Fo	31,1	1,95	1,55	Ra	35	1,88	1,67
Le	29,98	1,94	1,17	Ca	38,98	1,81	1,65
Le	59,95	1,93	2,11	Ca	35,96	1,89	1,63
Le	63,75	1,93	2,13	Ca	41,03	1,87	1,6
Fa	67,29	1,93	2,16	Ba	40,41	1,86	1,58
Fa	31,6	1,92	1,61	Ba	39,95	1,85	1,53
Fa	27,07	1,92	1,9	Ba	34,49	1,83	1,52
Re	22,18	1,91	1,4	As	24,54	1,82	1,36
Re	63,21	1,91	2,15	As	40,03	1,85	1,34
Re	18,77	1,9	1,21	As	36,23	1,84	1,23

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 CTTGTAATCATAAGGATATTGGAAC TATTATTTATTTTAGTTATGATCAGGAGTTTAGGAATAAT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

      80      90      100     110     120     130     140
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 ATTAAGTCTATTAATTCGTGTAGAGTTAGGTC AACCTGGTCTTTTATTTGGAGATGATCAGATTTATAAT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

      150     160     170     180     190     200     210
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 ACTATTGTTACTTCTCATGCTTTTGTAAATAATTTTATAGTTATACCTGCTATAAATGGAGGTTTGG
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

      220     230     240     250     260     270     280
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 GTAAATTGGTTAGTCCCTTAATAATTTCTGCACCAGATATAGCTTTTCCACGTTTAAATAATAAGTTT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

      290     300     310     320     330     340     350
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TTGATTATTAGTACCTTCTCTTAGTTTATTAAATTTTCTTCTTTTATTGAAAGTGGAGTAGGTACAGGT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

```



```

710       720       730       740       750       760       770
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 AGTTTATATTTTAAATTTGCTGGTTTTGGTATTATTTCTCATGTAATTTGTATACAAGAGGGGAAGAAG
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

```

```

780       790       800       810       820       830       840
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 CAGCCTTTTGGAATTTAGGGATAATTTACGCTATAATAACTATCGGTATTTTAGGTTTTATTGTATGGG
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

```

```

850       860       870       880       890       900       910
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 CTCATCATATATTTACAGTAGGAATAGATATTGATACTCGAGCATATTTTACTGCAGCTACAATAATAT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

```

```

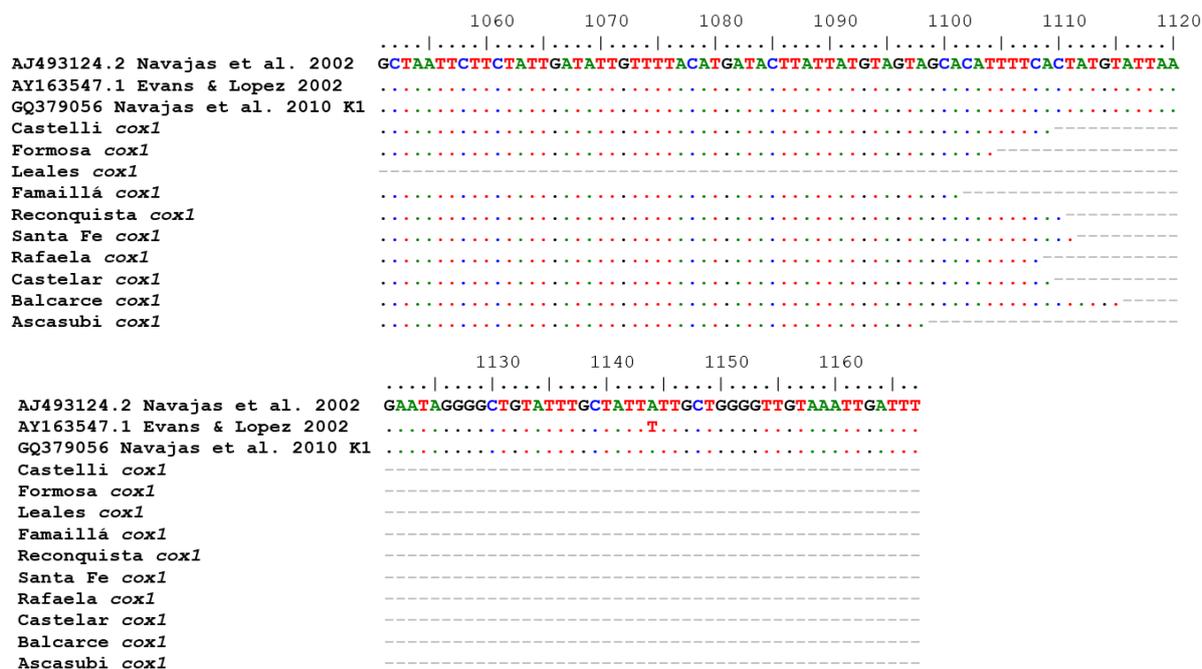
920       930       940       950       960       970       980
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TCGGGTTCCTACTGG-TATTAATAATTTTCTTGATTAGCAACAATTCATGGTTCATAGTTAAATTAGA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

```

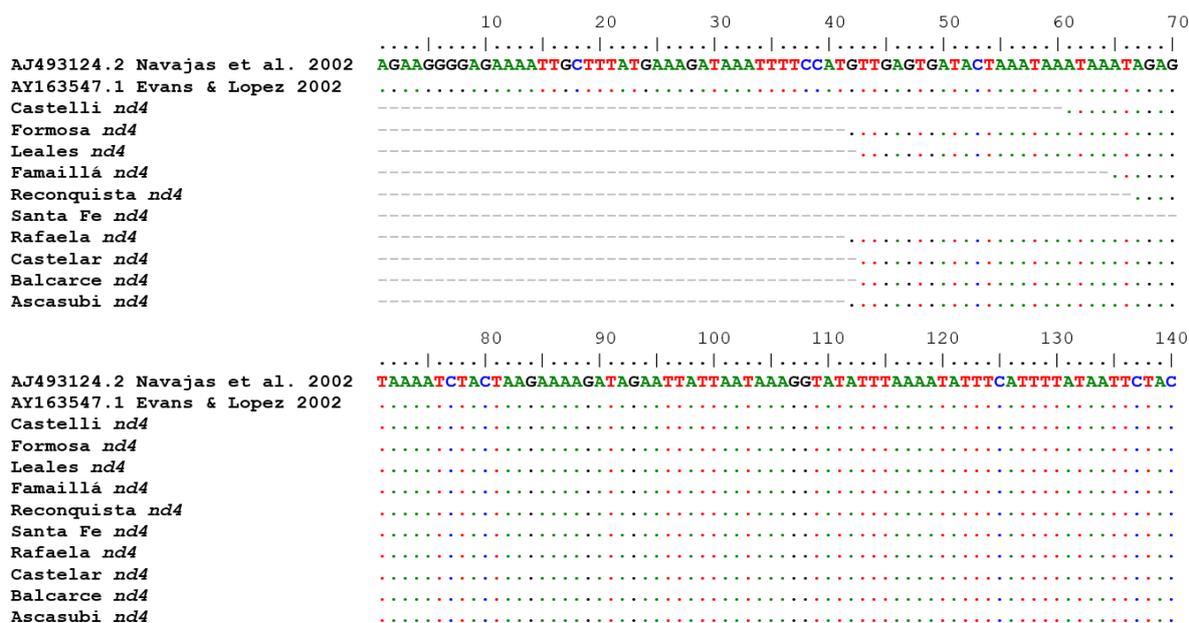
```

990       1000      1010      1020      1030      1040      1050
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TGTCCCGATAATTTGATCTTTAGGTTTTATTTTTTATTTACTTTAGGGGGTATTACTGGTGAATTTTA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
GQ379056 Navajas et al. 2010 K1 .....
Castelli cox1 .....
Formosa cox1 .....
Leales cox1 .....
Famaillá cox1 .....
Reconquista cox1 .....
Santa Fe cox1 .....
Rafaela cox1 .....
Castelar cox1 .....
Balcarce cox1 .....
Ascasubi cox1 .....

```



**Figura Suplementaria 12.** Alineamiento de secuencias *cox1* del ADN mitocondrial (mt) de *V. destructor*. Se muestra una secuencia consenso de cada localidad muestreada. Como secuencias de referencia se utilizaron las dos versiones disponibles del genoma completo del ADNmt de *V. destructor* (AY163547.1 de Evans y Lopez 2002; y AJ493124.2 de Navajas et al. 2002), y la secuencia GQ379056.1 correspondiente a *cox1* del haplotipo K1-1 identificado por Navaja et al. (2010).



```

150      160      170      180      190      200      210
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 CATAAAGAAGAAATTCACCTTAAAAGATTATTGTTGGAGGGGATCCAAGATTAATAACACAGTTTAAAAA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd4 .....
Formosa nd4 .....
Leales nd4 .....
Famaillá nd4 .....
Reconquista nd4 .....
Santa Fe nd4 .....
Rafaela nd4 .....
Castelar nd4 .....
Balcarce nd4 .....
Ascasubi nd4 .....

```

```

220      230      240      250      260      270      280
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TATAAAAAGCCTAAGCAGGAAAAATTTTATTAAATCCTTTTAAGAGAAGGAGATTACGAGTAAAGAA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd4 .....
Formosa nd4 .....
Leales nd4 .....
Famaillá nd4 .....
Reconquista nd4 .....
Santa Fe nd4 .....
Rafaela nd4 .....
Castelar nd4 .....
Balcarce nd4 .....
Ascasubi nd4 .....

```

```

290      300      310      320      330      340      350
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 CGTTCATAATAGATATTAGCTATAAAAAATAGCTACTAGAACAAAGTCCATGACTAATTATTATTAATA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd4 .....
Formosa nd4 .....
Leales nd4 .....
Famaillá nd4 .....
Reconquista nd4 .....
Santa Fe nd4 .....
Rafaela nd4 .....
Castelar nd4 .....
Balcarce nd4 .....
Ascasubi nd4 .....

```

