



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio y caracterización del Virus de alas deformadas (DWV)
circulante en apiarios argentinos.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas.

Fernanda Noemi González

Directora de tesis: Dra. María José Dus Santos.

Directora Adjunta: Dra. Graciela Rodríguez.

Consejera de Estudios: María Isabel Remis.

Lugar de trabajo: Instituto de Virología, IVIT-INTA Castelar.

Buenos Aires, 16 de agosto del 2024.

Estudio y caracterización del Virus de alas deformadas (DWV) circulantes en apiarios argentinos.

RESUMEN

Entre los patógenos que afectan la sanidad de las abejas, el virus de las alas deformadas (DWV) es uno de los más importantes debido a su alta prevalencia mundial. El virus se transmite principalmente mediante el ácaro *Varroa destructor* y se han reportado tres variantes de DWV: DWV-A, DWV-B, DWV-C. El virus puede circular generando infecciones subclínicas, sin causar problema evidente a nivel productivo; no obstante, en determinadas situaciones pueden aparecer signos asociados a la enfermedad.

En Argentina, la diversidad de paisajes y composición floral ofrecen a los apicultores la posibilidad de realizar una apicultura estacionaria o migratoria. Esto ocurre en zonas de clima templado o subtropical, donde se concentra el mayor número de colmenas destinadas a la producción de miel. Recientemente, se han reportado las variantes DWV-A y DWV-B en la provincia de Buenos Aires y Santa Fe, sin embargo, se desconoce la situación de este virus en otras regiones del país.

El objetivo de este trabajo fue detectar y caracterizar las variantes circulantes del DWV, evaluar el impacto que genera la presencia de *Varroa destructor* y el manejo apícola en la presencia, abundancia y diversidad genética del DWV en apiarios de clima templado de la República Argentina, específicamente en la provincia de Entre Ríos.

Palabras Claves: Virus de alas deformadas (DWV), Patógenos, Sanidad apícola, Manejo apícola, Trashumancia.

Study and characterization of Deformed Wing Virus (DWV) circulating in Argentine apiaries.

ABSTRACT

Among the pathogens that affect bee health, the Deformed Wing Virus (DWV) stands out as one of the most significant due to its global prevalence. The virus is mainly transmitted by the *Varroa destructor* mite and three variants of DWV have been identified: DWV-A, DWV-B, and DWV-C. The virus can circulate, causing subclinical infections without manifesting obvious problems at the production level. However, at specific situations, symptoms associated with the disease may become apparent.

In Argentina, the diversity of landscapes and floral composition offer beekeepers the possibility of carrying out stationary or migratory beekeeping. This occurs in areas with a temperate or subtropical climate, where the largest number of hives destined to honey production are concentrated. Recently, the DWV-A and DWV-B variants were reported in the province of Buenos Aires and Santa Fe, however, the situation of this virus in other regions of the country is unknown.

The objective of this work was to detect and characterize the circulating variants of DWV, evaluate the impact generated by the presence of *Varroa destructor* and beekeeping management on the presence, abundance and genetic diversity of DWV in temperate climate apiaries of the Argentine Republic, specifically in the province of Entre Ríos.

Keywords: Deformed wing virus (DWV), Pathogens, Bee health, Bee management, Transhumance.

Este trabajo de tesis doctoral está dedicada al Dr. Norberto Fondevila, quien escucho mis inquietudes en el estudio de virus que afectan insectos y me abrió las puertas de su laboratorio para formar parte del grupo de Abejas. Antes de jubilarse dejo escrito esta propuesta de tesis para cumplir con uno de mis mayores anhelos. Agradezco su bondad, guía y consejos durante el tiempo que tuve su dirección.

*Sabiduría, ante todo;
adquiere sabiduría;
Y sobre todas tus posesiones adquiere inteligencia.
Engrandécela, y ella te engrandecerá;
Ella te honrará, cuando tú la hayas abrazado.
Adorno de gracia dará a tu cabeza;
Corona de hermosura te entregara.
Proverbio 4;7-9.*

AGRADECIMIENTOS

Finalizar esta etapa de formación ha sido uno de mis mayores deseos y debo agradecer a cada persona que fue testigo y colaboro con ello,

Agradezco a la Dra. María José Dus Santos por su dirección durante el desarrollo de esta tesis doctoral, por su guía y enseñanza durante los 17 años que ha sido mi mentor dentro del laboratorio, por sus consejos y palabras de aliento de cada día.

Agradezco a la Dra. Graciela Rodríguez por su dirección y acompañamiento durante este periodo de formación académica.

Agradezco a la Universidad de Buenos Aires por aceptarme como estudiante de doctorado y brindarme una educación pública, gratuita y de calidad.

Agradezco al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por permitir capacitarme y desarrollar este trabajo de tesis dentro del Instituto de Virología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA).

Agradezco la financiación otorgada por el Programa Nacional Apícola (PROAPI) y al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Virología-CICVyA que financió este proyecto de tesis doctoral desde los inicios. En especial al técnico Maximiliano Jordán por su gran labor diario dentro del laboratorio.

Estaré agradecida eternamente a los investigadores:

Dr. Oscar Virgillito por capacitarme en el manejo integrado de la colmena. Sus enseñanzas me brindaron el conocimiento necesario para realizar los muestreos llevados a cabo en este trabajo.

Dr. Osvaldo Zabal por trasmitirme todo su conocimiento y ayudarme cada vez que fue solicitado.

Dr. Miguel Corona por capacitarme en la detección de patógenos que afectan Apis melífera y recibirme en los laboratorios del USDA. Agradezco su amistad y consejos para finalizar esta hermosa etapa de mi vida.

Dr. Eugene Ryabov, por colaborar conmigo y brindar sus conocimientos en virología. Conocerlo fue un placer, investigador que admiro profundamente.

Dr. Michael Goblirsch por sus consejos y amistad forjada en estos últimos años.

Por otra parte, quiero agradecer a mis compañeros y colegas que me ayudaron activamente durante el desarrollo de mi tesis, principalmente:

Dra. Cecilia Ferrufino, quien me recibió con amabilidad a formar parte del equipo de Abejas. Compartir la mesada y esta etapa con ella fue de gran alegría para mí.

Dr. Diego Vásquez, Dr. Matías Moragas y Hugo Carignano por su colaboración y amabilidad.

Dr. Samuel Miño, trabajar con un amigo siempre es un placer.

*Fabrizio Raticelli, por ayudarme en el procesamiento de muestras y permitirme generar
vínculos con los apicultores de Entre Ríos.*

*Agradezco a mis compañeros del laboratorio C, en especial aquellos que estuvieron en el
inicio de mi formación y hoy se convirtieron en amigos: Andrea Pécora, Marina Mozgovoij,
Demian Bellido y Diego González.*

*Un agradecimiento en especial a los apicultores de Villa del Rosario (Hugo, Sandalio,
Fabian, Maricel, Gustavo y Nico) y Maciá (Eladia, Augusto, Gustavo, Arnoldo y Beatriz) por
abrirme la tranquera de sus apiarios y las puertas de sus hogares. La participación y bondad
brindada permitió la realización de este trabajo de tesis.*

Por último, agradezco a mi familia y amigos:

Hernán, Mariana y Cintia por escucharme y alegrarme la vida.

*Familia Becher, en especial a Susana por su cariño, amabilidad, amistad y esperarme
siempre con los brazos abiertos.*

Tito, Eco, Franzot, Vanina y Javi por hacer mis viajes a Maciá únicos.

*A mis hermanos Gaby, Naty e Iván que me enseñan cada día que mi vida sin ellos no sería
igual, que el amor más genuino me lo brindan ellos y que Dios puso los mejores
compañeros en mi vida.*

*A mi Madre y Padre por secar cada lagrima que ha corrido sobre mi mejilla, por darme
valores y enseñarme que lo que cuesta en esta vida tiene mayor victoria.*

Por su amor incondicional.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
AGRADECIMIENTOS	4
1 INTRODUCCION	13
1.1 Apicultura	13
1.2 Buenas prácticas de manejo apícolas	15
1.3 Sanidad apícola	17
1.4 Virus de las alas deformadas	21
1.4.1 Variantes del Virus de las alas deforme	23
1.4.2 Diagnóstico del DWV	24
1.5 Manejo apícola.....	25
HIPOTESIS	29
OBJETIVOS	30
2 MATERIALES Y METODOS	32
2.1 Muestreo	32
2.1.1 Características del área de estudio	32
2.1.2 Toma de muestra	32
2.2 Fortaleza, sanidad y genética de las colmenas	33
2.2.1 Categorización de colmena.....	33
2.2.2 Cuantificación del ácaro <i>Varroa destructor</i>	34
2.2.3 Detección de esporas de <i>Nosema</i> spp:.....	35
2.2.4 Identificación de Haplotipos de <i>Apis mellífera</i> en las colmenas muestreadas: PCR-RFLP.....	36
2.2.5 Identificación de polen.....	36
2.3 Detección del DWV	37
2.3.1 Procesamiento de las muestras y extracción del ARN:	37
2.3.2 Obtención del ADN copia (ADNc).....	38
2.3.3 Construcción del control positivo (plásmido PAN-DWV).....	38
2.3.4 RT-qPCR	39
2.4 Aislamiento viral	43
2.4.1 Amplificación viral <i>in vivo</i>	43
2.4.2 Purificación viral.....	43
2.4.3 Preservación del material conteniendo virus.	44
2.5 Caracterización de variantes del DWV mediante secuenciación	44
2.5.1 Secuenciación por Sanger	44
2.5.2 Secuenciación de genomas completos.	45
2.5.3 Análisis filogenético.....	46
2.6 Detección de variantes del DWV	47
2.6.1 Controles positivos para RT-qPCR variantes	47
2.6.2 Diseño experimental de RT-qPCR variantes DWV	48
2.7 Análisis estadístico.....	50
3 RESULTADOS	53
3.1 Manejo de los apiarios	53

3.2	Categorización de colmenas	54
3.3	Diagnóstico de <i>V. destructor</i> y <i>Nosema spp</i>	56
3.4	Identificación de polen.....	59
3.5	Identificación de haplotipos de <i>Apis melífera</i>	60
3.6	Prevalencia y abundancia del DWV	62
3.7	Asociación de presencia del DWV y factores monitoreados	65
3.8	Detección de variantes del DWV	68
3.9	Amplificación viral	74
3.10	Purificación viral.....	75
3.11	Caracterización del DWV mediante secuenciación	76
3.11.1	Tipificación de la variante DWV circulante en apiarios migratorios y sedentarios en la provincia de Entre Ríos	76
3.11.2	Secuenciación de genomas completos (NGS) a partir de muestras sintomáticas y asintomáticas para el DWV.....	81
4	DISCUSIÓN	90
5	CONCLUSIÓN	99
	ANEXO I: DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	102
	ANEXO II: ENCUESTAS UTILIZADAS EN LOS MUESTREOS.	104
	ANEXO III: SECUENCIAS DEL VIRUS DE ALAS DEFORMADAS (DWV) UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO	106
	ANEXO IV: GEORREFERENCIACIÓN DE LOS APIARIOS MIGRATORIOS Y ESTACIONARIOS.....	111
	ANEXO V: GENOMAS COMPLETOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO	113
	ANEXO VI: ANÁLISIS DE LAS COLONIAS MIGRATORIAS Y ESTACIONARIAS EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS	122
	ANEXO VII: ANÁLISIS DE LA CRÍA.....	126
	ANEXO VIII: IDENTIFICACIÓN FLORAL.	133
	BIBLIOGRAFÍA	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa regional de identidades de mieles en la República Argentina	14
Figura 2: Aspecto de los panales en colonias saludables.....	15
Figura 3: Categoría de colmenas según la población de abejas adultas al inicio de la temporada.	17
Figura 4: Representación esquemática de los principales patógenos que afectan a <i>Apis mellífera</i>	18
Figura 5: Ciclo de vida de <i>Varroa destructor</i> en fase reproductiva y fase forética.....	19
Figura 6: Fotografía de abejas infectadas con DWV. (A) Abeja	22
Figura 7: Diagrama del genoma del Virus de las alas deformadas (DWV).....	23
Figura 8: Diagrama del método del frasco para el recuento de <i>Varroa destructor</i> en estadio forético	35
Figura 9: Amplificación de la RT-qPCR PAN.	41
Figura 10: Cálculo del LOD y LOQ para la qPCR-PAN DWV.	42
Figura 11: Esquema del genoma de DWV identificando las proteínas estructurales y no estructurales del virus	49
Figura 12: Esquema del movimiento de las colmenas y su ubicación geográfica dentro de la provincia de Entre Ríos.	54
Figura 13: Categorización de colmenas	55
Figura 14: Abejas presentando malformaciones en las alas.....	55
Figura 15: Detección de <i>Nosema</i> spp y <i>V. destructor</i> en estadio forético	58
Figura 16: Fotografías de cría de <i>Apis mellífera</i> en distintas etapas del desarrollo parasitadas por <i>Varroa destructor</i>	59
Figura 17: Identificación de polen al microscopio.	60
Figura 18: Cuantificación de las cargas virales (CV) del DWV en apiarios migratorios y estacionarios.	63
Figura 19: Análisis de componentes principales.	66
Figura 20: Electroforesis en geles de agarosa 2% mostrando los fragmentos de los ultrámeros sintéticos usados como controles positivos en formato uniplex (A) y multiplex (B) para la detección de variantes del DWV.....	69
Figura 21: Gráfico de la RT-qPCRUniplex DWV estandarizada.....	70
Figura 22: Gráfico RT-qPCR Multiplex DWV.	72
Figura 23: Amplificación viral mediante la técnica "in vivo":	75
Figura 24: Gráfico de absorbancias del gradiente de sacarosa cosechado en fracciones consecutivas correspondiente a la purificación del DWV a partir de una muestra que presentaba malformaciones en sus alas (A-334) y una muestra sin signos asociados a la enfermedad (B-308).	76
Figura 25: Corrida electroforética en gel de agarosa 1% de los fragmentos de 1600pb obtenidos por RT-nPCR.	77
Figura 26: Análisis filogenético del DWV	78
Figura 27: Análisis filogenético de las cepas DWV-A provenientes de Argentina.	80

Figura 28: Diagrama del genoma del DWV indicando los sitios putativos de escisión de la proteasa 3C.....	83
Figura 29: Alineamiento múltiple de secuencia aminoacídica de las proteínas L, Helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN de las variantes del DWV.....	85
Figura 30: Análisis filogenético (Neighbor-Joining) de las cepas reportadas para DWV-Argentina.....	87
Figura 31: Análisis de similitud entre los genomas completos DWV-A de Argentina y secuencias de China, EE.UU. y Chile.....	88