```

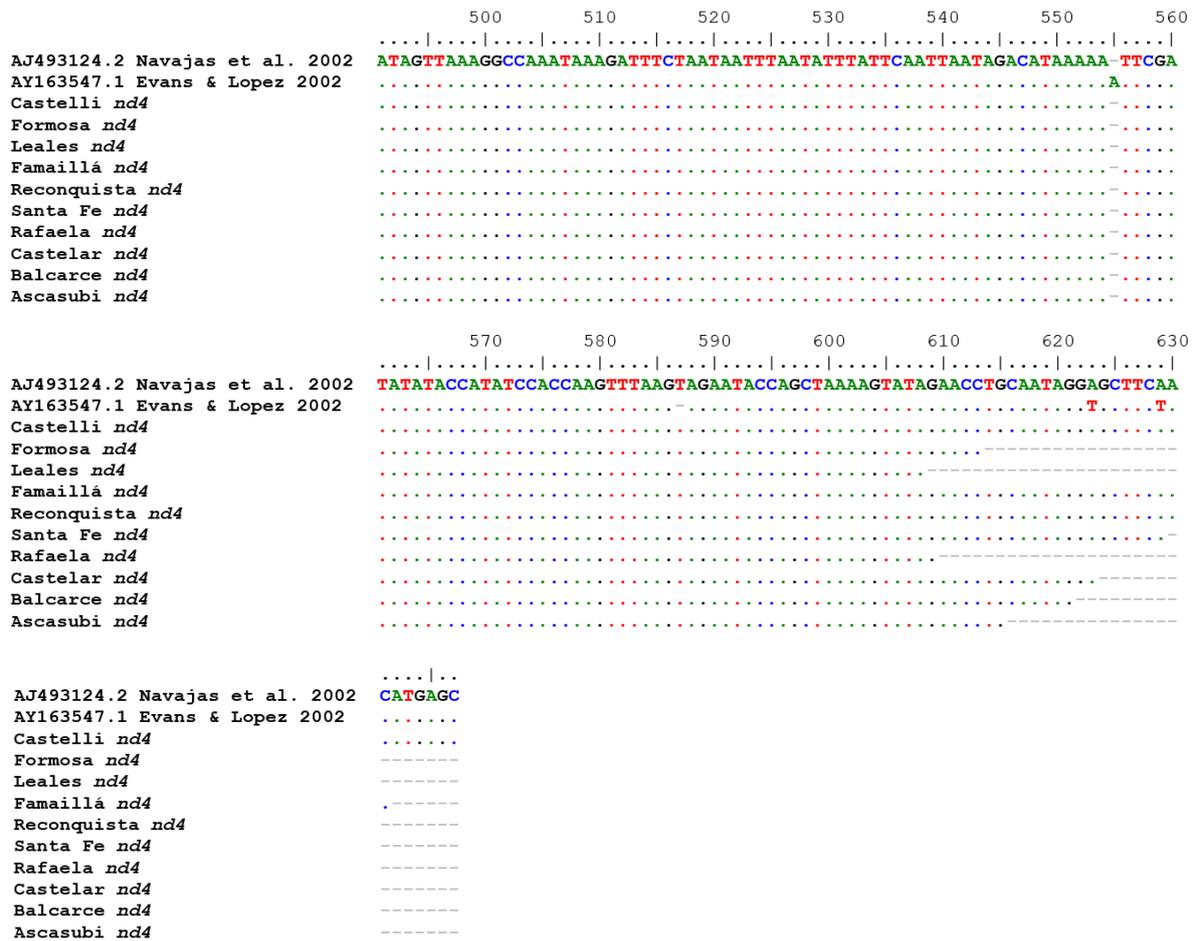
360      370      380      390      400      410      420
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 AAGCTCCTGATTGACCTCAAAAATTACCTCTTATTAGTCCACCTACAACAATCCTTATATGACAGATAGA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd4 .....
Formosa nd4 .....
Leales nd4 .....
Famaillá nd4 .....
Reconquista nd4 .....
Santa Fe nd4 .....
Rafaela nd4 .....
Castelar nd4 .....
Balcarce nd4 .....
Ascasubi nd4 .....

```

```

430      440      450      460      470      480      490
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TGAATAAGCAATTAAATTTTAAATCAATTTGAGTAATACATATGATACTAATAATAATAGCAGCAATA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd4 .....
Formosa nd4 .....
Leales nd4 .....
Famaillá nd4 .....
Reconquista nd4 .....
Santa Fe nd4 .....
Rafaela nd4 .....
Castelar nd4 .....
Balcarce nd4 .....
Ascasubi nd4 .....

```



**Figura Suplementaria 13.** Alineamiento de secuencias *nd4* del ADN mitocondrial (mt) de *V. destructor*. Se muestra una secuencia consenso de cada localidad muestreada. Como secuencias de referencia se utilizaron las dos versiones disponibles del genoma completo de ADNmt de *V. destructor* (AY163547.1 de Evans y Lopez 2002; y AJ493124.2 de Navajas et al. 2002).

```

      10      20      30      40      50      60      70
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TAATTCATATTTTATATAGCAATTATTAGTATTATAATACCTTAGTTGGCTAAGAGTAGAAAAAGCAATA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd5 .....
Formosa nd5 .....
Leales nd5 .....
Famaillá nd5 .....
Reconquista nd5 .....
Santa Fe nd5 .....
Rafaela nd5 .....
Castelar nd5 .....
Balcarce nd5 .....
Ascasubi nd5 .....

```

```

      80      90      100      110      120      130      140
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 ATTTTTTTTATATCTAGTTCAAATAAAGCGTTTAAACTTGCTATAAAAAGGGTTAATGCTCTAATAATTA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd5 .....
Formosa nd5 .....
Leales nd5 .....
Famaillá nd5 .....
Reconquista nd5 .....
Santa Fe nd5 .....
Rafaela nd5 .....
Castelar nd5 .....
Balcarce nd5 .....
Ascasubi nd5 .....

```

```

      150      160      170      180      190      200      210
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TAAGAAGTTCACCTTATAATATTATTTCTAAAAATAAATTAAACGTTATAAAGATAAACCCAGCTGT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd5 .....
Formosa nd5 .....
Leales nd5 .....
Famaillá nd5 .....
Reconquista nd5 .....
Santa Fe nd5 .....
Rafaela nd5 .....
Castelar nd5 .....
Balcarce nd5 .....
Ascasubi nd5 .....

```

```

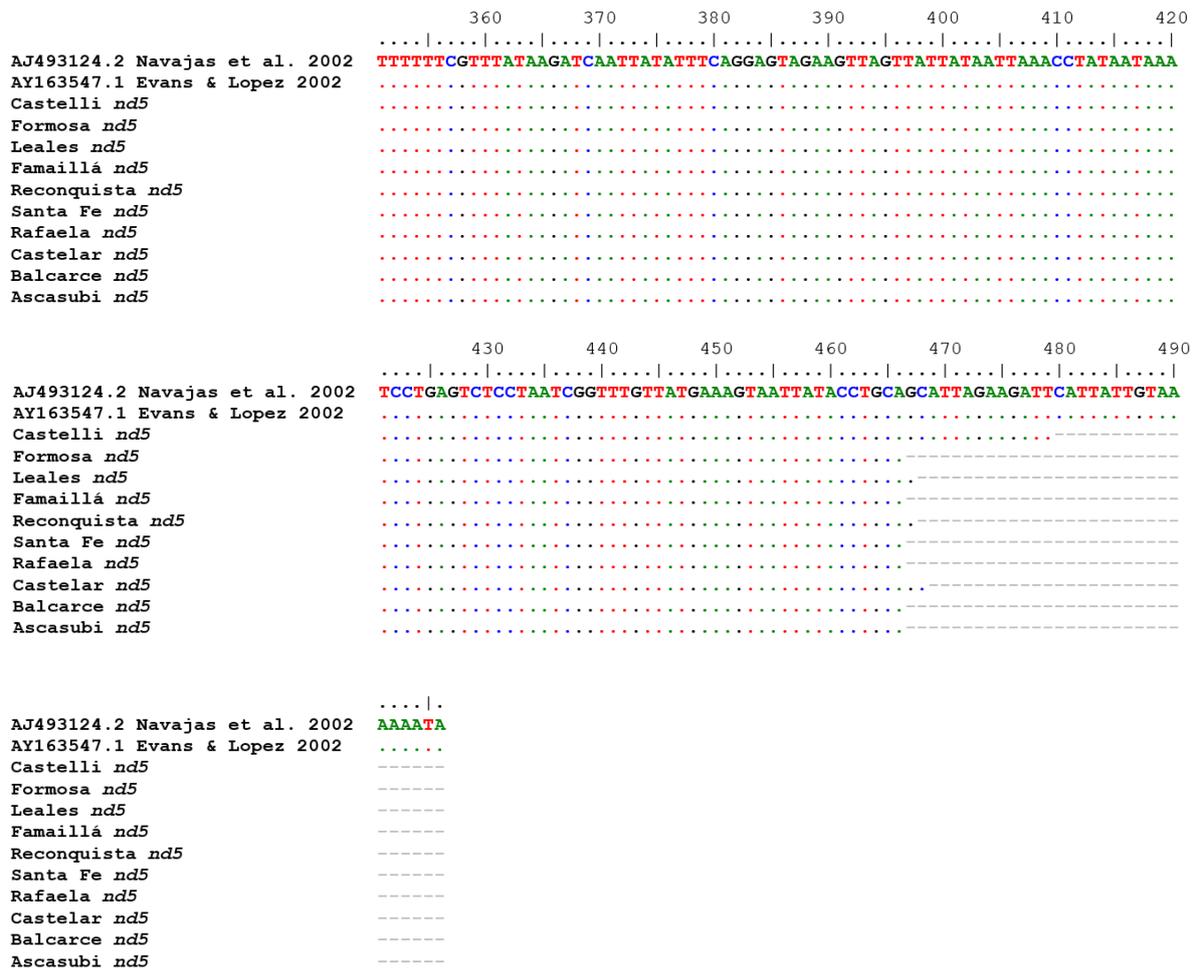
      220      230      240      250      260      270      280
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 AACTAGTGTAGAAGAATGAACTAATGCAGAAACAGGTGTAGGAGCAGCTATAGCTGCAGGTAATCAATAA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Castelli nd5 .....
Formosa nd5 .....
Leales nd5 .....
Famaillá nd5 .....
Reconquista nd5 .....
Santa Fe nd5 .....
Rafaela nd5 .....
Castelar nd5 .....
Balcarce nd5 .....
Ascasubi nd5 .....

```

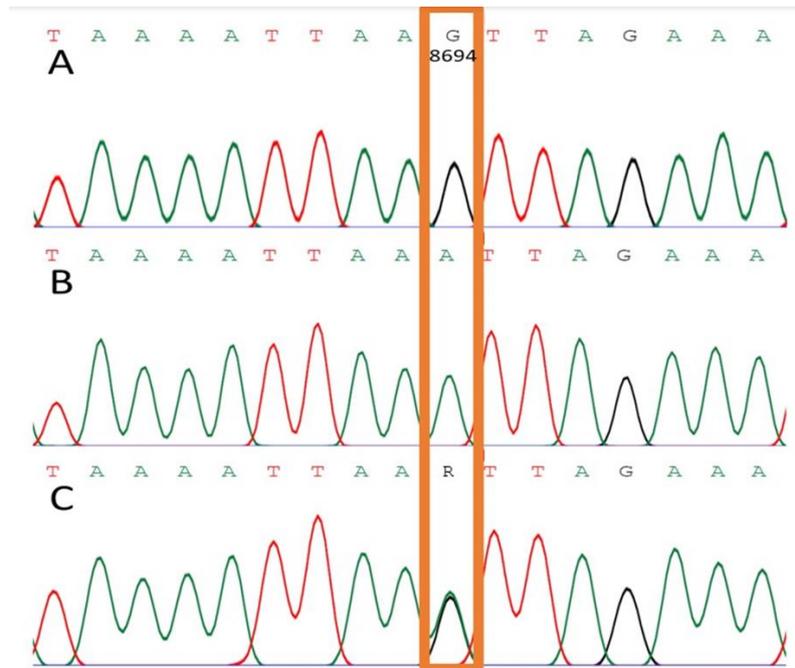
```