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Número de colmenas muestreadas durante inicio y fin de temporada para la detección del DWV (abejas adultas, cría operculada y polen), recuento de esporas de Nosema spp y el nivel de infestación de varroa forética.	33
Tabla 2: Oligonucleótidos usados en la identificación de Haplotipos.	36
Tabla 3: Muestras de pan de polen para la identificación floral de colmenas migratorias y estacionarias.	37
Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la construcción del plásmido PAN-DWV.	38
Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados en la RT-qPCR para DWV y β -actina.	40
Tabla 6: Oligonucleótidos usados en la RT-nPCR para caracterización de subtipos.	45
Tabla 7: Secuencias de los controles positivos para las qPCR subtipos de DWV.	48
Tabla 8: Oligonucleótidos y sondas marcadas diseñados para la detección de subtipos de DWV.....	50
Tabla 9: Descripción del manejo en apiarios estacionarios y migratorios durante toda la temporada (septiembre 2018-marzo 2019).....	56
Tabla 10: Muestras analizadas para la identificación de haplotipos en colmenas migratorias y estacionarias mediante el uso de PCR-RFLP.....	62
Tabla 11: Detección del DWV por RT-qPCR, según el tipo de manejo y el momento de la toma de muestra.	64
Tabla 12: Pooles positivos para el DWV de muestras provenientes de los cuadros cría recolectados durante el inicio y fin de temporada en apiarios con manejo migratorio y estacionario.....	64
Tabla 13: Estadísticas resumidas de cada variable al inicio y fin de temporada para el manejo Migratorio versus Estacionario.....	67
Tabla 14: Factores explicativos de la gestión migratoria al inicio y al final de la temporada.	68
Tabla 15: Condiciones de reacción evaluadas para cada formato de PCR combinando diferentes concentraciones de cebadores (400nM, 600nM, 800nM) bajo una condición estable de sonda (200nM).	73
Tabla 16: Resultados obtenidos para el ensayo de especificidad de la técnica de RT-qPCR multiplex.....	74
Tabla 17: Incremento de la carga viral del DWV mediante la amplificación "in vivo" utilizando una muestra sintomática (334) y otra asintomática (308).	75
Tabla 18: Identificación del Marco abierto de lectura (ORF) para las secuencias referentes de los subtipos del DWV y los genomas DWV-A de muestras asintomáticas DWV-308 (en negrita) y sintomáticos DWV-334 (en negrita) secuenciados a partir de muestras obtenidas de apiarios de la provincia de Entre Ríos.	82

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

ABPV: Virus de la parálisis aguda de las abejas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AmFv: Virus filamentosos A. mellifera

ARN: Ácido ribonucleico.

ARV-1: Apis rhabdovirus

BeeMLV: Virus Macula-like de abeja.

BPA: Buenas prácticas de manejo apícola.

BQCV: Virus de las celdas reales negras

CBPV: Virus de la parálisis crónica de las abejas

CO II: Citocromo Oxidasa II

COI: Citocromo Oxidasa I

COLOSS: Prevention of Honeybee colony losses.

CP: Proteína de la cápside.

CV: Carga viral

DWV: Virus de las alas deformadas

EEUU: Estados Unidos

FOB: Cuadros con abejas adultas.

IAPV: Virus israelí de la parálisis aguda

IRES: Sitio de entrada al ribosoma

KBV: Virus de Cachemira

KV: Virus Kakugo.

LP: Proteína líder.

LSV: Virus del lago Sinaí.

NGS: Secuenciación de nueva generación.

NSP: Proteína no estructurales.

OcNV: Osmia cornuta nudivirus

ORF: Marco de lectura abierto

PCR-RFLP: Reacción en cadena de la polimerasa-Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Prot: Proteasa viral.

RdRpol: ARN polimerasa dependiente de ARN.

RENAPA: Registro Nacional de Productores Apícola.

RNA-seq: Secuenciación de Ácido ribonucleico.

RT: Retrotranscripción

SBPV: Virus de la parálisis lenta de las abejas.

SBV: Virus de la cría ensacada

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

SOLATINA: Sociedad Latinoamericana para la Investigación de las Abejas.

Ta: Temperatura de hibridación

Tm: Temperatura de melting

UTR: Región no traducida

VDV: Virus varroa destructor

VP: Proteínas estructurales.

Vpg: Proteína del virión ligada al genoma.

Capítulo 1



1 INTRODUCCION

1.1 Apicultura

La abeja melífera (*Apis mellifera*) comparte una relación histórica con los seres humanos y se encuentra entre los principales insectos que benefician la economía agrícola mundial, ya que son un contribuyente clave para la polinización de cultivos alimentarios y plantas silvestres. A pesar del crecimiento del sector apícola, durante los últimos 20 años se han registrado grandes pérdidas en las poblaciones de abejas melíferas. Diferentes relevamientos se han enfocado en la pérdida de colonias; entre ellos, la asociación de Prevención de la PÉRDIDA de colmenas de las abejas melíferas (COLOSS) durante el invierno de 2019-2020 estimó la pérdida de colmenas en 33 países europeos, Argelia, Israel y México registrando un valor de 16,4% (Gray et al., 2023). Además, desde el año 2006, se han reportado pérdidas anuales del 50% en colonias de EEUU (Ryabov et al., 2017). En Latinoamérica, el grupo de monitoreo de pérdidas de colmenas de la Sociedad Latinoamericana para la Investigación de las Abejas (SOLATINA) estimó pérdidas de 13% en Perú y Ecuador y 53% en Chile. Argentina, por su parte, registró pérdidas anuales del 34% en el período transcurrido entre octubre de 2016 y octubre de 2017 (Requier et al., 2024). Las causas de estas pérdidas no están claras, pero probablemente involucren múltiples factores estresantes tales como la intensificación de la agricultura (incluyendo el uso de plaguicidas y la disminución de los recursos) (Dalmon et al., 2017a), la propagación de distintos agentes patógenos y plagas que afectan a las abejas (virus, hongos, bacterias y ácaros) y una nutrición deficiente (Simone-Finstrom et al., 2022; Vanbergen et al., 2013), pudiendo éstos actuar en forma individual o conjunta. Dichas pérdidas pueden ir desde una disminución de la producción hasta la mortalidad de las colonias (A. G. Dolezal et al., 2016; Kevill et al., 2019a).

En Argentina, la actividad apícola está presente en 22 provincias, generando un importante impacto en las economías locales, especialmente en las regiones alejadas de los centros urbanos, donde genera empleo para más de 100.000 personas de manera directa e indirecta. Según informes del RENAPA (Registro Nacional de Productores Apícola, 2023), esta actividad es desarrollada actualmente por algo más de 20.413 apicultores que cuentan con 4.087.885 colmenas georreferenciadas de las cuales 28.127 son certificadas como orgánicas (SENASA, 2020). Una de las principales actividades del sector es la producción de miel, pudiendo identificar diferentes zonas principales de producción: zona Centro, zona Litoral y zona Patagónica. Entre las

provincias que albergan el mayor número de colmenas destinadas a la producción de miel podemos mencionar a Buenos Aires (aproximadamente 1.000.000 de colmenas), seguida de Entre Ríos (~680.000 colmenas) y Santa Fe (~312.000 colmenas). Estas provincias concentran el 68% del total de colonias. Sin embargo, el territorio argentino presenta una diversidad geográfica que permite desarrollar la actividad apícola en distintas regiones, cada una con su propia diversidad floral lo que posibilita la obtención de mieles tanto multiflorales como las monoflorales (Figura 1).



Figura 1: Mapa regional de identidades de mieles en la República Argentina.

Se indican los diferentes tipos de mieles en función de su origen botánico y ubicación geográfica (●) según región de producción. ■ Región Centro: miel de pradera (centro de la provincia de Buenos Aires), miel de naranja (norte de la prov. Buenos Aires), miel de *Polygonum punctatum* (Delta de Entre Ríos y Buenos Aires), miel de chilca (sur de Entre Ríos), miel de girasol (sudeste de Buenos Aires), miel de flor amarilla (suroeste de Buenos Aires); ■ Región Nordeste: miel de eucalipto (centro-este de Corrientes), miel de cítricos (sudeste y noroeste de Corrientes), miel de algarrobo (monte nativo), miel de chilca (centro norte del Chaco), miel de la Selva paranaense (centro-norte de Misiones), miel de loro blanco (centro sur de Misiones), miel de palmares (este de Formosa), miel de quebracho colorado chaqueño (Oeste de Formosa); ■ Región Noroeste: miel de limón (centro sur de Tucumán), miel de *Capparis atamisquea* y mieles multiflorales de Monte Nativo (monte nativo noroeste argentino); ■ Región Patagonia: miel de flor azul (Neuquén y Río Negro), miel de *Lomatia hirsuta* (sur de Neuquén), miel de confluencia (zona confluencia de Neuquén), miel de *Prosopis alpataco* (zona de Picunleufú, Neuquén), miel del norte neuquino (norte de Neuquén); ■ Región de Cuyo: miel de Mistle (monte nativo). La imagen fue extraída de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (<https://magyp.gob.ar/apicultura/mapa.php>).

1.2 Buenas prácticas de manejo apícolas

Las Buenas Prácticas Apícolas (BPA) engloban todas las medidas destinadas a mitigar los riesgos microbiológicos, físicos y químicos en la producción, con el propósito de salvaguardar la sostenibilidad ambiental, económica y social de los procesos productivos, y añadir valor. Estas prácticas de gestión son cruciales para asegurar la obtención de productos de la calidad esperada. Los pilares fundamentales de las BPA se sustentan en el sendero tecnológico propuesto por INTA-PROAPI (Carlos et al., 2022; Rodríguez and Crisanti, 2019)

El primer paso en la implementación del sendero tecnológico implica la inspección meticulosa de las colmenas siguiendo un procedimiento específico, el cual proporciona información crucial sobre el estado poblacional, sanitario y de reservas de las colmenas. Este diagnóstico posibilita la planificación de futuras acciones y la comparación del estado general a lo largo del tiempo. Se aconseja llevar a cabo estas inspecciones al menos dos veces al año: al inicio y al final de la temporada apícola (Figura 2).



Figura 2: Aspecto de los panales en colonias saludables. A) revisión de panales de cámara de cría; B) cría abierta y operculada; C) panal con cría operculada y reservas de miel. Imagen extraída del Protocolo de la cadena de Valor Apícola y Ganadera 2022.

Dentro de las BPA, se considera al apiario como una unidad de gestión, lo que conlleva que todas las colmenas del apiario reciban un manejo y/o tratamientos uniformes, promoviendo así el desarrollo homogéneo de las colonias y generando una mayor productividad y, por ende, un aumento en el rendimiento promedio del apiario (Giacobino et al., 2016; Rodríguez and Crisanti, 2019; Vandame R. and Palacio MA., 2010).

Al abrir las colmenas, la primera acción es una observación visual para determinar la categoría de la colmena, la cual se evalúa según la cantidad de cuadros de la cámara de cría cubiertos de abejas. Esto permite evaluar la fortaleza de cada colonia y definir su estado poblacional, sanitario y de reservas en el apiario (Figura 3). Las categorías se dividen en:

Categoría I: población superior a 7 cuadros cubiertos de abejas.

Categoría II: población entre 5 y 7 cuadros cubiertos de abejas.

Categoría III: población inferior a 5 cuadros cubiertos de abejas.

Otra práctica clave es la multiplicación del apiario y el recambio de reinas en el momento oportuno, lo que ayuda a reducir la mortalidad de las colmenas, mejorar la genética, reducir la enjambrazón y mejorar los índices productivos (Agra et al., 2018; Bianchi et al., 2021; Palacio et al., 2000). Se recomienda realizar el recambio de reinas anualmente o, como máximo, cada dos años, coincidiendo idealmente con la multiplicación de las colonias.

Una planificación adecuada basada en el conocimiento de la curva de floración de la zona es fundamental para llevar a cabo las principales tareas en el apiario de manera oportuna. Esto incluye la realización de una alimentación artificial estratégica si el entorno no proporciona suficientes recursos para cubrir los requerimientos de las colonias. Una nutrición deficiente puede afectar la vitalidad y el rendimiento productivo de las colmenas (Branchiccela et al., 2019; Dolezal AG. and Toth AL., 2018; Jara et al., 2021).

La alimentación artificial energética puede ser utilizada como sostén para la preparación al receso productivo o como estimulante para momentos en los que el alimento natural es insuficiente. Los sustitutos energéticos más recomendables incluyen el jarabe de azúcar de caña al 66% y el Jarabe de Maíz de Alta Fructosa al 55% (Aignasse, 2021; Rodríguez and Crisanti, 2019). Además, la alimentación artificial proteica puede ser necesaria en entornos donde el suministro natural de polen es limitado. Las tortas o "paties" son una forma aconsejable de proporcionar suplementos de polen (Bernklau et al., 2019; Branchiccela et al., 2019; Brodschneider & Crailsheim, 2010a; Di Pasquale et al., 2013).

Es crucial mantener registros detallados de las prácticas realizadas como parte de la trazabilidad, lo que facilita el control y la planificación de actividades, así como la comparación de resultados entre temporadas.

Finalmente, aplicar buenas prácticas para la cosecha y transporte de las alzas melarias es fundamental para asegurar una cosecha oportuna. Evitar cosechas tardías es esencial para bloquear la cámara de cría con miel y controlar la *V. destructor* de manera temprana.



Figura 3: Categoría de colmenas según la población de abejas adultas al inicio de la temporada. A) Categoría I: superior a 7 cuadros cubiertos por abejas; B) Categoría II: población entre 5 y 7 cuadros cubiertos por abejas; C) Categoría III: con menos de 5 cuadros cubiertos por abejas. Imagen extraída del Protocolo de la cadena de Valor Apícola y Ganadera 2022.

1.3 Sanidad apícola

La principal amenaza en la sanidad de la colmena está producida por la presencia de patógenos y parásitos (Figura 4). Entre los principales patógenos que afectan las colonias podemos mencionar el ácaro ectoparásito *Varroa destructor*, el cual provoca la disminución en la producción de miel y pérdida de colmenas, ya que influye de manera negativa no solo en el individuo sino en la colonia completa (Guzmán-Novoa et al., 2010; Le Conte et al., 2010). Además, *Varroa destructor* actúa como vector de numerosas virosis, aumentando de esta forma, el daño sobre la población de abejas. En Argentina se ha detectado por primera vez en el año 1976 en colmenas de Laguna Blanca, en la provincia de Formosa. En el transcurso de los dos años posteriores, la varroosis se diseminó por todo el país y hoy en día es considerada como enfermedad endémica (Carlos et al., 2022).