      290      300      310      320      330      340      350
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 GAAAAGGGTAATTGGGCTCTTTTAGTTAGGGCTCTTAAAGTAAAGAAATAATAAATAATAATGGAT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....A...
Castelli nd5 .....A...
Formosa nd5 .....A...
Leales nd5 .....A...
Famaillá nd5 .....A...
Reconquista nd5 .....A...
Santa Fe nd5 .....A...
Rafaela nd5 .....A...
Castelar nd5 .....A...
Balcarce nd5 .....A...
Ascasubi nd5 .....A...

```



**Figura Suplementaria 14.** Alineamiento de secuencias *nd5* del ADN mitocondrial (mt) de *V. destructor*. Se muestra una secuencia consenso de cada localidad muestreada. Como secuencias de referencia se utilizaron las dos versiones disponibles del genoma completo de ADNmt de *V. destructor* (AY163547.1 de Evans y Lopez 2002; y AJ493124.2 de Navajas et al. 2002).



**Figura Suplementaria 15.** Cromatogramas parciales de la secuencia *nd4* de *V. destructor* que representan individuos con subhaplotipos KArg-N1 (A) y KArg-N2 (B) y heteroplásmicos (C). R: A/G

```

          10      20      30      40      50      60      70
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 CCAATAATAGTTAAAGGCCAAATAAAGATTTCTAATAATTTAATATTTATTC AATTAATAGACATAAAA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Clonado 1 .....
Clonado 2 .....
Clonado 3 .....
Clonado 4 .....
Clonado 5 .....
Clonado 6 .....
Clonado 7 .....
Clonado 8 .....
Clonado 9 .....

```

```

          80      90      100     110     120     130     140
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 -TTCGATATATACCATATCCACCAAGTTTAAGTAGAAATACCAGCTAAAAGTATAGAACCTGCAATAGGAG
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 A.....T.
Clonado 1 .....T.
Clonado 2 .....T.
Clonado 3 .....T.
Clonado 4 .....T.
Clonado 5 .....T.
Clonado 6 .....T.
Clonado 7 .....T.
Clonado 8 .....T.
Clonado 9 .....T.

```

```

          150     160     170     180     190     200     210
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 CTTCAACATGAGCTTTGGTAATCATAGTGAAAACCATAGATAGGTTATTTGATTAATAAAGCTAAGAG
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....T.
Clonado 1 .....T.
Clonado 2 .....T.
Clonado 3 .....T.
Clonado 4 .....T.
Clonado 5 .....T.
Clonado 6 .....T.
Clonado 7 .....T.
Clonado 8 .....T.
Clonado 9 .....T.

```

```

          220     230     240     250     260     270     280
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 AAGGAATATTTATTTCAAATTTGGGTAATTTAATATTTAGAAATGTTAAAAAATATAGATAAACTATAG
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....C.
Clonado 1 .....
Clonado 2 .....
Clonado 3 .....
Clonado 4 .....
Clonado 5 .....
Clonado 6 .....
Clonado 7 .....
Clonado 8 .....
Clonado 9 .....

```

```

          290     300     310     320     330     340     350
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TGATTATTTAATATTAAGATTATTAATAGTAAAGGTAATCTACCAAAAATAGTATATAATAATAAATAAA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Clonado 1 .....
Clonado 2 .....
Clonado 3 .....
Clonado 4 .....
Clonado 5 .....
Clonado 6 .....
Clonado 7 .....
Clonado 8 .....
Clonado 9 .....

```

```

          360      370      380      390      400      410      420
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TGCTGGCTTCAAAATCGTTCATTTTGATATCCTCAAAACATAAATAAAAAATAATTTGGGATAATAGTTAT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Clonado 1 .....
Clonado 2 .....
Clonado 3 .....
Clonado 4 .....
Clonado 5 .....
Clonado 6 .....
Clonado 7 .....
Clonado 8 .....
Clonado 9 .....

```

```

          430      440      450      460      470      480      490
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TTCAAATATAATATAGAAATAAAATTAAGTTAGAAGTAGAAAATCTTAAAATTAAGTAATTAATAGAAATA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....A.....
Clonado 1 .....A.....A.....
Clonado 2 .....A.....A.....
Clonado 3 .....A.....A.....
Clonado 4 .....A.....A.....
Clonado 5 .....A.....A.....
Clonado 6 .....A.....A.....
Clonado 7 .....A.....A.....
Clonado 8 .....A.....A.....
Clonado 9 .....A.....A.....

```

```

          500      510      520      530      540      550      560
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TTAATAAAGTAAAAGTATTTTATTATATTTTATTGATAGAAAATATTAATAGAATAATCAAAATTGATA
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Clonado 1 .....
Clonado 2 .....
Clonado 3 .....
Clonado 4 .....
Clonado 5 .....
Clonado 6 .....
Clonado 7 .....
Clonado 8 .....
Clonado 9 .....

```

```

          570      580      590      600      610      620      630
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 AAATAATTAATATTTACTTATTTCAATATATAAAATAGATTATTAATTAATAAATAAATTAATATTATT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Clonado 1 .....
Clonado 2 .....
Clonado 3 .....
Clonado 4 .....
Clonado 5 .....
Clonado 6 .....
Clonado 7 .....
Clonado 8 .....
Clonado 9 .....

```

```

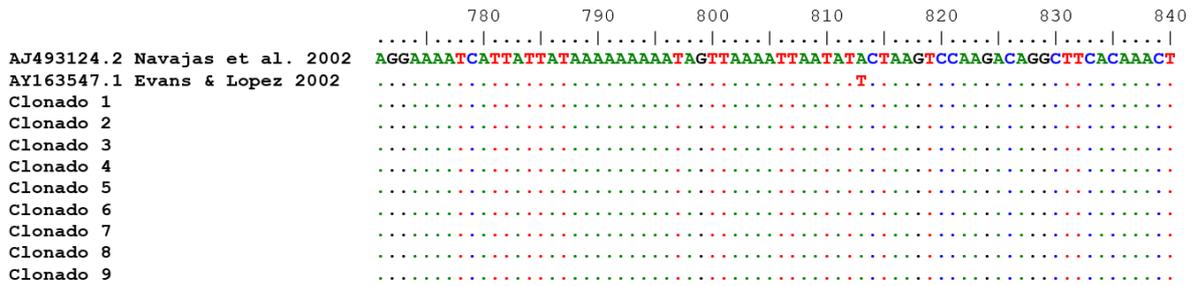
          640      650      660      670      680      690      700
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 TATATTTTAAATGAAGAAGATAAATAAAATAAAACCTAAAAAAAATTAAGTAAAGAAATTAATAAATAGTT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....A.....
Clonado 1 .....A.....
Clonado 2 .....A.....
Clonado 3 .....A.....
Clonado 4 .....A.....
Clonado 5 .....A.....
Clonado 6 .....A.....
Clonado 7 .....A.....
Clonado 8 .....A.....
Clonado 9 .....A.....

```

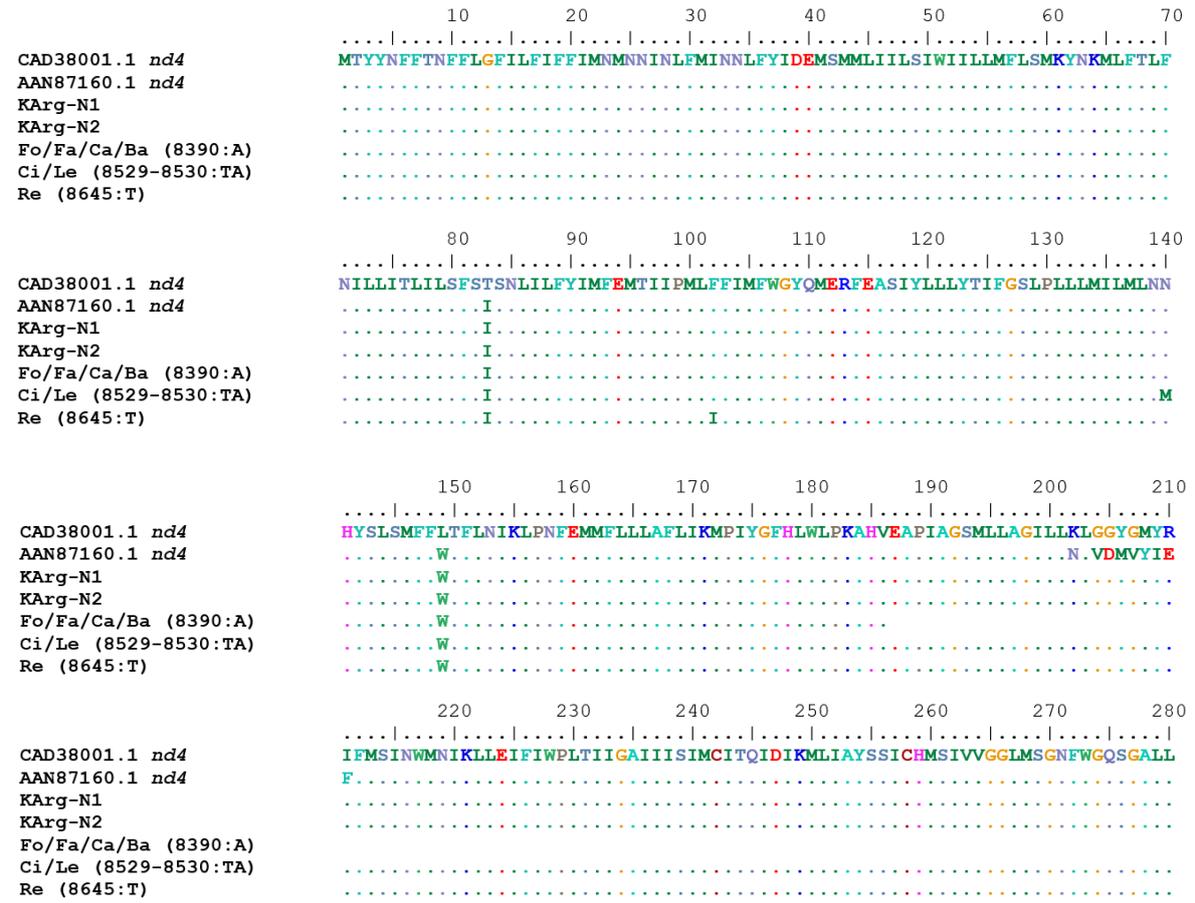
```