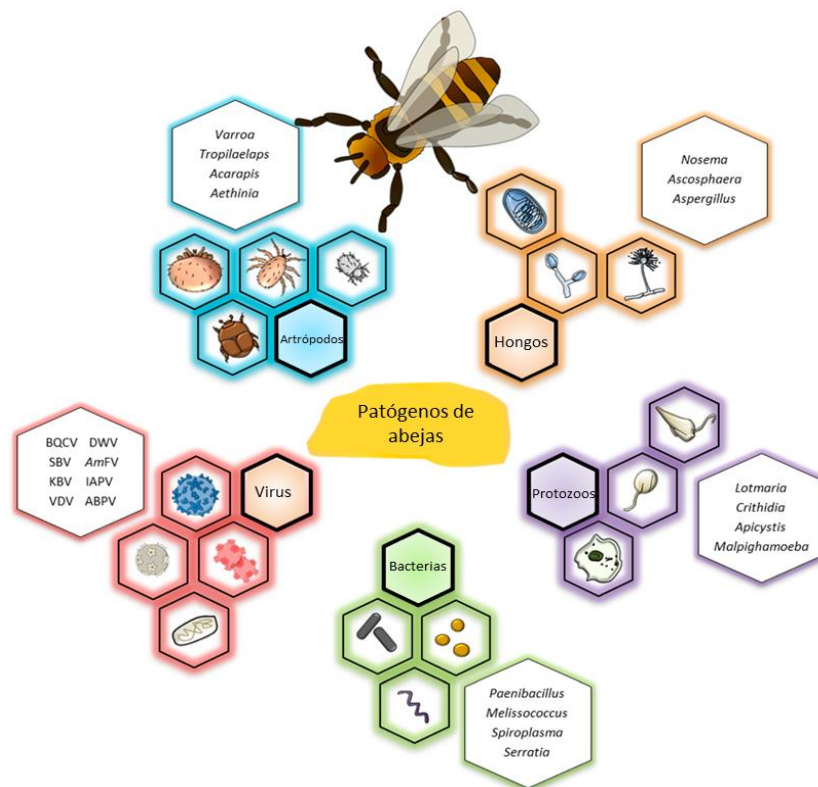


Figura 4: Representación esquemática de los principales patógenos que afectan a *Apis mellifera*. Entre los patógenos se mencionan los siguientes virus: Virus de las celdas reales negras (BQCV), Virus de las alas deformadas (DWV), Virus de la cría ensacada (SBV), Virus filamentoso *A. mellifera* (AmFV), Virus de Cachemira (KBV), Virus israelí de la parálisis aguda (IAPV), Virus varroa destructor (VDV), Virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV). Modificado de (Lannutti et al., 2022)

El ciclo de vida de este ácaro involucra dos etapas distintas, la fase forética que ocurre en la abeja adulta y la fase reproductiva, dentro de una celda de cría de abeja (Figura 5) (Reams & Rangel, 2022). La invasión de la celda de cría ocurre algunas horas antes de que se selle una celda que contiene una larva de abeja. Dentro de la celda, el ácaro se alimenta de la hemolinfa de la abeja y pone sus huevos en la superficie de la pared celular; estos huevos producen primero un macho y luego algunas hembras. Las crías se aparean entre sí de modo que cuando la abeja adulta sale de la celda, tanto la hembra invasora como la cría del ácaro abandonan la celda. Luego se transfieren a una abeja adulta, donde pasan a la fase forética, antes de ingresar a una celda de cría para reproducirse nuevamente. Cuando los ácaros se alimentan de la hemolinfa y los cuerpos grasos de las abejas adultas (Ramsey et al., 2019). Por otro lado, los ácaros machos no pueden sobrevivir fuera de la celda y mueren, en cambio los ácaros hembra, pueden pasar por dos o tres ciclos a lo largo de su vida (Nazzi and Le Conte, 2016).

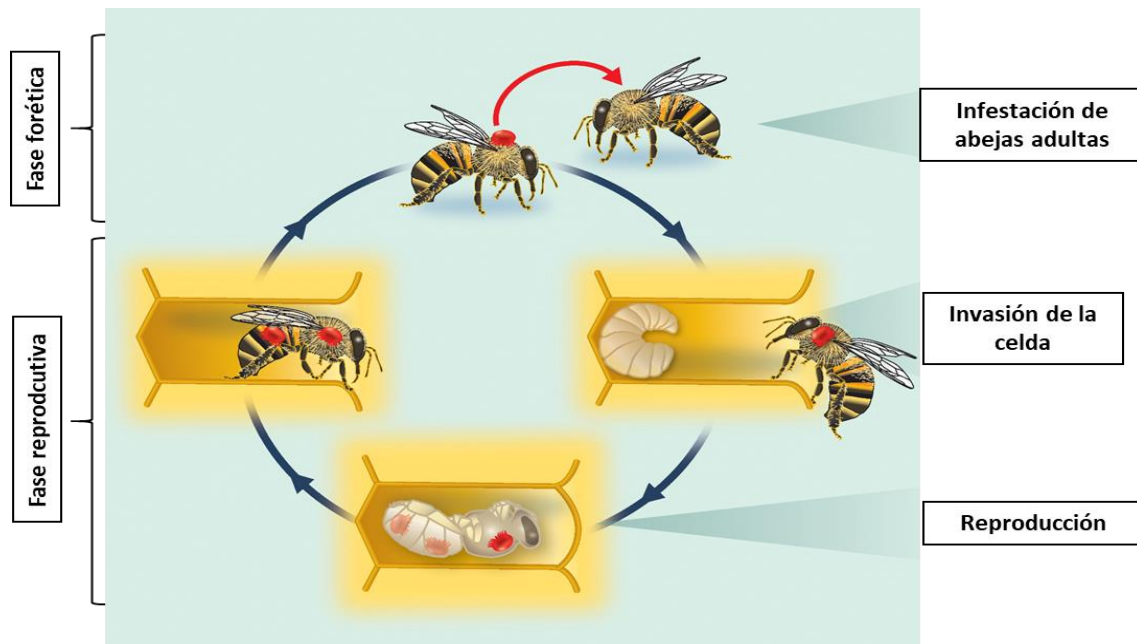


Figura 5: Ciclo de vida de *Varroa destructor* en fase reproductiva y fase forética. Modificado de (Nazzi and Le Conte, 2016)

En nuestro país, en las regiones de mayor producción, prácticamente es imposible encontrar colmenas que no tengan *V. destructor*. Es por lo que, los métodos de diagnóstico se orientan a determinar de manera cuantitativa la presencia del ácaro, estimando los porcentajes de infestación. Uno de los métodos más utilizados por los apicultores es la prueba del frasco, en la que se recolectan muestras de abejas adultas de los cuadros de cría mediante un frasco conteniendo detergente o alcohol al 70% para desprender los ácaros y posteriormente realizar el recuento de estos (Carlos et al., 2022; Rodríguez and Crisanti, 2019).

El monitoreo es la única herramienta de diagnóstico de la que se dispone y brinda información certera sobre la situación de la parasitosis en el apiario. Mantener un bajo número de ácaros al momento del inicio de la invernada, es imprescindible para evitar la mortandad invernal y lograr un buen desarrollo de las colmenas durante la primavera. Actualmente, existen opciones de control en el mundo mediante el uso de acaricidas (Oxálico, Timol, Fórmico, Amitraz, entre otros), pero es necesario diseñar estrategias de control en cada región o en cada país ya que tanto el ácaro como las características climatológicas están vinculadas a su reproducción. Por ejemplo, en zonas donde los inviernos son poco rigurosos y la cría permanece durante todo el periodo, se facilita la reproducción ininterrumpida del ácaro. Se recomienda realizar monitoreos pre, durante (entre los 7 y 10 días) y post tratamiento, evaluando las mismas colonias para llevar un control adecuado y verificar que el tratamiento realizado fue eficaz. Es importante alternar entre los distintos principios activos de control utilizados

de manera de eliminar en el siguiente tratamiento a los ácaros que sobrevivieron la acción del producto usado anteriormente e implementar tratamientos zonales coordinados entre los apicultores de una región.

Otra de las patologías en los apiarios es nosemosis, una enfermedad parasitaria intestinal y contagiosa, descrita por primera vez en el año 1909 (Zander, 1909). Es causada por dos hongos microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Higes et al., 2013), que parasitan las células de la pared interna del intestino de las abejas, causando muerte prematura, incapacidad para el vuelo, temblores de alas y movimientos espasmódicos. *Nosema* spp. produce, además, una disminución de la vida media de las abejas debido a la reducción de reservas proteicas. Otro signo clínico frecuente es la diarrea muy líquida y de color marrón, más o menos oscuro, perceptible en piquera y en el interior de los cuadros (Kang, 1976). La tolerancia a otras enfermedades es menor cuando las colonias están afectadas por nosemosis, ya que algunos virus que ingresan al organismo de la abeja por vía digestiva encuentran el medio óptimo para su desarrollo en aquellos individuos cuyo intestino se encuentra alterado por acción del parásito.

Comúnmente se utiliza el conteo de esporos como herramienta de diagnóstico para determinar el nivel de infestación por *Nosema* spp. El método más utilizado es el descrito por Cantwell con modificaciones por Fries, en el cual se recolectan 60 a 100 abejas pecoreadoras de la entrada de la colmena (piquera) en frascos conteniendo alcohol etílico 96% y se realiza el conteo de esporos mediante el uso de microscopio (Cantwell, 1970; Fries et al., 1984)

No está permitido el uso de medicamentos para el control de esta enfermedad, sin embargo, existe un conjunto de prácticas que realizadas de manera oportuna contribuyen a reducir su incidencia. Se han identificado a la vegetación circundante al apiario, el recambio de reinas, y la prevalencia de *V. destructor* como factores predisponentes a la enfermedad (Pacini et al., 2021). Las deficiencias nutricionales están fuertemente relacionadas con la presencia de *Nosema* spp. (Di Pasquale et al., 2013). Además, se ha observado que el nivel alto de *Nosema* spp. en colonias bajo estrés nutricional está asociado a la baja calidad del polen de *Eucalyptus* spp (Branchiccela et al., 2019).

Entre los patógenos que afectan la sanidad de las abejas los virus se destacan por el nivel de daño que son capaces de producir en la colmena. Hasta el momento, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, se han identificado más de 70 virus en las abejas melíferas (Beaurepaire et al., 2020a). Muchos de ellos, pertenecen a las familias *Districtoviridae* (Virus israelí de la parálisis de las abejas, IAPV;

virus de las abejas de Kashmer, KBV; Virus de la parálisis aguda de las abejas, ABPV; Virus de las celdas reales negras, BQCV) e *Iflaviridae* (Virus de las alas deformadas, DWV; Virus kakugo, KV; Virus varroa destructor 1, VDV-1/DWV- B, Virus de la cría ensacada, SBV; Virus de la parálisis lenta de las abejas, SBPV), el Virus del lago Sinaí, mientras otros no están clasificados, como el Virus de la parálisis crónica de las abejas (CBPV). Avances recientes en metagenómica han permitido identificar nuevos virus en abejas y otros polinizadores; incluyendo el Virus Macula-like de abeja (BeeMLV) de la familia *Tymoviridae*, *Osmia cornuta* nudivirus (OcNV) de la familia *Nudaviridae*, Apis rhabdovirus-1 y 2 de la familia *Rhabdoviridae*, entre otros (Beaurepaire et al., 2020b; Hartmann et al., 2015; Hou et al., 2017).

En América del Sur se detectaron virus de abejas en diferentes países como Uruguay Brasil y Chile. Particularmente en Argentina, los estudios de los virus capaces de infectar a las abejas son escasos; sin embargo, se ha detectado la presencia de varios virus que afectan a las abejas de la miel, específicamente, ABPV, CBPV, SBV (Reynaldi et al., 2010), IAPV (Ding et al., 2016), BQCV y DWV (Ding et al., 2016) . En otros trabajos, se encontró una asociación positiva entre los niveles de infestación de *V. destructor* y la prevalencia de DWV (Giacobino et al., 2016; Reynaldi et al., 2010). Molineri y col. en el año 2017, detectaron la presencia de virus en colonias situadas en condiciones agroecológicas diferentes (clima templado y subtropical) siendo el más prevalente el DWV (35%) seguido de ABPV, (21,5%), BQCV (8,0%), CBPV, (2,2%) y SBV (1,1%). Además, la combinación de DWV, ABPV y BQCV fue la co-infección por virus triple más frecuente observada en este estudio (Molineri et al., 2017) .Por otro lado, se describió una alta prevalencia de AmFV en colmenares argentinos, éste fue un estudio retrospectivo de muestras de abejas melíferas que reveló que AmFV ha estado presente en Argentina desde el año 2006 (Quintana et al., 2021).

1.4 Virus de las alas deformadas

Dentro de los virus mencionados, el virus de alas deformadas (DWV) es uno de los más importantes debido a su alta prevalencia mundial y por estar asociado, junto con el ectoparásito *Varroa destructor*, al colapso de la colmena. El ácaro es, además, vector biológico del virus complejizando la patogenia y epidemiología de la infección.

El DWV está asociado a la aparición de abejas con deformidades en las alas y puede, además, producir un acortamiento de la expectativa de vida, lo que se manifiesta a nivel de la colonia (si no se controla su difusión) por una disminución progresiva del tamaño de la población que puede llevar a su total desaparición (colapso de la colonia). DWV se puede transmitir tanto vertical como horizontalmente, sin embargo, en colonias que presentan niveles adecuados de nutrición, tamaño de población y sanidad,

frecuentemente circula como infecciones subclínicas sin causar ningún tipo de problema evidente a nivel productivo (Figura 6).

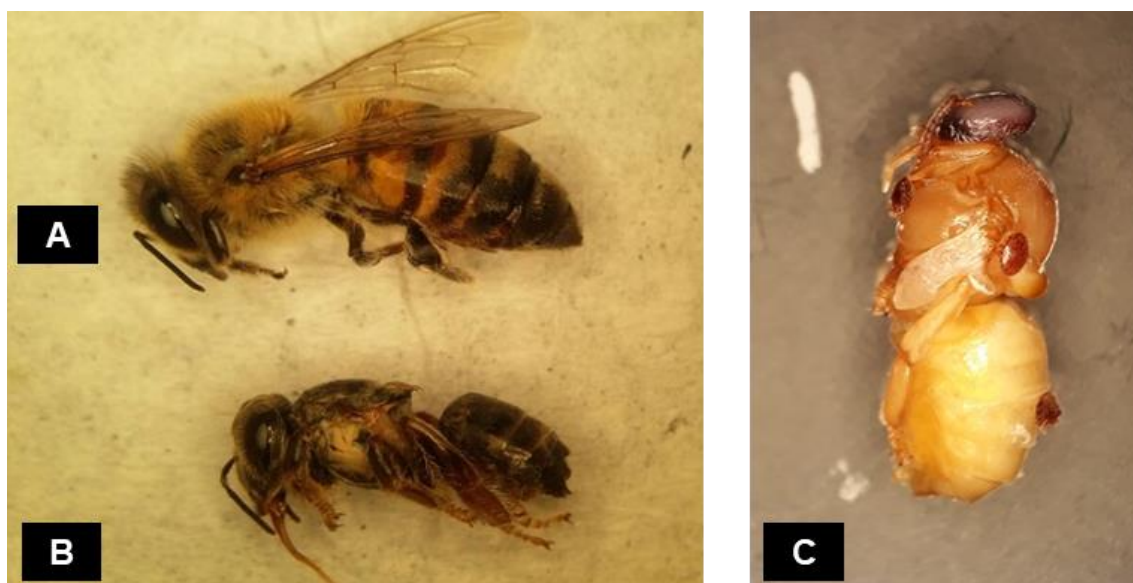


Figura 6: Fotografía de abejas infectadas con DWV. (A) Abeja asintomática para DWV; (B) Abeja con malformaciones en sus alas, provocadas por el DWV; (C): Cría en estadio pupa parasitada con el ácaro *Varroa destructor*.

El DWV pertenece a la familia *Iflaviridae*. Está altamente relacionado con el Virus Kakugo (KV) con el que presenta un 96% de identidad de nucleótidos (98% de aminoácidos) y con el Virus varroa destructor-1 (VDV-1), con el que posee 84% identidad de nucleótidos (95% aminoácidos)(Moore et al., 2011). Debido a esta gran similitud estos tres virus se consideran como subtipos de un solo grupo denominado DWV, clasificando a DWV y KV como DWV-subtipo A y VDV-1 como DWV-subtipo B. Estos virus poseen una morfología icosaédrica de 30 nm de diámetro y un genoma ARN de cadena simple positiva de aproximadamente 10 kb. El genoma del DWV presenta una proteína viral (Vpg) ligada covalentemente al extremo 5' junto a una región no traducida de 1.1kb, que contiene el sitio de entrada al ribosoma (IRES) y una secuencia poliadenina en el extremo 3'. El IRES es seguido por un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una poliproteína grande, en la cual la región 5' del ORF contiene las proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) y la 3' codifica las proteínas no estructurales (ARN Helicasa, 3C Proteasa y ARN Polimerasa dependiente de ARN) del virus (Ryabov et al., 2019) (Figura 7).

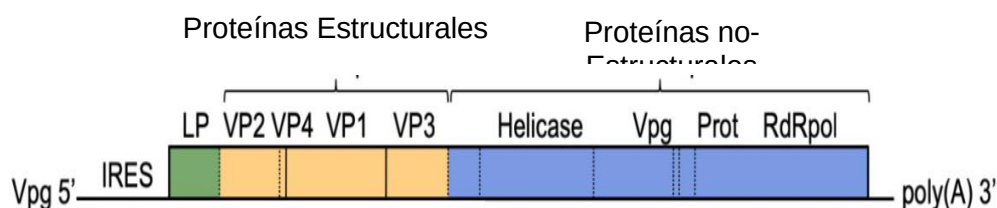


Figura 7: Diagrama del genoma del Virus de las alas deformadas (DWV). IRES, sitio de entrada del ribosoma interno; LP, proteína líder; Prot, proteasa viral; RdRpol, ARN polimerasa dependiente de ARN; VP, proteína viral estructural; Vpg, proteína vinculada al genoma (Eugene V. Ryabov et al., 2019).

1.4.1 Variantes del Virus de las alas deforme

El DWV presenta tres variantes *masters*, la más extendida es DWV-A, seguida por el virus *Varroa destructor* 1 (VDV1 o DWV-B) (McMahon et al., 2016), que puede replicar tanto en *Varroa destructor* como en abejas y la variante DWV-C (Dalmon et al., 2017b; Moore et al., 2011; Mordecai et al., 2016; Ryabov et al., 2014). Una cuarta variante, DWV-D, se recuperó recientemente de abejas melíferas egipcias recolectadas en la década de 1970, siendo ese el único reporte de dicha variante (de Miranda et al., 2022).

Algunos estudios han sugerido que la evolución del virus y su prevalencia están estrechamente relacionadas con la presencia de *V. destructor*. Antes de la invasión de *Varroa destructor*, el DWV se transmitía de forma vertical y por trofolaxia. Un estudio filogeográfico confirmó que la pandemia de DWV y el aumento de la virulencia del virus coincidieron con la propagación global del ácaro *Varroa destructor* (Wilfert et al., 2016). Esto sugiere que las poblaciones de DWV en colonias libres e infestadas con *V. destructor* son genéticamente distintas y que la vectorización de ácaros impulsa cambios evolutivos en el virus. Sin embargo, no está claro qué cambios genéticos hacen que el DWV transmitido por el ácaro sea más virulento (McMahon et al., 2016). En la naturaleza, pueden circular libremente estas variantes de DWV; pero, en determinadas condiciones puede prevalecer alguna de ellas. Esto se ve reflejado en los efectos provocados por las recientes invasiones de *Varroa destructor* en Hawái y Nueva Zelanda donde la presencia del ácaro no solo aumenta la propagación del DWV y las cargas virales entre las poblaciones de abejas, sino que incluso ha provocado pérdida de diversidad viral (Mondet et al., 2014; Martin et al., 2012).

La variante DWV-A reportado por primera vez en 1982, ha sido reportada en gran parte del mundo (Barroso-Arévalo et al., 2019; Lanzi et al., 2006). En efecto, la mayoría de las secuencias registradas en bases de datos genómicas se corresponden a esta variante. Mediante análisis filogenéticos se ha demostrado que DWV-A es la variante original de DWV, con un presunto origen europeo (Ongus et al., 2004). Por otra

parte, la variante DWV-B fue detectada por primera vez en Países Bajos, en muestras del ácaro *Varroa destructor* (Ongus et al., 2004). En los últimos años DWV-B ha sido reportada en diferentes países, tales como, Israel, Francia, Alemania, Reino Unido, Egipto, Etiopía, China, Brazil, Chile, Italia, EE. UU., entre otros (Riveros et al., 2020; Ryabov et al., 2017). En Argentina se identificó por primera vez la variante DWV-B en nuestras provenientes de apiarios de la provincia de Buenos Aires y Santa Fe, confirmadas por secuenciación en el año 2020 (Brasesco et al., 2021).

Las variantes DWV-C, son las variantes de DWV menos reportadas, identificadas por el uso de secuenciación de nueva generación (NGS) (Dalmon et al., 2017b; Moore et al., 2011; Ryabov et al., 2014; Zioni et al., 2011). Existen controversias respecto al impacto de la recombinación genética en la virulencia del DWV. Por un lado, se ha observado la selección de una variante virulenta, recombinante DWV-A y DWV-B, después de una transmisión masiva y repetida mediada por *Varroa destructor* (Ryabov et al., 2014). Por otro lado, se ha sugerido que las variantes recombinantes pueden ser el resultado de la evolución adaptativa del DWV hacia una menor virulencia para optimizar su transmisión por el ácaro en las abejas melíferas (Dalmon et al., 2017b). A su vez, los mecanismos asociados con la aparición de deformidades en las alas no se han descrito completamente y se desconocen las funciones respectivas de las proteínas virales en la virulencia.

Se han realizado estudios con secuencias de genomas de DWV-A, DWV-B y DWV C para analizar eventos de recombinación en el genoma del virus, comparando regiones conservadas y variables entre secuencias de virus obtenidas de colonias expuestas a diferentes estrategias de manejo de *V. destructor* (Dalmon et al., 2017b). Se identificaron nueve puntos de recombinación en el genoma viral, con dos regiones de recombinación preferentes (LP y polimerasa). Estos puntos de recombinación coinciden con las regiones funcionales del genoma viral, sugiriendo que la recombinación ocurre en las fronteras entre estas las mismas. Así mismo, en la región IRES se han reportado variantes recombinantes. También se ha sugerido que la recombinación puede estar relacionada con la adaptación del virus al sistema inmunológico de las abejas. Además, se menciona la posibilidad de que la recombinación esté asociada con la tolerancia a *V. destructor* y la virulencia del virus, pero aún se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis (Ryabov et al., 2019).

1.4.2 Diagnóstico del DWV

Dentro de las metodologías de detección de los virus, el método más común para el diagnóstico de DWV es la detección de su genoma mediante RT-PCR o RT-PCR en tiempo real. Se han descrito varios cebadores que amplifican diferentes regiones del

genoma del virus que codifican proteínas estructurales y no estructurales. La mayoría de los cebadores se dirigen al gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Ding et al., 2016; Kevill et al., 2017; Ryabov et al., 2017; Tehel et al., 2019). Sin embargo, otras regiones estudiadas codifican el sitio de entrada interno del ribosoma (IRES), la helicasa y proteínas estructurales como VP1 y VP2 (Bradford et al., 2017; Dalmon et al., 2017b; Kevill et al., 2017, 2019a; Mordecai et al., 2016; Quintana et al., 2021; Ryabov et al., 2017; Tehel et al., 2019; Tibatá et al., 2021).

Recientemente, se han descrito sistemas de PCR en microchips en tiempo real que proporcionan metodologías para la detección rápida del ARN viral. De hecho, esta metodología fue descrita por Jung-Min Kim y colaboradores (2020) con la finalidad de detectar el DWV hibridando un producto de PCR con un CHIP-DNA conteniendo sondas marcadas para la región codificante de la RdRp (Kim et al., 2020). Por otro lado, se ha desarrollado la PCR múltiple para la detección simultánea de varios virus que afectan a las abejas, incluido el DWV (Chen et al., 2004; Meeus et al., 2010), utilizando los genes mencionados anteriormente como blanco. La disponibilidad de estas técnicas permite a los grupos de investigación contar con herramientas adecuadas y fiables para la detección de cualquier variante de DWV.

El avance de la metodología de secuenciación ha proporcionado la posibilidad de implementar el análisis de genomas completos de DWV de tal manera que se puedan determinar los puntos de recombinación entre las variantes DWV-A y DWV-B, caracterizar las variantes circulantes en diferentes regiones e identificar las diferencias moleculares entre las variantes de DWV que circulan de forma encubierta o las que son altamente virulentas (Mordecai et al., 2016; Roberts et al., 2020; Ryabov et al., 2019). Disponer de secuencias de genomas completos de las distintas variantes del virus permite contar con la información suficiente para diseñar metodologías diagnósticas que diferencien dichas variantes.

En Argentina con la reciente identificación de variantes DWV-A y DWV-B presentes en colmenas comerciales es de suma necesidad contar con herramientas que permitan detectar y diferenciar de forma certera las variantes del DWV. Por otra parte, actualmente no se cuenta con secuencias de genomas completos provenientes de variantes identificadas en Argentina, siendo de gran necesidad caracterizar mediante secuenciación de alto rendimientos las variantes circulantes en las zonas de mayor producción apícola.

1.5 Manejo apícola

La intensificación de la agricultura ha provocado cambios en los ecosistemas, reduciendo la disponibilidad de flora y ofreciendo recursos multiflorales o monoflorales

dependiendo del uso de la tierra. Como consecuencia de esto, la actividad apícola se lleva a cabo mediante dos tipos de manejo "Estacionario o Sedentario y Migratorio o Trashumante". En zonas donde predomina una amplia diversidad floral se realiza el manejo estacionario, permitiendo a las colonias permanecer en un mismo lugar durante toda la temporada. Las colonias que se trasladan entre diferentes cultivos realizan un manejo migratorio. Esto ocurre principalmente en zonas donde predomina el monocultivo o floraciones, con la finalidad de proveer servicios de polinización o aumentar la producción de miel. Los apicultores que realizan manejo migratorio poseen, en general un gran número de colonias y emplean prácticas diferentes a las de apicultores de menor escala, en su mayoría con apiarios estacionarios (Traynor et al., 2016; Welch et al., 2009; Zhu et al., 2014).

En lo que respecta al manejo de los apicultores, el transporte de colonias a áreas con abundantes recursos florales es un enfoque ampliamente utilizado. Esta práctica tiene como objetivo aliviar la escasez de flores, aumentar la producción de miel y minimizar la necesidad de alimentación suplementaria, demostrando así mayores ventajas financieras y eficiencia para la producción de miel en comparación con la apicultura estacionaria (Kumsa et al., 2020; Sharma et al., 2013)

La investigación realizada en la India y Arabia Saudita reveló que la flora insuficiente durante períodos prolongados de escasez floral puede afectar la salud de las abejas y aumentar las pérdidas de colonias en los sistemas de manejo de apicultura estacionaria. Además, en Europa, los apicultores que migran sus colonias en busca de recursos de forraje superiores experimentan menores pérdidas de colonias en invierno, según lo documentado por Oberreiter y Brodschneider y van Der Zee y col. (Oberreiter and Brodschneider, 2020; Van Der Zee et al., 2014).

Por otro lado, las prácticas migratorias conducen a cambios a gran escala para las colonias, ya que debido al traslado deben adaptarse a nuevas condiciones ambientales, en particular la exposición a la calidad diferencial del forraje (Simone-Finstrom et al., 2022), adaptarse a las oscilaciones diarias en temperatura, humedad y régimen de vientos. Además, su exposición a patógenos puede aumentar y pueden ocurrir infecciones por nuevos patógenos (Jara et al., 2018; Runckel et al., 2011). El estrés experimentado durante el transporte también afecta la inmunidad (Simone-Finstrom et al., 2022) y aumenta la susceptibilidad a enfermedades debido a una reducción en la diversidad de alimentos al polinizar grandes monocultivos (Colwell et al., 2017; Di Pasquale et al., 2013).