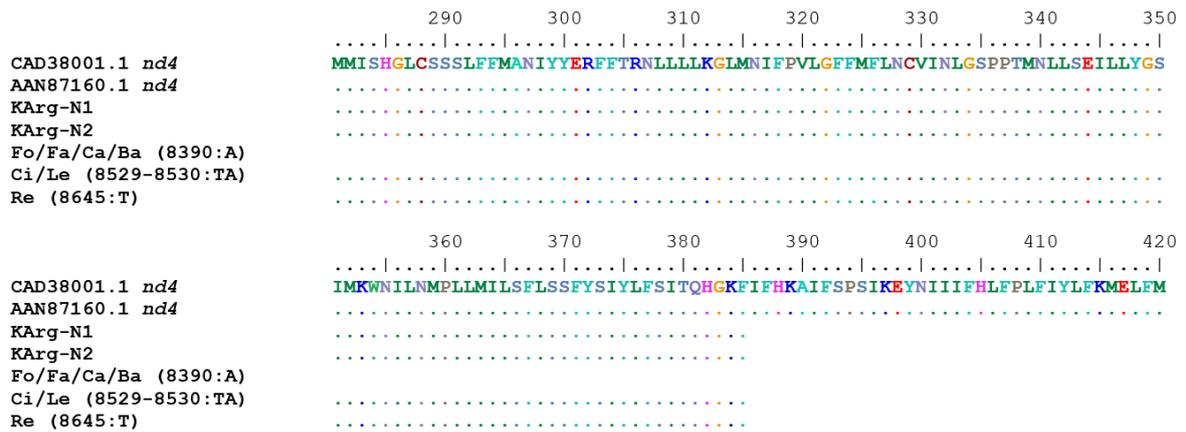
          710      720      730      740      750      760      770
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AJ493124.2 Navajas et al. 2002 ATAATAATAATAGAAAAATAATAAAAAAAGTTTAAAAATTTTAAAAATTAATAATTTTATATTATT
AY163547.1 Evans & Lopez 2002 .....
Clonado 1 .....
Clonado 2 .....
Clonado 3 .....
Clonado 4 .....
Clonado 5 .....
Clonado 6 .....
Clonado 7 .....
Clonado 8 .....
Clonado 9 .....

```



**Figura Suplementaria 16.** Alineamiento de secuencias de clonado de *nd4* del ADN mitocondrial (mt) de *V. destructor*. Se muestra una secuencia por cada clon secuenciado. Como secuencias de referencia se utilizaron las dos versiones disponibles del genoma completo de ADNmt de *V. destructor* (AY163547.1 de Evans y Lopez 2002; y AJ493124.2 de Navajas et al. 2002).





**Figura Suplementaria 17.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos predichas en función de las secuencias de nucleótidos de *nd4* de *V. destructor* obtenidas. Se muestran las secuencias consenso para cada posible variante de aminoácidos en cada localidad muestreada. Como referencia se utilizaron las dos secuencias de aminoácidos disponibles (AAN87160.1 de Evans y Lopez 2002; y CAD38001.1 de Navajas et al. 2002). Las coordenadas de los picos dobles se muestran entre paréntesis; las secuencias de aminoácidos utilizadas para estas secuencias (Fo/Fa/Ca/Ba (8390:A); Ci/Le (8529-8530:TA); Re: (8645:T)) son potenciales, ya que la variante homoplásmica con el cambio no fue observada en ninguna de las secuencias analizadas. Ci: Castelli; Fo: Formosa; Le: Leales; Fa: Famaillá; Re: Reconquista; Ca: Castelar; Ba: Balcarce.

**Tabla Suplementaria 13.** Resultados del *RNA-Seq*: Lecturas sin tratar. Se muestran las primeras 10 lecturas sin tratar para las nueve bibliotecas de *V. destructor* obtenidas. ID: identificación de GenBank para cada transcripto; R: reproducción; NR: No reproductivo; y F: Forético.

Lecturas sin tratar									
ID	R1	R2	R3	NR1	NR2	NR3	F1	F2	F3
LOC111242787	1551	1736	1990	1370	2123	1729	1389	1180	990
LOC111242788	9	23	45	21	49	90	20	17	24
LOC111242789	23	30	175	30	77	111	248	136	113
LOC111242790	481	466	608	412	619	463	345	264	282
LOC111242791	6	2	11	6	15	5	10	11	8
LOC111242792	668	793	827	722	889	868	683	624	598
LOC111242793	0	0	0	0	1	0	0	0	0
LOC111242794	151	173	198	142	243	272	459	398	334
LOC111242795	543	656	679	598	690	585	545	577	519
LOC111242796	42	52	695	35	75	284	59	59	54

La información completa se encuentra en la Tabla Suplementaria S1 del trabajo Muntaabski et al., 2022, en revisión.

**Tabla Suplementaria 14.** Resultados del *RNA-Seq*: *Trimmed Mean of M-values* (TMM). Se muestran las primeras 10 TMM generadas por *EdgeR* para las nueve bibliotecas de *V. destructor* obtenidas. ID: identificación de GenBank para cada transcripto; R: reproducción; NR: No reproductivo; y F: Forético.

<i>Trimmed Mean of M-values</i> (TMM)									
ID	R1	R2	R3	NR1	NR2	NR3	F1	F2	F3
LOC111242787	122,06	120,66	114,99	111,01	121,20	107,12	86,81	89,44	78,13
LOC111242788	0,71	1,60	2,60	1,70	2,80	5,58	1,25	1,29	1,89
LOC111242789	1,81	2,09	10,11	2,43	4,40	6,88	15,50	10,31	8,92
LOC111242790	37,85	32,39	35,13	33,38	35,34	28,68	21,56	20,01	22,25
LOC111242791	0,47	0,14	0,64	0,49	0,86	0,31	0,63	0,83	0,63
LOC111242792	52,57	55,12	47,79	58,50	50,75	53,78	42,69	47,30	47,19
LOC111242793	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
LOC111242794	11,88	12,02	11,44	11,51	13,87	16,85	28,69	30,17	26,36
LOC111242795	42,73	45,60	39,23	48,46	39,39	36,24	34,06	43,74	40,96
LOC111242796	3,31	3,61	40,16	2,84	4,28	17,59	3,69	4,47	4,26

La información completa se encuentra en la Tabla Suplementaria S1 del trabajo Muntaabski et al., 2022, en revisión.

**Tabla Suplementaria 15.** Resultados del *RNA-Seq*: *HTSFilter*. Se muestran los primeros 10 recuentos obtenidos luego de filtrar con *HTSFilter* para las nueve bibliotecas de *V. destructor* obtenidas. ID: identificación de GenBank para cada transcripto; R: reproducción; NR: No reproductivo; y F: Forético.

<i>HTSFilter</i>									
ID	R1	R2	R3	NR1	NR2	NR3	F1	F2	F3
LOC111242787	1551	1736	1990	1370	2123	1729	1389	1180	990
LOC111242788	9	23	45	21	49	90	20	17	24
LOC111242789	23	30	175	30	77	111	248	136	113
LOC111242790	481	466	608	412	619	463	345	264	282
LOC111242792	668	793	827	722	889	868	683	624	598
LOC111242794	151	173	198	142	243	272	459	398	334
LOC111242795	543	656	679	598	690	585	545	577	519
LOC111242796	42	52	695	35	75	284	59	59	54
LOC111242797	2888	3555	4971	2831	3909	3945	1090	955	818
LOC111242798	63	73	75	57	119	121	175	150	154

La información completa se encuentra en la Tabla Suplementaria S1 del trabajo Muntaabski et al., 2022, en revisión.

**Tabla Suplementaria 16.** Lista de los virus ARN asociados a *A. mellifera* examinados en las 9 bibliotecas de *V. destructor*. Se muestran los nombres de los virus, las abreviaturas, los ID y sus correspondientes referencias.

Lista de los virus ARN asociados a <i>A. mellifera</i> examinados			
Nombres de virus	Abreviaturas	ID	Referencia
Sacbrood virus	SBV	NC_002066.1	Ghosh et al 1999
Varroa destructor virus-1	VDV-1	NC_006494.1	Ongus et al 2004
Deformed wing virus-B	DWV-B	NC_006494.1	Ongus et al 2004
Varroa destructor virus-2	VDV-2	KX578271.1	Levin et al 2016
Varroa destructor virus-3	VDV-3	KX578272	Levin et al 2016
Deformed wing virus-A	DWV-A	NC_004830.2	Lanzi et al 2006
Black queen cell virus	BQCV	NC_003784.1	Leat et al 2000
Acute bee paralysis virus	ABPV	NC_002548.1	Govan et al 2000
Kashmir bee virus	KBV	NC_004807.1	de Miranda et al 2004
Chronic bee paralysis virus	CBPV	NC_010711.1	Olivier et al 2008
Chronic bee paralysis virus RNA-2	CBPV RNA-2	NC_010712.1	Olivier et al 2008
Lake sinai virus-1	LSV-1	HQ871931.2	Runckel et al 2011
Lake sinai virus-2	LSV-2	HQ888865.2	Runckel et al 2011
Aphid lethal paralysis virus	ALPV	JX045858.1	Granberg et al 2013
Big sioux river virus ou Rhopalosiphum padi virus	BSRV	NC_001874.1	Moon et al 1998
Bee Macula-like virus	BeeMLV	NC_027631.1	de Miranda et al 2015
Varroa tymo-like virus	VTLV	NC_027619.1	de Miranda et al 2015
Israeli acute paralysis virus	IAPV	NC_009025.1	Maori et al 2007
Slow bee paralysis virus	SBPV	NC_014137.1	de Miranda et al 2010
Slow bee paralysis virus Harpenden	SBPV Harpenden	GU938761.1	de Miranda et al 2010
Bee macula-like virus isolate PSU-1var	BeeMLV PSU-1var	KT162925.1	de Miranda et al 2015
Lake Sinai virus strain VBP022	LSV VBP022	KM886902.1	Ravoet et al 2015
Lake sinai virus strain VBP166	LSV VBP166	KM886903.1	Ravoet et al 2015
Lake sinai virus strain VBP256	LSV VBP256	KM886904.1	Ravoet et al 2015
Lake sinai virus strain exp10	LSV exp10	KM886905.1	Ravoet et al 2015
Cloudy wing virus	CWV	AF034543.2	Levin et al 2016
Apis rhabdovirus 1	ARV-1	MF114350.1	Levin et al 2017
Apis rhabdovirus 2	ARV-2	KY354233.1	Remnant et al 2017

Moku virus	MV	NC_031338.1	Levin et al 2016
Varroa orthomyxovirus-1	VOV-1	MK032465.1/MK032466.1/MK032467.1/MK032468.1/MK032469.1/MK032470.1	Levin et al 2019
Apis flavivirus isolate	AFV	NC_035071.1	Remnant et al 2017

**Tabla Suplementaria 17.** Genes diferencialmente expresados (GDE) en la comparación pareada R vs. F. Se muestran los primeros 10 GDE identificados por *EdgeR*. ID: identificación de GenBank para cada transcripto; FC: *fold-change*; CPM: cuentas por millón; FDR: *False Discovery rate correction*; P: P valor.

Genes diferencialmente expresados (comparación R vs. F)				
ID	LogFC	LogCPM	P	FDR
LOC111243768	-3,03	7,04	1,29E-12	1,34E-08
LOC111251238	2,92	6,48	1,68E-11	7,64E-08
LOC111251031	5,72	4,50	2,21E-11	7,64E-08
LOC111248402	2,12	6,80	1,85E-10	3,20E-07
LOC111252413	2,33	7,49	1,55E-10	3,20E-07
LOC111247010	2,75	8,94	1,43E-10	3,20E-07
LOC111243823	2,14	6,42	2,50E-10	3,25E-07
LOC111254754	2,60	8,00	2,40E-10	3,25E-07
LOC111253784	2,20	5,57	3,29E-10	3,80E-07
LOC111255008	2,20	6,80	4,59E-10	4,77E-07

La información completa se encuentra en la Tabla Suplementaria S2 del trabajo Muntaabski et al., 2022, en revisión.

**Tabla Suplementaria 18.** Genes diferencialmente expresados (GDE) en la comparación pareada NR vs. F. Se muestran los primeros 10 GDE identificados por *EdgeR*. ID: identificación de GenBank para cada transcripto; FC: *fold-change*; CPM: cuentas por millón; FDR: *False Discovery rate correction*; P: P valor..

Genes diferencialmente expresados (comparación NR vs. F)				
ID	LogFC	LogCPM	P	FDR
LOC111251238	2,77	6,48	4,28E-11	4,44E-07
LOC111243768	-2,28	7,04	1,55E-10	8,07E-07
LOC111247010	2,50	8,94	7,79E-10	2,70E-06
LOC111248402	1,95	6,80	1,18E-09	3,07E-06
LOC111251031	4,18	4,50	1,68E-09	3,50E-06
LOC111249266	1,92	7,41	3,89E-09	3,67E-06
LOC111253784	1,98	5,57	3,32E-09	3,67E-06
LOC111255008	1,98	6,80	4,59E-09	3,67E-06
LOC111252413	2,03	7,49	2,30E-09	3,67E-06
LOC111251311	2,16	6,28	4,18E-09	3,67E-06

La información completa se encuentra en la Tabla Suplementaria S2 del trabajo Muntaabski et al., 2022, en revisión.

**Tabla Suplementaria 19.** Genes diferencialmente expresados (GDE) en la comparación pareada R vs. NR. Se muestran solamente los GDE identificados por *EdgeR*. ID: identificación de GenBank para cada transcripto; FC: *fold-change*; CPM: cuentas por millón; FDR: *False Discovery rate correction*; P: P valor.

Comparación pareada y genes diferencialmente expresados (R vs. NR)				
ID	LogFC	LogCPM	P	FDR
LOC111251125	-2,26	3,04	7,82E-07	4,06E-03
LOC111245737	-2,10	5,17	5,07E-09	5,27E-05
LOC111244790	-1,59	10,37	2,20E-04	7,37E-02
LOC111242894	-1,54	2,46	2,53E-04	7,72E-02
LOC111254780	-1,30	7,40	7,40E-05	5,43E-02
LOC111243919	-1,10	7,42	2,47E-05	2,85E-02
LOC111247770	-0,98	10,72	3,03E-04	8,50E-02
LOC111247275	-0,96	5,83	1,46E-04	6,95E-02
LOC111247157	-0,91	5,08	8,55E-06	1,48E-02
LOC111249035	-0,91	10,10	3,67E-04	9,09E-02
LOC111251627	-0,90	3,98	4,03E-04	9,44E-02
LOC111250594	-0,85	8,52	1,69E-04	7,03E-02
LOC111254253	-0,82	4,37	2,61E-04	7,76E-02
LOC111244127	-0,81	6,87	1,90E-05	2,46E-02
LOC111251906	-0,78	6,31	5,58E-05	4,83E-02
LOC111247563	-0,77	10,15	2,80E-05	2,91E-02
LOC111243768	-0,75	7,04	1,39E-06	4,80E-03
LOC111245348	-0,73	9,15	2,18E-04	7,37E-02
LOC111245471	-0,73	6,60	1,71E-05	2,46E-02
LOC111249606	-0,73	6,06	4,59E-06	9,54E-03
LOC111252575	-0,73	7,34	9,74E-05	6,23E-02
LOC111249147	-0,73	6,58	1,08E-04	6,23E-02
LOC111251756	-0,72	4,63	4,07E-04	9,44E-02
LOC111251748	-0,71	5,14	1,90E-04	7,09E-02

LOC111244152	-0,70	7,85	1,69E-04	7,03E-02
LOC111247963	-0,69	8,69	7,84E-05	5,43E-02
LOC111249175	-0,69	9,91	1,91E-04	7,09E-02
LOC111252565	-0,67	9,22	3,54E-04	9,09E-02
LOC111247894	-0,66	9,06	1,40E-04	6,95E-02
LOC111252465	-0,66	6,23	1,02E-04	6,23E-02
LOC111253294	-0,62	6,15	1,90E-04	7,09E-02
LOC111244227	-0,61	9,29	3,23E-04	8,83E-02
LOC111253281	-0,61	10,01	6,03E-05	4,83E-02
LOC111251098	-0,61	4,93	3,61E-04	9,09E-02
LOC111245346	-0,60	7,89	2,99E-04	8,50E-02
LOC111252893	-0,60	7,09	6,05E-05	4,83E-02
LOC111251520	-0,55	6,29	2,51E-04	7,72E-02
LOC111245140	-0,54	6,55	1,47E-04	6,95E-02
LOC111251557	-0,53	9,82	2,48E-04	7,72E-02
LOC111245933	-0,53	7,97	3,47E-04	9,09E-02
LOC111249842	-0,45	5,23	1,27E-04	6,95E-02
LOC111251603	-0,42	8,27	4,09E-04	9,44E-02
LOC111251031	1,54	4,50	2,66E-06	6,91E-03
LOC111243751	3,69	0,07	2,08E-04	7,37E-02
LOC111252634	5,04	-0,40	1,63E-04	7,03E-02

La información completa se encuentra en la Tabla Suplementaria S2 del trabajo Muntaabski et al., 2022, en revisión.

**Tabla Suplementaria 20.** Términos GO enriquecidos para la comparación R vs. F. Se muestran los términos GO enriquecidos obtenidos utilizando el método *Gene Score Resampling* (GSR) en el ErmineR.

Nombre	ID	P Valor corregido	Multifuncionalidad
<i>structural constituent of cuticle</i>	GO:0042302	3,56E-10	0,00209
<i>protein dimerization activity</i>	GO:0046983	7,27E-07	0,00348
<i>structural molecule activity</i>	GO:0005198	1,87E-05	0,00627
<i>extracellular region</i>	GO:0005576	1,85E-03	0,682
<i>transporter activity</i>	GO:0005215	2,40E-03	0,967
<i>drug metabolic process</i>	GO:0017144	2,15E-03	0,82
<i>aminoglycan metabolic process</i>	GO:0006022	4,58E-03	0,27
<i>chitin metabolic process</i>	GO:0006030	4,01E-03	0,271
<i>amino sugar metabolic process</i>	GO:0006040	4,01E-03	0,27
<i>chitin binding</i>	GO:0008061	4,01E-03	0,269
<i>glucosamine-containing compound metabolic process</i>	GO:1901071	4,01E-03	0,272
<i>extracellular ligand-gated ion channel activity</i>	GO:0005230	0,01029953	0,694
<i>ligand-gated ion channel activity</i>	GO:0015276	0,01029953	0,695
<i>ligand-gated channel activity</i>	GO:0022834	0,01029953	0,693
<i>ion channel activity</i>	GO:0005216	0,01338174	0,794
<i>channel activity</i>	GO:0015267	0,01338174	0,794
<i>passive transmembrane transporter activity</i>	GO:0022803	0,01338174	0,792
<i>substrate-specific channel activity</i>	GO:0022838	0,01338174	0,793
<i>lipid transport</i>	GO:0006869	0,01763818	0,691
<i>gated channel activity</i>	GO:0022836	0,01903334	0,754
<i>ion gated channel activity</i>	GO:0022839	0,01903334	0,753
<i>lipid localization</i>	GO:0010876	0,02067538	0,705
<i>transmembrane signaling receptor activity</i>	GO:0004888	0,04429552	0,348
<i>signaling receptor activity</i>	GO:0038023	0,04429552	0,348
<i>molecular transducer activity</i>	GO:0060089	0,04429552	0,347

**Tabla Suplementaria 21.** Términos GO enriquecidos para la comparación NR vs. F. Se muestran los términos GO enriquecidos obtenidos utilizando el método *Gene Score Resampling* (GSR) en el ErmineR.

Nombre	ID	P Valor corregido	Multifuncionalidad
<i>aminoglycan metabolic process</i>	GO:0006022	3,56E-10	0,27
<i>chitin metabolic process</i>	GO:0006030	1,78E-10	0,271
<i>amino sugar metabolic process</i>	GO:0006040	1,78E-10	0,27
<i>chitin binding</i>	GO:0008061	1,78E-10	0,269
<i>structural constituent of cuticle</i>	GO:0042302	1,19E-10	0,00209
<i>glucosamine-containing compound metabolic process</i>	GO:1901071	1,78E-10	0,272
<i>protein dimerization activity</i>	GO:0046983	1,48E-10	0,00348
<i>extracellular region</i>	GO:0005576	4,38E-07	0,682
<i>drug metabolic process</i>	GO:0017144	5,99E-06	0,82
<i>lipid transport</i>	GO:0006869	9,15E-03	0,691
<i>lipid localization</i>	GO:0010876	0,01068	0,705
<i>transporter activity</i>	GO:0005215	0,04118703	0,967
<i>structural molecule activity</i>	GO:0005198	0,04900558	0,00627

**Tabla Suplementaria 22.** Términos GO enriquecidos para la comparación R vs. NR. Se muestran los términos GO enriquecidos obtenidos utilizando el método *Gene Score Resampling* (GSR) en el ErmineR.

Nombre	ID	P Valor corregido	Multifuncionalidad
<i>structural constituent of cuticle</i>	GO:0042302	1,78E-10	0,00209
<i>structural molecule activity</i>	GO:0005198	3,56E-10	0,00627
<i>ion channel activity</i>	GO:0005216	7,08E-03	0,794
<i>channel activity</i>	GO:0015267	7,08E-03	0,794
<i>passive transmembrane transporter activity</i>	GO:0022803	7,08E-03	0,792
<i>substrate-specific channel activity</i>	GO:0022838	7,08E-03	0,793
<i>DNA-binding transcription factor activity</i>	GO:0003700	0,01259234	0,497
<i>extracellular ligand-gated ion channel activity</i>	GO:0005230	0,01440426	0,694
<i>ligand-gated ion channel activity</i>	GO:0015276	0,01440426	0,695

<i>ligand-gated channel activity</i>	GO:0022834	0,01440426	0,693
<i>gated channel activity</i>	GO:0022836	0,01739278	0,754
<i>ion gated channel activity</i>	GO:0022839	0,01739278	0,753
<i>transcription regulator activity</i>	GO:0140110	0,02365181	0,632
<i>inorganic molecular entity transmembrane transporter activity</i>	GO:0015318	0,16439867	0,978
<i>ion transmembrane transporter activity</i>	GO:0015075	0,24794554	0,976

**Tabla Suplementaria 23.** Genes diferencialmente expresados (GDE) en el análisis global. Se muestran los primeros 10 GDE identificados por *EdgeR*. ID: identificación de GenBank para cada transcripto; FC: *fold-change*; CPM: cuentas por millón; FDR: *False Discovery rate correction*; P: P valor.

Genes diferencialmente expresados (GDE)						
ID	LogFC R vs. F	LogFC NR vs. F	LogFC R vs. NR	LogCPM	P	FDR
LOC111243768	-3,03	-2,28	-0,75	7,04	7,29E-14	7,57E-10
LOC111251238	2,92	2,77	0,15	6,48	2,50E-12	1,18E-08
LOC111248402	2,12	1,95	0,17	6,80	3,40E-12	1,18E-08
LOC111243823	2,14	1,85	0,28	6,42	6,28E-12	1,32E-08
LOC111252413	2,33	2,03	0,30	7,49	7,53E-12	1,32E-08
LOC111249534	1,85	1,63	0,22	6,85	7,59E-12	1,32E-08
LOC111253784	2,20	1,98	0,22	5,57	9,28E-12	1,38E-08
LOC111249266	2,05	1,92	0,13	7,41	1,10E-11	1,42E-08
LOC111255008	2,20	1,98	0,22	6,80	1,40E-11	1,62E-08
LOC111247010	2,75	2,50	0,25	8,94	1,93E-11	1,75E-08

La información completa se encuentra en la Tabla Suplementaria S2 del trabajo Muntaabski et al., 2022, en revisión.

**Tabla Suplementaria 24.** Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados (GDE) identificados en la comparación R vs. NR. Se muestra la identificación (ID) de GenBank, el nombre y la función putativa para cada gen. El término GO indica el número de identificación de cada GO; KEGG *Orthology* indica el número de identificación de cada KEGG *Orthology*; LogFc muestra el “*fold-change*” para la relación R/NR.

Análisis funcional de los GDE de la comparación R vs NR					
ID	Descripción del gene	Función putativa	Término GO	KEGG <i>Orthology</i>	logFC
LOC111251031	<i>cuticle protein 6.4-like</i>	<i>Component of the cuticle.</i>			1,54
LOC111243751	<i>transcription factor AP-1-like</i>	<i>Modulators of cellular processes: differentiation, proliferation, immune regulation and apoptosis.</i>	GO:0006355 GO:0003700 GO:0003677	K04448	3,69