Recientes estudios han reportado algunos efectos perjudiciales acarreados por el traslado de colonias. Las colmenas migratorias tienen un mayor riesgo de parasitismo y enfermedades infecciosas que las estacionarias y, aunque la trashumancia es una práctica común en muchas regiones, pocos estudios se han centrado en los efectos potencialmente perjudiciales de este tipo de manejo (Ahn et al., 2012; Colwell et al., 2017; Simone-Finstrom et al., 2016; Traynor et al., 2016); principalmente, la incidencia de enfermedades de las abejas (Jara et al., 2021; Traynor et al., 2016; Welch et al., 2009; Zhu et al., 2014).

En el oeste de Estados Unidos, realizaron estudios con colonias de abejas involucradas en la polinización de almendros, investigando la asociación de múltiples factores, incluyendo la estacionalidad y abundancia de los patógenos, la operación apícola, el tamaño de la población de colonias y el nivel de infestación de ácaros, con la salud de las colonias de abejas melíferas y la pérdida de colonias. Se observó que la fecha de muestreo correlacionaba con la prevalencia y la abundancia de patógenos (Cavigli et al., 2016; Glenney et al., 2017). La prevalencia de patógenos fue mayor en muestras obtenidas después de la polinización de almendros y las colonias débiles mostraron una mayor prevalencia que las fuertes (Cavigli et al., 2016). Las colonias migratorias, además, regresaron con menos abejas y una mayor carga de virus que las colonias estacionarias, sin embargo, las cargas virales se volvieron similares un mes después. Por otro lado, los niveles del ácaro *Varroa destructor* fueron similares en las colonias migratorias y estacionarias, pero las primeras experimentaron una disminución en la carga de ácaros, posiblemente debido a un menor número de abejas hospedadoras (Alger et al., 2018).

En un estudio reciente, Jara y col. investigaron la tasa de infestación de *V. destructor*, la presencia del parásito microsporidio *Nosema* spp y del DWV antes, durante y después de una operación migratoria en España (Jara et al., 2021). Los investigadores observaron una mayor incidencia de *V. destructor* y *Nosema ceranae*, así como una menor carga viral de DWV en las colonias migratorias. Las abejas expuestas al manejo migratorio durante la edad adulta exhibieron niveles más altos del complejo del virus AKI (ABPV, KBV, IAPV) y niveles reducidos de expresión génica antiviral. Además, el aumento estacional de DWV fue más significativo en las abejas juveniles de las colonias migratorias que en las estacionarias (Simone-Finstrom et al., 2022).

Por otra parte, en Uruguay analizaron como el estrés nutricional, debido al traslado a zonas de monocultivo, afecta la fortaleza y la salud de las colonias

(Branchiccela et al., 2019). Los investigadores evaluaron dos grupos de colmenas expuestas al monocultivo de *Eucalyptus grandis* desde el inicio hasta el cierre de la floración (marzo-mayo). Ambos grupos tenían acceso al polen disponible en la plantación, pero uno de ellos recibió adicionalmente una torta de polen polifloral durante todo el período de estudio. A corto plazo, las colonias que no recibieron suplemento dietario mostraron mayores niveles de infección con *Nosema* spp. y experimentaron una reducción en su población de adultos y cría. En contraste, las colonias que fueron suplementadas con polen polifloral mantuvieron un mayor número de colonias positivas para ABPV y DWV; sin embargo, las cargas virales no fueron altas y no afectaron la salud general de las colonias. Los niveles de infestación por *V. destructor* se mantuvieron bajos en ambos grupos durante el ensayo. Las colonias bajo estrés nutricional, a largo plazo, no fueron capaces de recuperar su población al inicio de la temporada siguiente (primavera). En consecuencia, este trabajo reveló que el estrés nutricional afecta severamente la fortaleza de las colonias a corto y largo plazo.

En Argentina, el manejo migratorio es una práctica habitual de los apicultores en la cual trasladan sus colonias en post de aumentar la producción de miel y aprovechar la cosecha de distintas variedades de mieles u otorgar servicios de polinización. Pero no hay reportes sobre el impacto del tipo de manejo en la producción apícola, la sanidad, la fortaleza de las colonias y la prevalencia de los patógenos. Los estudios revisados sugieren que el estrés nutricional, el transporte de colonias y la exposición a diferentes condiciones ambientales pueden influir en la carga de patógenos y en la susceptibilidad de las abejas a enfermedades.

Por todo lo expuesto, el objetivo de este trabajo de tesis fue analizar la presencia y abundancia del Virus de Alas Deformadas (DWV) en abejas provenientes de apiarios en clima templado, principalmente en la provincia de Entre Ríos. Además caracterizar las variantes de DWV circulantes en apiarios con diferentes tipos de manejo. Esto proporcionará una base sólida para futuras investigaciones y para el desarrollo de estrategias de manejo más efectivas en la apicultura argentina, con el fin de mantener la salud de las colonias y garantizar la producción apícola sostenible.

HIPOTESIS

En las colmenas argentinas de clima templado existen variantes (subtipos y recombinantes) del DWV, cuya diversidad se ve afectada por la presencia de *Varroa destructor*.

El tipo de manejo apícola afecta la salud de la colmena y la presencia y abundancia del DWV.

OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar y caracterizar las diferentes variantes del Virus de Alas Deformadas, así como determinar el impacto que generan el tipo de manejo y la presencia del ácaro Varroa destructor en la presencia, abundancia y diversidad genética del DWV en apiarios de clima templado de la República Argentina.

Objetivos específicos

- 1. Estudiar la prevalencia de DWV en apiarios destinados a la producción de miel situados en la provincia de Entre Ríos.*
- 2. Evaluar la presencia del ectoparásito Varroa destructor en los apiarios muestreados.*
- 3. Estudiar la presencia de DWV en abejas y en el ácaro.*
- 4. Evaluar el impacto de la interacción Varroa-DWV y el tipo manejo apícola en la presencia y abundancia DWV en las colmenas.*
- 5. Aislar los virus hallados en abejas y en el ácaro.*
- 6. Secuenciar los genomas completos del DWV y sus variantes a fin de caracterizar genéticamente los virus circulantes en la región de estudio.*

Capítulo 2



2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Muestreo

2.1.1 Características del área de estudio

Para llevar a cabo este trabajo se realizaron dos muestreos, uno durante el inicio de la temporada (septiembre de 2018) y otro en fin de temporada (marzo de 2019). La toma de muestra se realizó en apiarios de dos zonas distintas dentro de la Provincia de Entre Ríos, seleccionando apiarios que implementen prácticas apícolas diferentes. En el Departamento Tala, en la localidad de Gobernador Maciá (32°09'15.7"S 59°24'15.4"W), se escogieron apiarios que implementen una práctica de manejo estacionario, donde las colonias permanecen en un mismo lugar durante toda la temporada apícola (septiembre a marzo). Esta región se distingue por su diversidad floral predominante. Por otro lado, en el Departamento de Federación, específicamente en Villa del Rosario (30°47'47.4"S 57°54'44.4"W), los apiarios realizan operaciones de traslado de colonias, sujetas al cierre de la floración en el área, implementando prácticas apícolas migratorias. En Villa del Rosario, la floración está marcada por cultivos monoflorales como *Citrus* spp. (septiembre-noviembre) y *Eucalyptus grandis* (febrero-abril).

En términos de infraestructura, los apicultores mantenían entre 800 y 1000 colmenas distribuidas en apiarios con un mínimo de 60 y un máximo de 100 colmenas. Todos los colmenares seleccionados estaban destinados a la producción de miel. La cosecha de miel en los apiarios migratorios se realizaba al finalizar cada período de floración (diciembre, enero, marzo), mientras que en los apiarios estacionarios se llevaba a cabo entre finales de primavera y principios de otoño (diciembre, marzo). Todos los apiarios realizaron tratamiento contra el ácaro *V. destructor*. Esos tratamientos implicaron el uso de almitraz al comienzo de la temporada y ácido oxálico al final, en ambos tipos de manejo.

El transporte de abejas melíferas se realizó siguiendo los requerimientos de la Autoridad de Sanidad Animal Argentina, que establece que las colonias no deben presentar ningún signo clínico asociado a loque americana (*Paenibacillus larvae*), *Aethina tumida* y *Tropilaelap* spp.

2.1.2 Toma de muestra

La toma de muestra se realizó previo al tratamiento con acaricida. Se recolectó material en 145 colmenas, pertenecientes a 15 apiarios. Durante inicio y fin de temporada se muestrearon 6 apiarios con prácticas apícolas estacionarias. Mientras que, para los apiarios con prácticas migratorias, fueron 5 colmenares durante el inicio y

9 colmenares durante fin de temporada. Dentro de cada colmenar, la toma de muestra se realizó en el 10% del apiario, de forma aleatoria; muestreando siempre las mismas colonias en ambos tiempos. Todas las muestras se enviaron al laboratorio en hielo seco y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

En cada muestreo se recolectaron aproximadamente 300 abejas del marco de cría para detectar y cuantificar virus y calcular el porcentaje de infestación de *V. destructor* en estadio forético. Las muestras estaban compuestas por abejas de edades mixtas, incluidas abejas nodrizas, obreras y forrajeras. Se colectaron, además, abejas forrajeras a la entrada de la colmena para la detección de *Nosema* spp.

En los casos que el apicultor lo permitió, se extrajo una porción de la cría sellada para evaluar la presencia de *V. destructor* y también se recolectaron muestras de pan de polen. Todas estas muestras se utilizaron para la detección de DWV (Tabla 1).

Práctica Apícola	Muestreo	N°colmen a/ N°apiario	N° de colmenas muestreadas				
			Detección de DWV			Nosema spp.	varroa
			Abeja	Cría	Polen		
Estacionario	Inicio	34/6	34	8	2	34	34
	Fin	32/6	32	9	7	32	32
	Invierno				4		
Migratorio	Inicio	29/5	29	12	3	29	29
	Fin	50/9	50	17	6	50	50
	Invierno				10		10

Tabla 1: Número de colmenas muestreadas durante inicio y fin de temporada para la detección del DWV (abejas adultas, cría operculada y polen), recuento de esporas de *Nosema* spp y el nivel de infestación de *varroa* forética.

2.2 Fortaleza, sanidad y genética de las colmenas

2.2.1 Categorización de colmena.

La salud de la colmena se evaluó utilizando la clasificación descrita por Faurot y col. (Faurot-Daniels et al., 2020), clasificando a las colmenas como débiles, medias y fuertes según el tamaño de su población, que se determinó por la cantidad de marcos cubiertos por abejas. El tamaño poblacional de las colmenas difiere durante el inicio de temporada (aproximadamente 60.000-80.000 individuos) y el fin (20.000-40.000 abejas) dependiendo de la disponibilidad del alimento y el cambio de temperatura. Por tal motivo, el número de marcos cubiertos por abejas que definieron cada categoría se ajustó al momento del muestreo. Al comienzo de la temporada (septiembre de 2018) las

categorías fueron las siguientes: fuerte (C1): 8-10 cuadros con abejas; media (C2): 5-7 cuadros con abejas y débil (C3): <5 cuadros. Al final de la temporada (marzo de 2019), el número de marcos cubiertos por abejas para cada categoría fue: C1: 8; C2: 6 y C3: <5.

Además, se realizó una inspección visual de la población de adultos y crías, registrándose la presencia de signos de enfermedades (abejas con alas deformadas o ausencia de estas), mortalidad de adultos y larvas, disminución drástica del número de la población, la presencia de *V. destructor* y la tasa de mortalidad por colonia.

Por otra parte, se realizó una encuesta a los apicultores para registrar el manejo realizado en cada apiario, evaluando cuando se realizó monitoreo y control de *V. destructor*, si era habitual el recambio de reinas, si realizaban recambio de material oscuro o viejo en la cámara de cría y si realizaban el agregado de suplemento dietario (Formularios utilizados en Anexo II).

2.2.2 Cuantificación del ácaro *Varroa destructor*

En cada colonia se monitoreó la infestación de *V. destructor*, previo al tratamiento contra el ácaro, analizando 300 abejas nodrizas de tres cuadros de cría (en lo posible separados entre sí y con predominio de cría abierta) conservadas en hielo seco hasta ser llevadas al laboratorio.

Todo el material recolectado fue traspasado a un frasco con tapa que contienen una solución de agua y alcohol 70%. Para la extracción de las *Varroa destructor* en estadio forético (ácaro sobre abejas adultas), las muestras se agitaron fuertemente por cinco minutos (para lograr desprender los ácaros de las abejas). El contenido del frasco se volcó sobre una malla o tamiz que permitió el paso de los ácaros a un contenedor, pero retuvo a las abejas. Las abejas se enjuagaron varias veces para asegurar la recolección total de los ácaros. Finalmente, se contaron los ácaros y las abejas presentes en cada muestra (Figura 8). Para obtener el porcentaje de *V. destructor* en estadio forético (%VF) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%VF: (N.^{\circ} \text{ de ácaros desprendidos} / N.^{\circ} \text{ de abejas de la muestra}) \times 100$$

En este estudio, el nivel de infestación bajo se determinó entre los porcentajes 0.1-1%, el nivel medio entre 1.1%-3%, el nivel fuerte de infestación en porcentajes mayores a 3% y negativo cuando no se detectaron *Varroa destructor* en la muestra.



Figura 8: Diagrama del método del frasco para el recuento de *Varroa destructor* en estadio forético. Extraído de Control de enfermedades de las abejas-SENASA, 2010.

2.2.3 Detección de esporas de *Nosema* spp:

El nivel de infección por *Nosema* spp. en cada colonia se determinó a partir de un grupo de abejas (N: 60) mediante el conteo de esporas, de acuerdo con el método descrito por Cantwell modificado por Fries (Cantwell, 1970; Fries et al., 1984) . Estas detecciones fueron realizadas en el laboratorio de Especialidades Productivas (LEPMA) del Municipio Gobernador Maciá, Entre Ríos como actividades en colaboración, por el técnico Fabricio Raticelli.

Las muestras de abejas forrajeras fueron tomadas de la piquera de la colmena y conservadas en hielo seco hasta ser llevadas al laboratorio. Para realizar el macerado, se separaron los abdómenes del total de las abejas muestreadas y se maceró el material en mortero con un total de 60 ml de agua estéril. El material se filtró en dos oportunidades, usando un tamiz para eliminar los tejidos que no se lograron disgregar con mortero y un segundo filtrado usando mallas de 0.44 mm.

Una vez obtenido el macerado se agregaron 3 gotas del colorante azul de metileno para teñir las estructuras internas de levaduras, hongos y otras células, excepto los esporos de *Nosema* spp. El conteo se realizó en cámara de Neubauer o hemocitómetro bajo el microscopio 40x (Lancet serie 1142831).