LOC111252634	<i>protein patched homolog 1-like</i>	<i>Repressive activity on cell proliferation. DNA maintenance, repair and replication patched.</i>	GO:0016021	K06225	5,04
LOC111254780	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-1,30
LOC111247563	<i>troponin T-like</i>	<i>Development and maintenance of muscle and nervous system.</i>	GO:0006937	K12046	-0,77
LOC111251557	<i>myosin regulatory light chain 2-like</i>	<i>This chain binds calcium.</i>	GO:0005509	K12757	-0,53
LOC111245933	<i>gamma-butyrobetaine dioxygenase-like</i>	<i>Involved in the carnitine biosynthesis pathway.</i>	GO:0016491 GO:0055114	K00471	-0,53
LOC111249606	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-0,73
LOC111251748	<i>lncRNA</i>				-0,71
LOC111247963	<i>cytochrome P450 3A56-like</i>	<i>Catalyzes the 6 beta-hydroxylation of lithocholic acid and steroid hormones.</i>	GO:0055114 GO:0016705 GO:0020037 GO:0005506	K14999	-0,69
LOC111243768	<i>transmembrane protease serine 9-like</i>	<i>Serine endopeptidase activity.</i>	GO:0004252	K01312	-0,75

			GO:0006508		
LOC111253281	<i>troponin I-like</i>	<i>Development and maintenance of muscle and nervous system.</i>	GO:0005861	K12044	-0,61
LOC111245346	<i>S-adenosylmethionine synthase-like</i>	<i>Catalyzes the formation of S-adenosylmethionine. Cell growth and repair.</i>	GO:0006556	K00789	-0,60
			GO:0004478		
			GO:0005524		
LOC111249175	<i>lncRNA</i>				-0,69
LOC111245737	<i>la-related protein 6-like</i>	<i>Transcriptional regulator.</i>	GO:0006396	K18733	-2,10
			GO:0003723		
			GO:1990904		
			GO:0005634		
LOC111249842	<i>forkhead box protein P1-like</i>	<i>Transcription factor expressed in the nervous system. It is involved in locomotion, operant self-learning and courtship behavior.</i>	GO:0006355	K09409	-0,45
			GO:0043565		
			GO:0003700	K23582	
LOC111251627	<i>lysoplasmalogenase-like protein TMEM86A</i>	<i>Lysoplasmalogenase activity.</i>	GO:0016021		-0,90
LOC111254253	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-0,82
LOC111247157	<i>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>	<i>Calcium ion binding.</i>	GO:0005509	K17307	-0,91
LOC111245348	<i>muscle LIM protein 1-like</i>	<i>Plays a role in cell differentiation late in myogenesis. Transcription factor Mef2 is essential for expression.</i>		K09377	-0,73
LOC111247275	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>		K23353	-0,96
LOC111247894	<i>cuticle protein</i>	<i>Component of the cuticle.</i>	GO:0042302		-0,66
LOC111252893	<i>carboxypeptidase Q-like</i>	<i>Hydrolysis of circulating peptides.</i>	GO:0070573		-0,60
LOC111244152	<i>cytochrome P450 4C1-like</i>	<i>Involved in the metabolism of hormones and in the breakdown of synthetic insecticides.</i>	GO:0055114	K15001	-0,70
			GO:0016705		

			GO:0005506		
			GO:0020037		
LOC111247770	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-0,98
LOC111243919	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-1,10
LOC111244790	<i>vitellogenin-6-like</i>	<i>Precursor of the egg-yolk proteins that are sources of nutrients during embryonic development.</i>	GO:0006869		-1,59
			GO:0005319		
LOC111245140	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-0,54
LOC111244227	<i>ADP,ATP carrier protein 1-like</i>	<i>Catalyzes the exchange of ADP and ATP across the mitochondrial inner membrane.</i>	GO:1990544	K05863	-0,61
			GO:0140021		
			GO:0055085		
			GO:0005471	K03783	
			GO:0005743		
LOC111245471	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-0,73
LOC111251603	<i>BAG domain-containing protein Samui-like</i>	<i>Play a role in transmitting a signal which both protects non-diapause eggs from cold injury and terminates diapause in diapause eggs.</i>	GO:0051087		-0,42
LOC111244127	<i>purine nucleoside phosphorylase-like</i>	<i>Purine nucleoside phosphorylase involved in purine salvage.</i>	GO:0006139		-0,81
			GO:0009116		
			GO:0004731		
			GO:0003824		
LOC111249147	<i>cytochrome c</i>	<i>Component of the respiratory chain.</i>	GO:0009055	K08738	-0,73
			GO:0020037		
LOC111252575	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-0,73
LOC111251520	<i>major egg antigen-like</i>	<i>Response to heat shock or other environmental stresses.</i>		K09542	-0,55

LOC111242894	<i>lncRNA</i>				-1,54
LOC111249035	<i>hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial-like</i>	<i>Catalyzes the cofactor-independent reversible oxidation of gamma-hydroxybutyrate (GHB).</i>	GO:0055114 GO:0046872 GO:0016491	K11173	-0,91
LOC111253294	<i>lncRNA</i>				-0,62
LOC111251906	<i>lncRNA</i>				-0,78
LOC111250594	<i>sarcalumenin-like</i>	<i>Participate in calcium cell signalling pathways.</i>	GO:0005525		-0,85
LOC111251098	<i>myosin light chain kinase, smooth muscle-like</i>	<i>Serine/threonine-specific protein kinase that phosphorylates a specific myosin light chain: the regulatory light chain of myosin II.</i>	GO:0006468 GO:0004672 GO:0005524	K00907	-0,61
LOC111252565	<i>troponin C</i>	<i>Development and maintenance of muscle and nervous system.</i>	GO:0005509	K02183	-0,67
LOC111251125	<i>glutamate receptor-like</i>	<i>Excitatory neurotransmitter at many synapses</i>	GO:0004970 GO:0016020	K05313	-2,26
LOC111251756	<i>putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 7</i>	<i>Mediates sodium-dependent transport of amino acids, preferentially L-glutamine.</i>		K14994	-0,72
LOC111252465	<i>uncharacterized</i>	<i>Uncharacterized.</i>			-0,66

**Tabla Suplementaria 25.** Análisis de KEGGs asociados a los genes diferencialmente expresados (GDE) identificados en la comparación R vs. NR. KEGG *BRITE1* y *BRITE2* son clasificaciones jerárquicas de entidades biológicas definidas en la base de datos KEGG. KEGG *Pathway* indica el código de identificación de las vías KEGGs en la base de datos KEGG. La clase indica el nombre de cada vía KEGG. KEGG *Orthology* indica el número de identificación de cada KEGG *Orthology* en la base de datos KEGG. Definición indica el nombre de cada KEGG *Orthology*. Enzima indica los nombres de las enzimas de cada KEGG *Orthology*.

Análisis de KEGG de GDE identificados en la comparación R vs. NR							
KEGG <i>BRITE1</i>	KEGG <i>BRITE2</i>	KEGG <i>Pathway</i>	Clase	KEGG <i>Orthology</i>	Abreviación	Definición	Enzima
Metabolismo	Metabolismo de aminoácidos	map00270	Metabolismo de la cisteína y la metionina	K00789	metK	<i>S-adenosylmethionine synthetase</i>	EC:2.5.1.6
		map00310	Degradación de lisina	K00471	BBOX1	<i>gamma-butyrobetaine dioxygenase</i>	EC:1.1.4.11.1
	Metabolismo de nucleotidos	map00230	Metabolismo de las purinas	K03783	punA	<i>purine-nucleoside phosphorylase</i>	EC:2.4.2.1
		map00240	Metabolismo de las pirimidinas	K03783	punA	<i>purine-nucleoside phosphorylase</i>	EC:2.4.2.1
	Metabolismo de cofactores y vitaminas.	map00760	Metabolismo del nicotinato y la nicotinamida	K03783	punA	<i>purine-nucleoside phosphorylase</i>	EC:2.4.2.1
Procesamiento de información genética	Plegado, clasificación y degradación	map04141	Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	K09542	CRYAB	<i>crystallin, alpha B</i>	
Tratamiento de Información	Transducción de señales	map04341	Vía de señalización Hedgehog - fly	K06225	PTCH1	<i>patched 1</i>	

Ambiental		map04013	Vía de señalización MAPK - fly	K04448	JUN	<i>transcription factor AP-1</i>	
		map04310	Vía de señalización Wnt	K04448	JUN	<i>transcription factor AP-1</i>	
		map04070	Sistema de señalización de fosfatidilinositol	K02183	CALM	<i>calmodulin</i>	
	Moléculas de señalización e interacción.	map04080	Interacción ligando-receptor neuroactivo	K01312	PRSS1_2_3	<i>trypsin</i>	EC:3.4.21.4
Procesos Celulares	Transporte y catabolismo	map04137	Mitofagia - animal	K04448	JUN	<i>transcription factor AP-1</i>	
	Crecimiento y muerte celular	map04214	Apoptosis - fly	K08738	CYC	<i>cytochrome c</i>	
				K04448	JUN	<i>transcription factor AP-1</i>	
		map04215	Apoptosis - múltiples especies	K08738	CYC	<i>cytochrome c</i>	
Sistemas de Órganos	Sistema inmunitario	map04624	Vía de señalización Toll e Imd	K04448	JUN	<i>transcription factor AP-1</i>	
	Sistema sensorial	map04745	Fototransducción - fly	K02183	CALM	<i>calmodulin</i>	
	Envejecimiento	map04213	Vía de regulación de la longevidad - múltiples especies	K09542	CRYAB	<i>crystallin, alpha B</i>	

**Tabla Suplementaria 26.** Análisis de lncRNA identificados como diferencialmente expresados en la comparación R vs. NR. Se detalla el ID de GenBank, el número de exones y la ubicación celular de cada lncRNA. Se indica el ID de GenBank, el nombre, los términos GO y los KEGG *Orthology* de los potenciales genes *target* ubicados 100 kb río arriba (en azul) y río abajo (en rojo) de cada lncRNA.

**Análisis de lncRNA identificados como expresados diferencialmente en la comparación de R vs. NR**

ID	Descripción del gen	logFC	Nº de exones	Localización	Genes Río arriba /Río abajo	Descripción del gen potencialmente <i>target</i>	Término GO	KEGG <i>Orthology</i>