El recuento de esporos se realizó antes que se produzca la deshidratación de la muestra según la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento de esporos} = \text{Esporos contados} \times 10.000 = \text{esporos/ml.}$$

En las zonas de estudio el nivel de *Nosema* spp, según el recuento de espora se clasificó en: Débiles al presentar 1-500.000 esporas/ml; Medio con 500.001-1.000.000

esporas/ml, Fuerte cuando se superase el valor de 1.000.000 de esporas /ml y Negativo: en los casos que no se detectaron esporas.

2.2.4 Identificación de Haplotipos de *Apis mellífera* en las colmenas muestreadas: PCR-RFLP.

Para la identificación de haplotipos se analizaron los polimorfismos de la región intergénica correspondiente a los genes Citocromo Oxidasa I y Citocromo Oxidasa II (COI-COII). Para ello, se realizó una extracción de ADN total a partir de una abeja por colonia, usando el buffer de extracción (NaCl 5M, EDTA 0,5M, Tris-HCl 1M), el cual se agregó (900 µl) al tubo conteniendo las abejas adultas recolectadas de cuadros de cría. Se maceró la muestra, se incubó a 65°C durante toda la noche. Posteriormente, se agregaron 450µl de cloroformo-etanol (24:1) y se centrifugó a 14000rpm durante 20 min. La fase acuosa recuperada fue incubada con 15µl de RNAs (1mg/ml) a 37°C/30 min. Se repitió el paso de cloroformo-etanol y centrifugación. Nuevamente se extrajo la fase acuosa y se precipitó el ADN agregando isopropanol (600µl), nuevamente la muestra fue centrifugada (1400rpm/20min). El pellet se lavó con etanol, luego de centrifugar, finalmente el pellet se resuspendió en 50 µl de agua ultrapura (Sigma).

La región COI-COII se amplificó con los cebadores MT hsf y MT 2 (Tabla 2), siguiendo la metodología descrita por Agra (Agra et al., 2018)(Anexo I-A), amplificando un fragmento de 8476 1101 pb en la región COI-COII mitocondrial dependiendo del haplotipo. Esta detección fue realizada en colaboración con el laboratorio de Estación Experimental Agropecuaria de INTA Balcarce por el Dr. Marcelo Agra.

Cebador	Gen blanco	Secuencia del cebador	Tm (°C)	Amplificón (pb)
MThs F	CO I-II	TCTATACCACGACGTTATTC	58	847-1101
MT2	CO I-II	GATCAATATCATTGATGACC	55	847-1101

Tabla 2: Oligonucleótidos usados en la identificación de Haplotipos.

2.2.5 Identificación de polen

Para evaluar la floración disponible en los apiarios al momento de la toma de muestra, se extrajo pan de polen de 100 celdas (1 colmena) de dos apiarios de manejo estacionario y migratorio durante inicio, fin de temporada e invierno. El polen recolectado por colmena se procesó en un único pool y se realizó la identificación florán en las muestras mediante los protocolos descritos por Fagúndez. Para la observación y análisis al microscopio óptico, el polen fue previamente acetolizado (Fagúndez, 2011). El aporte de cada tipo de polen en la dieta de las abejas se calculó siguiendo lo descrito

por (Kay O' et al., 1991). Esta metodología fue realizada en colaboración con el laboratorio de Actuopalinología, CICyTTP-CONICET/FCyT-UADER por la Dra. Guillermina Fagúndez (Tabla 3).

Apiario/colmena	Nº muestra	Zona	Muestreo
V2.1	9	Villa del Rosario	Septiembre
V2.1	20	Villa del Rosario	Marzo
V2.2	27	Villa del Rosario	Julio
V4.1	7	Villa del Rosario	Septiembre
V4.1	21	Villa del Rosario	Marzo
V4.2	26	Villa del Rosario	Julio
M4.1	2	Maciá	Septiembre
M4.3	24	Maciá	Marzo
M4.3	32	Maciá	Julio
M2.2	16	Maciá	Septiembre
M2.2	23	Maciá	Marzo
M2.9	30	Maciá	Julio

Tabla 3: Muestras de pan de polen para la identificación floral de colmenas migratorias y estacionarias.

2.3 Detección del DWV

2.3.1 Procesamiento de las muestras y extracción del ARN:

Para la extracción de ARN, se procesó de cada colmena muestreada un grupo de 30 abejas recolectadas de los marcos de cría. Las muestras de crías fueron separadas en crías parasitadas y crías no parasitadas y procesadas en pools de 10 crías por categoría. Los individuos de *V. destructor* obtenidos de la cría parasitada se analizaron según el nivel de infestación: cuando la cría presentaba menos de 5 ácaros, se procesaban en 1 pool; en caso contrario, se hicieron pools de 5-7 ácaros.

Todas las muestras de abejas y crías se maceraron en un mortero con un volumen apropiado de PBS pH 7 (7 ml para abejas adultas y 3 ml para crías); los ácaros se congelaron previamente con nitrógeno líquido y posteriormente se maceraron en un mortero con 0,5 ml de PBS pH 7. El polen se recolectó de aquellos marcos donde se tomaron muestras de cría. El material se extrajo de 50 celdas (conformando 1 pool por colmena) y se re suspendieron 100 mg de cada pool en 0,5 ml de PBS pH 7.

Los macerados obtenidos se clarificaron por centrifugación a 6500 g a 4°C durante 45 minutos. Se utilizaron 200 µl del sobrenadante para la extracción de ARN

utilizando el kit de ARN High Pure Viral RNA Kit (Roche) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El sobrenadante restante y el ARN obtenido se almacenaron a -80°C.

2.3.2 Obtención del ADN copia (ADNc)

A partir del ARN extraído se realizó la síntesis de ADNc mediante retrotranscripción (RT) utilizando la enzima MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Transcriptasa Reversa, Promega) y el uso de cebadores específicos según el fragmento de interés a ser amplificado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) subsecuente.

La mezcla de RT se preparó con 5µl de Buffer 5x (Promega); 0,5µl de dNTP's 10mM (deoxinucleótidos, Promega); 0,5µl del cebador anti sentido en una concentración de 10 µM; 0,25 µl de transcriptasa reversa 200U/µl M-MLV (Promega) y 13,75 µl de agua ultrapura (Agua DNase, RNase Free; Invitrogen/Sigma) en un volumen final de 20 µl. Se incorporaron 5µl del ARN extraído. Como control negativo de amplificación se agregó un tubo donde se reemplazó el ARN por H₂O. El perfil térmico de la reacción de RT fue el siguiente: un paso a 42 °C durante 60 min seguido de otro 94 °C durante 10 min para desnaturalizar la transcriptasa inversa. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su utilización.

2.3.3 Construcción del control positivo (plásmido PAN-DWV)

Se partió de una muestra positiva previamente determinada en nuestro laboratorio. La amplificación del fragmento del gen de la helicasa se realizó utilizando los oligonucleótidos descritos por Bradford y col. (Bradford et al., 2017)(Tabla 4), los cuales generan un amplificado de 375 bp que contiene la secuencia blanco de la qPCR empleada para la detección del DWV.

La extracción de ARN y la síntesis ADNc se realizó como se describió previamente en los apartados 2.3.1 y 2.3.2.

El ADNc obtenido fue utilizado como templado en la PCR siguiendo las condiciones de reacción descrita en el Anexo (I.B). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador SimpliAmp Thermalcycler (Appliedbiosystems).

Cebador	Gen blanco	Secuencia del cebador	T _m (°C)	Amplificación (pb)
Pan-DWV_L_F	Helicasa	TGGACGCGAAATGATGCATTC	67	375
Pan-DWV_L_R	Helicasa	TTCAACAAACGCGCTGCAG	67	

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la construcción del plásmido PAN-DWV.

El producto de amplificación fue purificado a partir de geles de agarosa empleando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN obtenido fue resuspendido en 20 μ l de Tris-EDTA 10 mM pH 8.

Para el clonado del producto de amplificación, se utilizó el plásmido pGEM-T Easy (Promega). La ligación del mismo y el plásmido se realizó a 4 °C, durante 16 horas, en un volumen final de 10 μ l bajo las siguientes condiciones: 5 μ l de buffer de ligación, 3 U T4 ADN Ligasa (Promega) y una relación vector:inserto de 1:5.

La transformación de bacterias *E. coli* DH5 α competentes (10^6 bacterias transformantes/ μ g de ADN superenrollado) se realizó utilizando el método de shock térmico descrito en el Manual de laboratorio: Molecular Cloning (Wood et al., 1983). Las placas de transformación se incubaron en presencia de ampicilina (50 mg/ml), IPTG (0.1 mg/ml) y X-Gal (0.2 mg/ml), a 37°C durante toda la noche y se seleccionaron colonias blancas.

Los clones fueron crecidos, durante toda la noche a 37°C en agitación, en 3 ml de medio LB con ampicilina. A partir de estos cultivos se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico empleando el kit comercial Wizard Plus SV MiniprepsStart-Up (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. La selección de clones positivos se realizó por mapeo de restricción.

Los clones positivos seleccionados (pGEM-PAN) fueron crecidos en 200 ml de LB con ampicilina a 37°C en agitación durante toda la noche; posteriormente, estos cultivos fueron utilizados para purificar el ADN plasmídico empleando el kit comercial Wizard Plus Midipreps (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El plásmido pGEM-PAN-DWV purificado fue cuantificado en un espectrofotómetro de microvolumenes (Nanodrop 2000) y conservado a -20°C.

2.3.4 RT-qPCR

La síntesis de ADNc se realizó mediante las condiciones previamente mencionadas en el apartado 2.3.2 de este capítulo utilizando el cebador específico qPAN-DWV R o β -actina R, según la PCR (Tabla 5).

Todas las qPCR se realizaron en un volumen final de 12,5 μ l conteniendo 6,25 μ l de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0,5 μ l de cada cebador (10 μ M), 2,75 μ l de H₂O y 2,5 μ l de ADNc previamente sintetizado.

La eficiencia de la reacción se calculó empleando una curva de calibración construida con concentraciones conocidas del plásmido pGEM-PAN-DWV (diluciones en base 10 desde $5,8 \times 10^7$ a $5,8 \times 10^0$ copias génicas/ μ l) analizadas en 12 réplicas (Figura 9).

El cálculo del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ) se realizó siguiendo el modelo descrito por Klymus y col. (Klymus et al., 2020). Brevemente, se preparó otra curva de calibración con diluciones seriadas en base 10 (desde $7,0 \times 10^8$ hasta $7,0 \times 10^0$ copias génicas/ reacción) y en base 4 (desde 960 hasta 0,24 copias génicas/ reacción) del plásmido pGEM-PAN-DWV. Cada punto de la curva se ensayó en 12 réplicas. En este trabajo se consideran las siguientes definiciones:

LOD: la mínima concentración del estándar que produce al menos el 95% de réplicas con resultado detectable.

LOQ: la mínima concentración del estándar que puede ser cuantificada con un coeficiente de variación (CV) menor a 35%.

Para determinar el LOD los resultados expresados de forma binaria (detectado/ no detectado) se modelaron a una curva sigmoidea. Para el cálculo del LOQ, los CVs asociados a cada concentración del estándar se modelaron a funciones exponenciales, lineales y polinómicas. En ambos casos se utilizó el paquete R.

El script general empleado se encuentra en el siguiente link: https://github.com/cmerkes/qPCR_LOD_Calc (Figura 10).

Para cuantificar las cargas virales (CV) se preparó una curva estándar de cinco puntos con datos de Ct obtenidos a partir de concentraciones conocidas del plásmido pGEM-PAN-DWV (diluciones en base 10 desde $5,8 \times 10^6$ a $5,8 \times 10^2$ copias génicas/ μ l) y se analizó por triplicado; las cargas virales se expresaron como log₁₀ de copias del genoma/ μ l de reacción. Se consideraron aceptables aquellos ensayos que arrojaron valores entre 90-110% para la eficiencia de la reacción (Bustin et al., 2009). El gen de la β -actina se amplificó como control interno utilizando los cebadores descritos por Chen y col. y siguiendo las mismas condiciones de reacción previamente mencionadas (Y. P. Chen et al., 2006).

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Step One (Applied Biosystems) bajo el siguiente perfil térmico: 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos 95°C, 1 minuto de 60°C y una curva de melting de 65°C a 95°C aumentando 0,5°C cada 5 segundos.

Cebador	Gen blanco	Secuencia del cebador	Ta (°C)	Amplificó n (pb)
qPan-DWV F	Helicasa	ACGCAACCCCAGGAAT	64	179
qPan-DWV R	Helicasa	GTAGCTAATTTTACCCAATCTTTAAA	61	
β -actina F	Actina	CGTGCCGATAGTATTCTTG	61	271
β -actina R	Actina	CTTCGTCACCAACATAGG	60	

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados en la RT-qPCR para DWV y β -actina.