LOC111242894	lncRNA	-1,536	4	Núcleo	LOC111255273	<i>protein ovo-like</i>		K09216
					LOC111255342	<i>otopetrin-1-like</i>		
LOC111251906	lncRNA	-0,775	3	Núcleo	LOC111251998	<i>mitochondrial carrier homolog 2-like</i>		K17885
					LOC111251999	<i>vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like</i>	GO:0042373	K05357
							GO:0047057	
					LOC111251996	<i>valine--tRNA ligase, mitochondrial 1-like</i>	GO:0006418	K01873
							GO:0006438	
							GO:0005524	
							GO:0004812	
GO:0000166								
LOC111251995	<i>uncharacterized</i>	GO:0002161						
		GO:0004832						
LOC111251995	<i>uncharacterized</i>	GO:0006281						
		GO:0043138						
LOC111251792	<i>protein KRI1 homolog</i>		K14786					

					LOC111251244	<i>twinkle protein, mitochondrial-like</i>		
					LOC111251245	<i>transmembrane emp24 domain-containing protein 7-like</i>		K20349
					LOC111251268	<i>uncharacterized</i>		
					LOC111251699	<i>nucleoredoxin-like protein 2</i>		
					LOC111250771	<i>glutamate receptor ionotropic, kainate 2-like</i>	GO:0006811	K05313
						GO:0004970		
						GO:0038023		
						GO:0005216		
						GO:0015276		
						GO:0016020		
LOC111251748	lncRNA	-0,707	4	Núcleo	LOC111251597	<i>uncharacterized</i>		K14313
					LOC111251177	<i>tryptophan--tRNA ligase, mitochondrial-like</i>	GO:0006418	K01867
						GO:0006436		
						GO:0005524		
						GO:0000166		
						GO:0004812		
						GO:0004830		
					LOC111251137	<i>thyroid adenoma-associated protein homolog</i>		K24169
					LOC111251138	<i>uncharacterized</i>		
LOC111249175	lncRNA	-0,688	2	Núcleo	LOC111249073	<i>glycine-rich cell wall structural protein-like</i>		
					LOC111250227	<i>glycine-rich RNA-binding protein 2-like</i>		

LOC111250137	<i>GPI mannosyltransferase 2-like</i>	GO:0006506	K07542
		GO:0004376	
		GO:0000009	
LOC111249705	<i>collagen alpha-1(I) chain-like</i>		
LOC111248599	<i>very low-density lipoprotein receptor-like</i>		K20053
LOC111249188	<i>S-phase kinase-associated protein 1-like</i>	GO:0006511	K03094
LOC111249072	<i>glycine-rich cell wall structural protein 1.8-like</i>		
LOC111249850	<i>protein ECT2-like</i>	GO:0043547	
		GO:2000431	
		GO:0005085	
		GO:0005096	
		GO:0005737	
		GO:0005634	
LOC111249851	<i>carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform-like</i>	GO:0016746	K08765
LOC111249852	<i>cullin-4B-like</i>	GO:0006511	K10609
		GO:0031625	
		GO:0031461	
LOC111249854	<i>transcription initiation factor TFIIID subunit 9B-like</i>	GO:0006352	K03133
		GO:0046982	
LOC111249853	<i>GPI mannosyltransferase 1-like</i>	GO:0006506	K05284
		GO:0004376	

							GO:0051751	
							GO:0016021	
					LOC111249071	<i>uncharacterized</i>		
					LOC111249855	<i>uncharacterized</i>		
					LOC111249070	<i>serine/threonine-protein kinase PLK1-like</i>	GO:0006468	
							GO:0005515	
							GO:0005524	
							GO:0004672	
LOC111253294	lncRNA	-0,618	3	Núcleo	LOC111253293	<i>neuferricin-like</i>		
					LOC111252460	<i>DNA topoisomerase 3-alpha-like</i>	GO:0006265	K03165
							GO:0003916	
							GO:0003677	
							GO:0003676	
							GO:0008270	
							GO:0003917	
					LOC111252464	<i>DNA fragmentation factor subunit beta-like</i>	GO:0006915	K02311
							GO:0006309	
							GO:0016787	
							GO:0004536	
							GO:0005634	
							GO:0005737	

				LOC111252466	<i>protein YIPF6-like</i>		K22943
				LOC111252462	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial-like</i>	GO:0042773	K03934
						GO:0008137	
						GO:0051536	
						GO:0016491	
						GO:0016651	
						GO:0016020	
				LOC111252463	<i>synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like</i>	GO:0016491	
				LOC111252465	<i>uncharacterized</i>		
				LOC111253292	<i>sodium-dependent dopamine transporter-like</i>	GO:0016021	K05036
				LOC111253291	<i>serine palmitoyltransferase 2-like</i>	GO:0009058	K00654
						GO:0030170	
						GO:0003824	
						GO:0016740	
				LOC111252740	<i>uncharacterized</i>		K13871



**Tabla Suplementaria 28.** Resultados del GLMM para la comparación de la abundancia relativa de los 10 virus de *A. mellifera* detectados en las bibliotecas de *V. destructor*. Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen cual virus es más probable encontrar en los ácaros. Para cada comparación pareada entre los virus detectados se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C.) y el P-valor (P). SBV: Sacbrood virus; VDV-1/DWV-B: Varroa destructor virus-1/Deformed wing virus-B; VDV-2: Varroa destructor virus-2; VDV-3: Varroa destructor virus-3; DWV-A: Deformed wing virus-A; BQCV: Black queen cell virus; BeeMLV: Bee Macula-like virus; BeeMLV PSU-1var: Bee macula-like virus isolate PSU-1var; ARV-1: Apis rhabdovirus 1; ARV-2: Apis rhabdovirus 2.

Virus	%		O.R.	I.C.		P
BQCV / ARV-1	-100	2,43E+19	0	0	2,43E+17	1
BQCV / ARV-2	16,7	1,11E+19	5,55E+16	1,167	1,11E+17	0,008
BQCV / BeeMLV	-100	3,25E+17	0	0	3,25E+15	1
BQCV / BeeMLV PSU-1var	-100	3,31E+24	1	0	3,31E+22	1
BQCV / DWV-A	91,554	3,9E+12	1,95E+10	1,91554	3,9E+10	0,0005
BQCV / SBV	-100	8,74E+187	119	0	8,74E+185	1
BQCV / VDV-1/DWV-B	-100	2,27E+52	8	0	2,27E+50	1
BQCV / VDV-2	447,87	3,32E+16	1,66E+14	5,4787	3,32E+14	<0,0001
BQCV / VDV-3	-100	2,07E+28	1	0	2,07E+26	1
ARV-1 / ARV-2	-100	1,31E+11	655000000	0	131000000	1
ARV-1 / BeeMLV	-100	436999900	0	0	4370000	1
ARV-1 / BeeMLV PSU-1var	-100	1,88E+19	5	0	1,88E+17	1
ARV-1 / DWV-A	81,516	2700	14,90758	1,81516	28	0,0008
ARV-1 / SBV	-100	1,2E+188	715	0	1,2E+186	1
ARV-1 / VDV-1/DWV-B	-100	4,88E+50	46	0	4,88E+48	1
ARV-1 / VDV-2	-100	24099900	120500	0	241000	0,9995
ARV-1 / VDV-3	-100	1,28E+24	9	0	1,28E+22	1
ARV-2 / BeeMLV	16	124999900	625000,58	1,16	1250000	0,036
ARV-2 / BeeMLV PSU-1var	3,9	1,24E+19	6,2E+16	1,039	1,24E+17	0,0069
ARV-2 / DWV-A	27,817	600	4,139085	1,27817	7	0,006
ARV-2 / SBV	59	1,4E+188	7E+185	1,59	1,4E+186	0,0008
ARV-2 / VDV-1/DWV-B	89	4,84E+50	2,42E+48	1,89	4,84E+48	0,0049
ARV-2 / VDV-2	-100	6199900	31000	0	62000	0,9992

ARV-2 / VDV-3	277,7	9,7E+23	4,85E+21	3,777	9,7E+21	<0,0001
BeeMLV / BeeMLV PSU-1var	-100	6,7E+18	29	0	6,7E+16	1
BeeMLV / DWV-A	-100	-100	0	0	0	<0,0001
BeeMLV / SBV	-100	5,52E+188	4210	0	5,52E+186	1
BeeMLV / VDV-1/DWV-B	-100	1,1E+51	271	0	1,1E+49	1
BeeMLV / VDV-2	201,4	18000	92,007	3,014	181	<0,0001
BeeMLV / VDV-3	-100	8,66E+23	50	0	8,66E+21	1
BeeMLV PSU-1var / DWV-A	59,82	9,32E+10	466000001	1,5982	932000000	0,0008
BeeMLV PSU-1var / SBV	-100	7,69E+187	147	0	7,69E+185	1
BeeMLV PSU-1var / VDV-1/DWV-B	-100	7,78E+51	9	0	7,78E+49	1
BeeMLV PSU-1var / VDV-2	75,8	7,95E+14	3,975E+12	1,758	7,95E+12	0,0008
BeeMLV PSU-1var / VDV-3	-100	2,18E+27	2	0	2,18E+25	1
DWV-A / SBV	272,56	2,74E+193	1,37E+191	3,7256	2,74E+191	<0,0001
DWV-A / VDV-1/DWV-B	486,47	4,81E+55	2,405E+53	5,8647	4,81E+53	<0,0001
DWV-A / VDV-2	-92,4	28199900	141000,038	0,076	282000	0,9985
DWV-A / VDV-3	768,18	3,02E+28	1,51E+26	8,6818	3,02E+26	<0,0001
SBV / VDV-1/DWV-B	-100	5,3E+189	0	0	5,3E+187	1
SBV / VDV-2	917,2	4,81E+180	2,405E+178	10,172	4,81E+178	<0,0001
SBV / VDV-3	-100	1,85E+184	0	0	1,85E+182	1
VDV-1/DWV-B / VDV-2	-100	2,04E+45	0	0	2,04E+43	1
VDV-1/DWV-B / VDV-3	-100	8,37E+51	0	0	8,37E+49	1
VDV-2 / VDV-3	724,8	3,67E+24	1,835E+22	8,248	3,67E+22	<0,0001

**Tabla Suplementaria 29.** Eficiencia del *knockdown* de los genes candidatos de *V. destructor*. Se muestra el porcentaje del éxito del silenciamiento medido en ácaros a los dos días (2D) post-infestación (día seis de la aplicación de los tratamientos) y a los cuatro días post-infestación (día ocho de la aplicación de los tratamientos) diferenciando entre hembras fértiles (R) e infértiles (NR).

Este cálculo se realizó tomando como referencia los ácaros tratados con GFP siguiendo la metodología de Huang et al. (2017). Los genes analizados son *ptch1*, *ap-1*, *larp6*, *chisal*, *vg1* y *vg6*.

	<i>ptch1</i>	<i>ap-1</i>	<i>larp6</i>	<i>chisal</i>	<i>vg1</i>	<i>vg6</i>
2D	95,74	92,37	95,90	98,37	97,14	98,12
	98,68	81,12	95,02	99,64	97,47	97,18
	94,02	95,07	95,46	94,12	97,31	96,52
R	98,08	97,48	98,13	98,20	95,87	97,01
	97,46	97,69	98,06	89,37	94,59	94,77
	98,71	98,48	98,50	95,93	95,00	88,58
	98,56	98,53				97,16
		98,20				
NR	96,30	96,23	93,89	99,11	90,12	96,00
	94,71	93,59	94,24	95,09	97,94	99,08
	88,62	95,04	89,95	98,59	97,79	94,10
	94,45	85,70	90,49	95,59	95,09	92,59
	90,84	89,67	90,05	98,69	98,79	