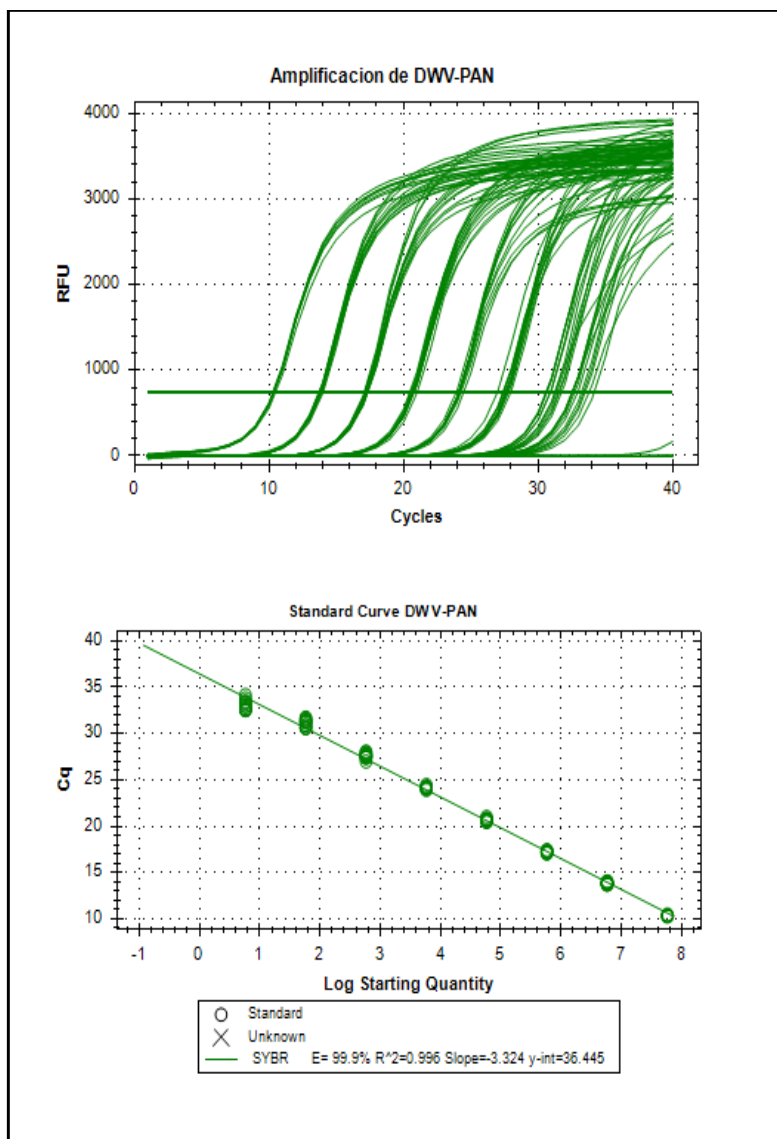


Figura 9: Amplificación de la RT-qPCR PAN. El gráfico superior muestra la amplificación de la curva estándar de 8 puntos entre las concentraciones $5,8 \times 10^7$ a 5,8 copias génicas DWV/ μ l. En el gráfico inferior se muestra la eficiencia de reacción de 99.9% representando el valor de Ct en función de la concentración ($\log_{10}$) del templado control.

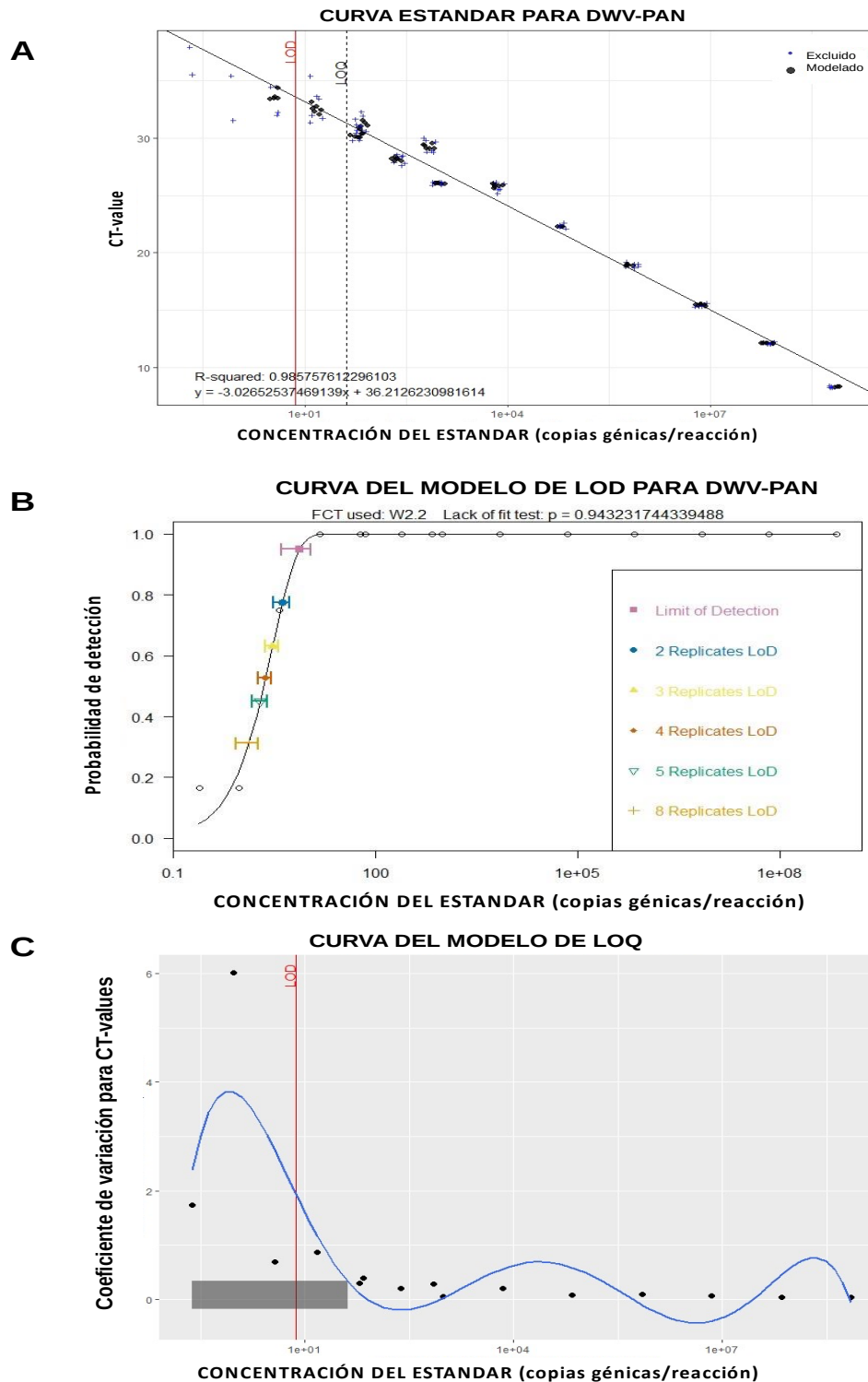


Figura 10: Cálculo del LOD y LOQ para la qPCR-PAN DWV. (A) Curva de la calibración para la identificación de potenciales outliers. (B) Curva del modelo de LOD. Se identifica el LOD AL 95% y los LODs efectivos con los intervalos de confianza para el análisis de múltiples réplicas. Se muestra la función logarítmica empleada para determinar el LOD y el p-valor correspondiente. (C) Curva del modelo de LOQ generada con los CVs de los valores de Ct para cada estándar. El LOQ está representado por el límite derecho del rectángulo gris que interseca la curva. También se muestra el LOD como una línea vertical.

2.4 Aislamiento viral

2.4.1 Amplificación viral *in vivo*

Se utilizó la metodología de amplificación viral "*in vivo*" descrita por Miranda y col., con modificaciones detalladas en el siguiente párrafo (De Miranda et al., 2013).

Se seleccionaron muestras positivas para DWV provenientes de colonias con abejas presentando síntomas asociados a la enfermedad (abejas con alas deformadas) y sin síntomas. Las pupas utilizadas para la amplificación viral se extrajeron de un marco de cría, de una colmena con ausencia de los siguientes virus: DWV, BQCV, ABPV, CBPV, KBV, IABPV y SBV, los virus se detectaron mediante RT-qPCR usando los cebadores descritos por (Locke et al., 2012) (Anexo). Se extrajeron con pinzas, levantando con cuidado la pupa fuera de su celda. Luego fueron colocadas en una placa de Petri de vidrio que contenía un papel de filtro circular humedecido con agua estéril.

Se realizaron inoculaciones con jeringa Hamilton (10µl) en pupas de estadio de ojos blanco, insertando la aguja entre el 4° y 5° tegumento del abdomen e inyectando 5 µl de suspensión de virus conteniendo $2,10 \times 10^7$ copias génicas/pupa para la muestra asintomática y $4,85 \times 10^7$ copias génicas/pupa para la muestra con alas deformadas. Luego, fueron mantenidas en placas de cultivo celular de 24 pocillos a 30°C y 60% de humedad. Se las observó cada 24hs y a los 7 días post-inoculación se congeló la placa a -80 °C para su posterior procesamiento y purificación viral.

2.4.2 Purificación viral

Se realizó la purificación de los virus amplificados "*in vivo*", mediante gradientes continuos de sacarosa y ultracentrifugación (Pega et al., 2013). Se utilizaron 24 pupas previamente inyectadas con cada tipo de muestra. Las mismas se maceraron en 5 ml de buffer NET (NaCl 0.1 M, EDTA 0.004 M, Tris 0.05 M, pH 8.0), se centrifugaron durante 45 minutos a $3645 \times g$ a 4°C, y se cosechó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con cloroformo centrifugando durante 5 min a $405 \times g$ y cosechando el sobrenadante en cada lavado. Se realizó una disgregación con 0.5 ml de sarkosyl 6% cada 2 ml de sobrenadante y se mantuvo la solución a 4°C por 15 minutos. A continuación, se sembró la suspensión viral en un gradiente continuo de sacarosa (15 a 41.25%) y se sometió a ultracentrifugación a 28000 rpm durante 3 hs a 4°C en rotor Beckman 28.38. Finalmente, se cosechó el gradiente conteniendo la suspensión viral en microplacas de 96 pocillos mediante bomba peristáltica con un flujo de 1.12 ml/min. Los eluatos se enumeraron correlativamente desde el de mayor densidad y se realizó una lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro de placa

(BiotekSynergy HT). Posteriormente se mantuvieron almacenados a -80°C. Los virus purificados se cuantificaron mediante RT-qPCR.

2.4.3 Preservación del material conteniendo virus.

Se resguardaron todos los materiales utilizados para la amplificación viral, que incluían abejas, pupas, sobrenadantes de macerados, y semillas madres (pasaje “*in vivo*”), así como los virus purificados. Estos elementos fueron depositados en el cepario del Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas. Para garantizar un adecuado seguimiento, se realizó un registro detallado que especificaba el tipo de muestra, el virus presente, la carga viral, y el origen de las muestras, que incluía el apiario, la región, y si provenían de casos con sintomatología o no.

2.5 Caracterización de variantes del DWV mediante secuenciación

2.5.1 Secuenciación por Sanger

De las muestras recolectadas en los apiarios de Entre Ríos, se seleccionaron aquellas provenientes de abejas, cría, *Varroa destructor* y polen. Además, se incluyeron muestras de colmenares sedentarios de la provincia de Buenos Aires, que habían sido previamente analizadas en nuestro laboratorio e identificadas como positivas para el DWV. Estas muestras se incorporaron para aumentar el número de secuencias obtenidas de Argentina. Las muestras elegidas se amplificaron mediante RT-nPCR utilizando los cebadores previamente descritos por Ryabov y col. (Moore et al., 2011; Ryabov et al., 2014) que amplifican un fragmento común dentro de la región codificante de la proteína helicasa de 2000 pb y, en la segunda ronda de PCR, un fragmento de 1600 pb en secuencias de subtipos DWV-A o en 1400 pb para subtipos DWV-B (Tabla 6).

La síntesis de ADNc se realizó como se mencionó anteriormente. Todas las PCR anidadas se llevaron a cabo utilizando la enzima Gotaq G2 DNA polimerasa (Promega) siguiendo las condiciones de reacción descriptas en el Anexo (I.C) PCR-Helicasa DWV.

Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa 1%. Las muestras que presentaron la banda del tamaño esperado se seleccionaron para su purificación y secuenciación mediante el método de terminación de la cadena de didesoxinucleótidos (SANGER) utilizando los servicios de MacroGen-Korea.

Cebador	Gen blanco	Secuencia del cebador	T _m (°C)	Amplificación (pb)
DWV 155 F	Helicasa	CAGTAGCTTGGGCGATTGTTTCG	68	2000
DWV 156 R	Helicasa	CGCGCTTAACACACGCAAATTAT C	67	2000
DWV 151 F-A	Helicasa	CTGTAGTCAAGCGGTTACTTGAG	64	1600
DWV 152 F-B	Helicasa	CTGTAGTTAAGCGGTTATTAGAA	65	1400
DWV 153 R-A	Helicasa	CTTGAGCTTGAGGCTCTACA	55	1600
DWV 154 R-B	Helicasa	CTGAAGTACTAATCTCTGAG	59	1400

Tabla 6: Oligonucleótidos usados en la RT-nPCR para caracterización de subtipos.

2.5.2 Secuenciación de genomas completos.

Para la secuenciación de genomas completos, se utilizaron los virus purificados descritos en el apartado 2.4.2. Estos virus fueron obtenidos a partir de la amplificación viral en pupa, utilizando macerados de abejas tanto asintomáticas como sintomáticas para el DWV. A partir de las partículas virales purificadas, se procedió a la extracción del ARN viral utilizando un kit comercial. La integridad del ARN fue evaluada mediante microelectroforesis (Bioanalyzer 2100, Agilent) y el ARN fue tratado previo a la secuenciación con el kit Ribo-Zero Gold rRNA Removal (Epicentre, Illumina) para eliminar trazas de rRNA que puedan interferir con la técnica.

La síntesis de ADNc de doble cadena se realizó mediante cebado aleatorio con hexámeros seguido de la preparación de la biblioteca de secuenciación de acuerdo con el protocolo TruSeq™ RNA Kit v2 (Illumina, US). La biblioteca de secuenciación se trató con reactivo de bloqueo del adaptador libre de acuerdo con las instrucciones del fabricante para realizar una secuenciación de lecturas de extremos emparejados (2x150 pb), en un equipo Illumina Novaseq 6000 de la Unidad de Genómica (INTA, IABIMO-CONICET).

Las lecturas sin procesar se sometieron a un recorte de calidad (puntuación de calidad (Q) media > 30) y a la eliminación de adaptadores utilizando el paquete BMap v35.85 (BMap-sourceforge.net/projects/bbmap/); se descartaron las lecturas con una longitud mínima de 50 nucleótidos (nt).

El ensamblado de novo de las lecturas limpias se realizó utilizando rnaSPAdes v3.15.5 (Bushmanova et al., 2019) empleando parámetros predeterminados. Los contigs de origen viral se identificaron con Viral verify y la integridad de los nucleótidos se evaluó con el módulo Viral complete (Antipov et al., 2020). Los genomas completos identificados fueron sometidos a una búsqueda BLASTn contra las secuencias de nucleótidos no

redundantes (nr) del NCBI(Pruitt, et al 2004) y las secuencias de aminoácidos reportadas para *Picornavirus* en UniProt (Bateman et al., 2023). Para corroborar la identidad de los genomas en bases de datos curadas. Los marcos de lectura abiertos (ORF) y los dominios de proteínas funcionales se anotaron utilizando Prokka v1.14.5 (Seemann, 2014). Además, se utilizó el programa Simplot para analizar gráficamente similitud entre genomas completos, mediante el modelo de Kimura 2 parámetros a fin de determinar la distancia genética entre dos o más secuencias (Samson et al., 2022).