**Tabla Suplementaria 30.** Resultados del GLMM para la evaluación de la mortalidad en los ácaros tratados con *dsptch1*. Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro muera después de que se le suministre el *dsptch1* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *Odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (C.I.) y el P-valor (P).

Mortalidad <i>pcth1</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-41,400	103,000	1,091	0,586	2,030	0,9839
Acetona/GFP	-39,300	91,000	1,077	0,607	1,910	0,9873
Acetona/ <i>pcth1</i>	-63,200	16,000	0,654	0,368	1,160	0,2272
Control/GFP	-44,500	76,000	0,987	0,555	1,760	0,9999
Control/ <i>pcth1</i>	-66,200	6,000	0,599	0,338	1,060	0,098
GFP/ <i>pcth1</i>	-64,100	3,000	0,607	0,359	1,030	0,0697

**Tabla Suplementaria 31.** Resultados del GLMM para la evaluación de la mortalidad en los ácaros tratados con *dsap-1*. Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro muera después de que se le suministre el *dsap-1* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C.) y el P-valor (P).

Mortalidad <i>ap-1</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-42,000	103,000	1,086	0,580	2,030	0,9867
Acetona/GFP	-39,300	92,000	1,079	0,607	1,920	0,9864
Acetona/ <i>ap-1</i>	-41,800	90,000	1,051	0,582	1,900	0,9964
Control/GFP	-44,200	77,000	0,994	0,558	1,770	1
Control/ <i>ap-1</i>	-47,500	79,000	0,968	0,525	1,790	0,9991
GFP/ <i>ap-1</i>	-44,200	70,000	0,974	0,558	1,700	0,9994

**Tabla Suplementaria 32.** Resultados del GLMM para la evaluación de la mortalidad en los ácaros tratados con *dsIarp6*. Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro muera después de que se le suministre el *dsIarp6* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (C.I.) y el P-valor (P).

Mortalidad <i>Iarp6</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-45,100	90,000	1,020	0,549	1,900	0,9998
Acetona/GFP	-41,600	84,000	1,040	0,584	1,840	0,9986
Acetona/ <i>Iarp6</i>	-31,700	150,000	1,310	0,683	2,500	0,7157
Control/GFP	-43,100	81,000	1,010	0,569	1,810	0,9999
Control/ <i>Iarp6</i>	-33,200	145,000	1,280	0,668	2,450	0,7662
GFP/ <i>Iarp6</i>	-30,300	128,000	1,260	0,697	2,280	0,7472

**Tabla Suplementaria 33.** Resultados del GLMM para la evaluación de la mortalidad en los ácaros tratados con *dschisal*. Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro muera después de que se le suministre el *dschisal* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C.) y el P-valor (P).

Mortalidad <i>chisal</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-41,900	103,400	1,087	0,581	2,034	0,9864
Acetona/ <i>chisal</i>	-71,200	1,700	0,541	0,288	1,017	0,0600
Acetona/GFP	-39,500	91,800	1,077	0,605	1,918	0,9875
Control/ <i>chisal</i>	-74,100	-4,200	0,498	0,259	0,958	0,0315
Control/GFP	-44,400	76,600	0,991	0,556	1,766	1,0000
<i>chisal</i> /GFP	10,600	258,100	1,990	1,106	3,581	0,0140

**Tabla Suplementaria 34.** Resultados del GLMM para la evaluación de la mortalidad en los ácaros tratados con *dsvg1*. Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro muera después de que se le suministre el *dsvg1* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C.) y el P-valor (P).

Mortalidad <i>vg1</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-42,700	99,000	1,070	0,573	1,990	0,9933
Acetona/GFP	-39,400	91,000	1,070	0,606	1,910	0,9883
Acetona/ <i>vg1</i>	-41,600	105,000	1,090	0,584	2,050	0,9827
Control/GFP	-43,400	79,000	1,010	0,566	1,790	1,0000
Control/ <i>vg1</i>	-45,000	92,000	1,030	0,550	1,920	0,9996
GFP/ <i>vg1</i>	-43,200	83,000	1,020	0,568	1,830	0,9998

**Tabla Suplementaria 35.** Resultados del GLMM para la evaluación de la mortalidad en los ácaros tratados con *dsvg6*. Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro muera después de que se le suministre el *dsvg6* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C.) y el P-valor (P).

Mortalidad <i>vg6</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-42,900	98,000	1,063	0,571	1,980	0,9944
Acetona/GFP	-40,200	89,000	1,062	0,598	1,890	0,9932
Acetona/ <i>vg6</i>	-43,000	146,000	1,185	0,570	2,460	0,9332
Control/GFP	-43,900	78,000	0,999	0,561	1,780	1,0000
Control/ <i>vg6</i>	-45,800	130,000	1,115	0,542	2,300	0,9803
GFP/ <i>vg6</i>	-43,200	119,000	1,116	0,568	2,190	0,9756

**Tabla Suplementaria 36.** Resultados del GLMM para la evaluación del éxito reproductivo en los ácaros tratados con *dsptch1*. Se muestran los *Odds Ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro sea fértil después de que se le suministre el *dsptch1* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C) y el P-valor (P).

Éxito Reproductivo <i>pcth1</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-73,900	129,000	0,773	0,261	2,290	0,9291
Acetona/GFP	-74,600	120,000	0,747	0,254	2,200	0,8996
Acetona/ <i>pcth1</i>	1,600	1.252,000	3,706	1,016	13,520	0,046
Control/GFP	-63,300	155,000	0,967	0,367	2,550	0,9997
Control/ <i>pcth1</i>	41,900	1.520,000	4,794	1,419	16,200	0,0052
GFP/ <i>pcth1</i>	46,600	1.576,000	4,958	1,466	16,760	0,0041

**Tabla Suplementaria 37.** Resultados del GLMM para la evaluación del éxito reproductivo en los ácaros tratados con *dsap-1*. Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro sea fértil después de que se le suministre el *dsap-1* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C) y el P-valor (P).

Éxito Reproductivo <i>ap-1</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-72,900	147,000	0,818	0,271	2,470	0,9664
Acetona/GFP	-73,200	139,000	0,801	0,268	2,390	0,954
Acetona/ <i>ap-1</i>	119,500	5.378,000	10,965	2,195	54,780	0,0008
Control/GFP	-63,100	160,000	0,979	0,369	2,600	0,9999
Control/ <i>ap-1</i>	186,000	6.180,000	13,402	2,860	62,800	0,0001
GFP/ <i>ap-1</i>	197,400	6.207,000	13,694	2,974	63,070	0,0001

**Tabla Suplementaria 38.** Resultados del GLMM para la evaluación del éxito reproductivo en los ácaros tratados con *dsIarp6*. Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro sea fértil después de que se le suministre el *dsIarp6* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C) y el P-valor (P).

Éxito Reproductivo <i>Iarp6</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-69,600	171,000	0,908	0,304	2,710	0,9959
Acetona/GFP	-71,200	153,000	0,854	0,288	2,530	0,9823
Acetona/ <i>Iarp6</i>	-61,200	398,000	1,390	0,388	4,980	0,9111
Control/GFP	-64,100	147,000	0,940	0,359	2,470	0,9984
Control/ <i>Iarp6</i>	-50,500	373,000	1,530	0,495	4,730	0,7673
GFP/ <i>Iarp6</i>	-47,100	400,000	1,627	0,529	5,000	0,6814

**Tabla Suplementaria 39.** Resultados del GLMM para la evaluación del éxito reproductivo en los ácaros tratados con *dsChisal*. Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro sea fértil después de que se le suministre el *dsChisal* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C) y el P-valor (P).

Éxito Reproductivo <i>Chisal</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-73,000	145,000	0,814	0,270	2,450	0,9637
Acetona/ <i>Chisal</i>	-51,300	566,000	1,800	0,487	6,660	0,6551
Acetona/GFP	-73,400	138,000	0,795	0,266	2,380	0,9498
Control/ <i>Chisal</i>	-34,700	649,000	2,212	0,653	7,490	0,3382
Control/GFP	-63,100	159,000	0,977	0,369	2,590	0,9999
<i>Chisal</i> /GFP	-86,600	46,000	0,442	0,134	1,460	0,2946

**Tabla Suplementaria 40.** Resultados del GLMM para la evaluación del éxito reproductivo en los ácaros tratados con *dsvg1*. Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro sea fértil después de que se le suministre el *dsvg1* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C) y el P-valor (P).

Éxito Reproductivo <i>vg1</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-71,500	151,000	0,845	0,285	2,510	0,9788
Acetona/GFP	-72,600	138,000	0,808	0,274	2,380	0,9578
Acetona/ <i>vg1</i>	1,500	1.328,000	3,806	1,015	14,280	0,0463
Control/GFP	-63,600	151,000	0,956	0,364	2,510	0,9994
Control/ <i>vg1</i>	33,300	1.422,000	4,503	1,333	15,220	0,0082
GFP/ <i>vg1</i>	39,000	1.496,000	4,709	1,390	15,960	0,0061

**Tabla Suplementaria 41.** Resultados del GLMM para la evaluación del éxito reproductivo en los ácaros tratados con *dsvg6*. Se muestran los *Odds ratios* (O.R.) que predicen cuál es la probabilidad de que un ácaro sea fértil después de que se le suministre el *dsvg6* en relación con sus controles: Control (sin dsRNA), Acetona (control de aplicación) y GFP (control dsGFP). Para cada comparación pareada se muestran: el porcentaje de aumento de *odds* (%), el O.R., el intervalo de confianza (I.C) y el P-valor (P).

Éxito Reproductivo <i>vg6</i>						
Tratamientos	%		O.R.	I.C.		P
Acetona/Control	-71,700	153,000	0,846	0,283	2,530	0,9797
Acetona/GFP	-72,600	143,000	0,816	0,274	2,430	0,9635
Acetona/ <i>vg6</i>	-73,500	225,000	0,928	0,265	3,250	0,9987
Control/GFP	-63,400	154,000	0,964	0,366	2,540	0,9997
Control/ <i>vg6</i>	-63,900	233,000	1,097	0,361	3,330	0,9966
GFP/ <i>vg6</i>	-62,200	243,000	1,138	0,378	3,430	0,9905