2.5.3 Análisis filogenético

Para el análisis filogenético, se construyeron conjuntos de datos que incluyeron genomas completos del DWV reportados hasta el momento. Estas secuencias se seleccionaron a partir de los aislados más relevantes identificados mediante la herramienta de búsqueda BLAST en el sitio web del NCBI. Se utilizaron un total de 95 secuencias de DWV para formar el conjunto de datos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Anexo III). Luego, se realizaron y editaron múltiples alineaciones de secuencias basadas en 1600 nucleótidos para la región codificante de la proteína helicasa y la región codificante al marco de lectura abierto (ORF) para el análisis de genomas completos, usando Muscle disponible en AliView v1.16 (Larsson, 2014). Antes de realizar el análisis filogenético, se llevó a cabo un análisis de calidad del conjunto de datos. La información filogenética se estimó en IQ-Tree(Nguyen et al., 2015) y la prueba de recombinación PHI se realizó en Split-Tree4(Huson, 1997). Los análisis evolutivos filogenéticos y moleculares se realizaron utilizando MEGA versión X (Kumar et al., 2018). Se realizó el método Neighbor-Joining (NJ)(Saitou2 & Nei, 1987). El modelo evolutivo seleccionado en base al Criterio de Información Bayesiano (BIC) fue Tamura-Nei (TN93) incluyendo una distribución Gamma discreta (+G) con 5 categorías de tasas y asumiendo que una cierta fracción de sitios son evolutivamente invariables (+I), modelo TN93+G+I para la región de la helicasa y modelo GTR+G+I. para los genomas completos modelo Los soportes de las ramas se estimaron utilizando el método bootstrap incluyendo 1000 pseudo-replicas. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 95 % de cobertura del sitio, es decir, se permitieron menos del 5 % de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición (opción de eliminación parcial = 95 %).

2.6 Detección de variantes del DWV

Se diseñaron dos pruebas de RT-qPCR utilizando la metodología de sondas hidrolizables. Para ello, se realizó un alineamiento múltiple incluyendo las cepas del DWV presente en bases de datos curadas, utilizando las herramientas de búsqueda de BLAST, en el sitio web de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Un total de 36 secuencias de genomas completos del DWV (incluyendo todas las variantes descritas hasta el momento) (Anexo III) se alinearon con el uso de editores para alineamientos múltiples como Clustal Omega incluidos en el programa AliView v1.16 (Larsson, 2014). El alineamiento obtenido permitió seleccionar tres regiones para el diseño de cebadores y sondas diferenciando la variante A de la variante B y las recombinantes descritas (B/REC).

2.6.1 Controles positivos para RT-qPCR variantes

Se utilizaron controles positivos sintéticos para las variantes DWV A y DWV B/C en formato de ultrámeros (IDT- Integrated DNA Technologies) para los dos formatos de PCR diseñadas (Tabla 7). Se realizó este procedimiento ya que el laboratorio no cuenta con muestras positivas para las variantes DWV B/C. Todos los ultrámeros se resuspendieron en agua calidad molecular (Sigma) y fueron conservados a -80° hasta su uso.

Control positivo	PCR	Secuencia del ultrámero	Secuencia Referencia	Posición (pb)
DWV A	PCR 1	AATATCACTTGGCGACGCAACCC CAGGAATCCGCCAGTTCAAGTAC TGTTATATCTGCCGTTCCAGAAG CTCCCAATGCTGAAGCGGAGGA GGCAAGTGCTTGGGTATCCATTA TTTATAATGGTGTGTGTAATATGC TTAATGTGGCTGCTCAAAAACCG AAACAATTTAAAGATTGGG	>MG83120 4.1	4984- 5164
DWV B/REC	PCR 1	AATATCACTTGGCGACGCAACCC CAGGAATCCGCCAATTCAGGTAC GGTTATTTCCGCTATTCCAGAAG CACCCAATGCTGAAGCAGAGGA GGCCAGTGCCTGGGTATCCATTA TTTATAATGGTGTGTGTAATATGT	NC_00649 4.1	4984- 5164

		TGAATGTAGCCGCTCAAAAACCG AAACAATTTAAAGATTGGGT		
DWV A	PCR 2	GCAGGCAAAACCAGAGATGGATA ACCCTAATCCAGGACCTGATGGC GAGGGTGAAGTTGAACTAGAAAA GGATAGTAATGTTGTTTAAACAAC TCAGCGAGATCCTAGTACATCTA TTCCAGCGCCGGT	>gb MF770 715	1824- 1953
DWV B/REC	PCR 2	CGTTGAACAGAAAATTGAGGGAA CCAATCCAATTTCTTTGTATTGGT TTGCTCCGTTGGAGTCGTATCT AGTATGTTTATGCAATGGAGAGG TTCTTTAGAATATAGATTTGATAT TATAGCTTCCCAATTCATACGG GTAGGTTAATTGTAGGTTATGTTC CTGGACTGACTGCTTCTTTA	>ref NC_00 6494	2925- 3108

Tabla 7: Secuencias de los controles positivos para las qPCR subtipos de DWV.

2.6.2 Diseño experimental de RT-qPCR variantes DWV

PCR 1:

La primera estrategia de detección del DWV se basó en un formato multiplex. Para ello, se diseñó un único set de cebadores (ida/vuelta) que permite amplificar un fragmento de 180 pb dentro de la región codificante a la proteína no estructural helicasa (4984nt-5164nt) en todas las variantes del DWV (Tabla 8). La diferenciación de las variantes se realiza utilizando 2 sondas marcadas con diferentes fluorocromos, siendo una sonda específica para la variante DWV-A (FAM) y otra para DWV B/REC (HEX).

PCR 2:

En la segunda estrategia se propuso un formato uniplex, empleando PCRs separadas (uniplex) para la detección de las variantes. Para ello, se diseñaron 2 set de cebadores (ida/vuelta) que amplifican fragmentos específicos para cada variante, de tal manera que la misma muestra es sometida a 2 reacciones. También se diseñaron sondas marcadas específicas para DWV-A (FAM) y DWV B/REC (FAM) (Figura 11).

Para la PCR de la variante DWV-A, el set de cebadores amplifica una región de 128 pb codificantes para la proteína estructural VP2 (1824nt-1873nt), el diseño de la sonda se extiende desde el nucleótido 1857 hasta 1878 (Tabla 6).

Para la variante DWV-B/C se diseñó un set de cebadores que amplifica un fragmento de 183 pb que se encuentra dentro de la región codificante para la proteína

VP1 (2925 nt-3108 nt); la sonda marcada se ubica entre los nucleótidos 2974-2994 (Tabla 8).

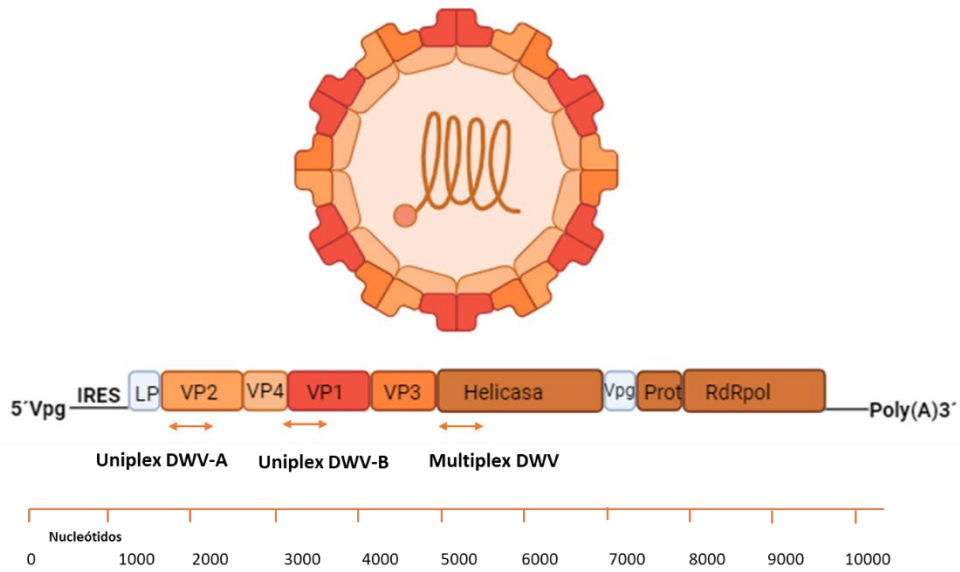


Figura 11: Esquema del genoma de DWV identificando las proteínas estructurales y no estructurales del virus. En color azul se identifican las regiones seleccionadas para el diseño de cebadores específicos RT-qPCR variantes DWV A y DWV B/REC, las fechas en rojo indican la ubicación donde amplifican cada PCR.

PCR	Cebador	Subtipo DWV	Secuencia	Tm (C°)	Tamaño del Amplicón
PCR 1	qV DWV F	A-B/REC	5´AATATCACTTGGCG ACGCAAC3´	65	180
	qV DWV R	A-B/REC	5´ACCCAATCTTTAAA TTGTTTCGG3´	61	
	Sonda DWV A	A-B/REC	5´ FAM- CCACATTAAGCATAT TACACAC - 3´ MGB	67	
	Sonda DWV B/REC	A-B/REC	5´ HEX- CTACATTCAACATATT ACACACA- 3´ MGB	66	
PCR 2	DWV A-F	A	5´-GCA GGC AAA ACC AGA GAT G-3´	67	128
	DWV A-R	A	5´- ACC GGC GCT GGA ATA GAT-3´	63	
	Sonda A	A	5´FAM- AGGACCTGATGGYG AGGGTGAA-3´BHQ1	69	
PCR 3	DWV B/REC-F	B/REC	5´- CGTTGAACAGAAAAT TGAGG-3´	57	183

	DWV B/REC-R	B/REC	5'TAARGAAGCAGTCA GTCCAG-3'	59	
	Sonda B/REC	B/REC	5' FAM- TGCTCCGGTYGGAGT CGTATCTA-3' BHQ1	66	

Tabla 8: Oligonucleótidos y sondas marcadas diseñados para la detección de subtipos de DWV.

Para comenzar la estandarización de las PCR propuestas se realizaron ensayos para evaluar la eficiencia de los cebadores y sondas diseñadas, probando diferentes concentraciones de ambos reactivos desde 100nM hasta 800nM. Para cada reacción se utilizó la mezcla real 2X iTaq universal Probe-Bio Rad utilizando los ultrámeros diseñados como control positivo para cada PCR.

Así mismo, se definió el perfil térmico óptimo, evaluando ciclados de dos o tres pasos incluyendo ensayos de gradientes de temperatura entre 55°C y 60°C para determinar la mejor temperatura de hibridación de cebadores y sondas.

La eficiencia de cada PCR se calculó con una curva estándar, usando los ultrámeros las variantes DWV A y DWV B/REC, para cada PCR, en concentraciones conocidas del control (5×10^6 a 5×10^2 copias génicas/ μ l). Las amplificaciones se realizaron utilizando los equipos CFX96 real time System C1000 touch Thermalcycler-Bio Rad y Step One Applied biosystems. Se seleccionaron las condiciones de reacción que generaron la mejor eficiencia.

Una vez definida las concentraciones óptimas de cebadores y sondas se evaluó la especificidad analítica utilizando muestras de abejas positivas para DWV previamente detectadas por la qPCR PAN descrita en el apartado 2.3.4. Así mismo, se utilizaron muestras positivas a otros virus (ej: BQCV, ABPV, CBPV) y muestras negativas a DWV.

2.7 Análisis estadístico

Inicialmente se llevaron a cabo dos metodologías descriptivas, un análisis de componentes principales (PCA) para comparar el peso relativo de las diferentes variables cuantitativas y una prueba de chi-cuadrado para comparar variables categóricas como la prevalencia puntual de DWV, la presencia de *Nosema spp.* y *Varroa destructor*, nutrición, suplemento dietético y categoría de colmena (según el tamaño de la población).

Posteriormente, las variables que mostraron diferencias significativas entre colonias migratorias y estacionarias fueron incluidas en la construcción de un modelo de efectos mixtos lineales generalizados (GLMM). Este modelo se empleó para investigar el impacto de cada variable, incluyendo el número de cuadros de abejas

adultas (FOB), el nivel de infección por *Nosema spp.* y la carga viral de DWV. Los modelos fueron comparados mediante ANOVA y se consideró el Criterio de Información de Akaike (AIC) como un criterio adicional para la selección.

Finalmente, para evaluar el riesgo de la variable que presentó diferencias significativas en el modelo anterior, se llevó a cabo otro modelo de efectos mixtos lineales generalizados (GLMM). El análisis se realizó considerando el manejo migratorio en cada momento de muestreo (inicio y fin de la temporada).

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat (Versión 2020). Las Figuras 19 A y B se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 10.1.

Capítulo 3



3 RESULTADOS

3.1 Manejo de los apiarios

Los apiarios con manejo migratorio o estacionario no registraron pérdidas de colmenas y no ocurrió ningún desastre climático que hubiera afectado la producción de miel durante los periodos de muestreo realizados en este trabajo de tesis (septiembre 2018- marzo 2019).

Los apiarios migratorios se caracterizaron por estar ubicados en zonas donde predomina el monocultivo, iniciando la temporada con la floración de cítricos. (septiembre-noviembre). Al cierre de la floración, las colonias fueron trasladadas a bosques nativos en busca de floración silvestre. 4 apiarios fueron migrados 106-189 km al norte del lugar de origen (localidades de Feliciano y Bompland, Corrientes), mientras que 5 apiarios se trasladaron 320 km hacia el sur (localidad de Nogoya), ubicándose a 60 km de los apiarios estacionarios durante el periodo de diciembre-febrero. El último movimiento realizado por los apiarios migratorios fue retornar al punto de origen (Villa del Rosario) para el monocultivo de *Eucalyptus grandis* a partir de los primeros días de febrero y finalmente permanecer en la zona para la invernada de las colonias (Figura 12).

Durante la temporada de trabajo los apicultores aplicaron rigurosamente los tratamientos contra el ácaro *Varroa destructor*. Los colmenares estacionarios realizaron dos tratamientos, al inicio y al final de la temporada, mientras que los colmenares trashumantes aplicaron los tratamientos en cada operación migratoria. Todas las colmenas recibieron el mismo suplemento dietético al principio y al final de la temporada, consistente en torta de polen y jarabe de azúcar. Además, el reemplazo de reinas se realizó anualmente, en octubre, en todas las colmenas, sin importar el tipo de manejo (Tabla 9).

La georreferenciación de los apiarios migratorios y estacionarios durante la temporada del 2018-2019 se indican en el Anexo IV.

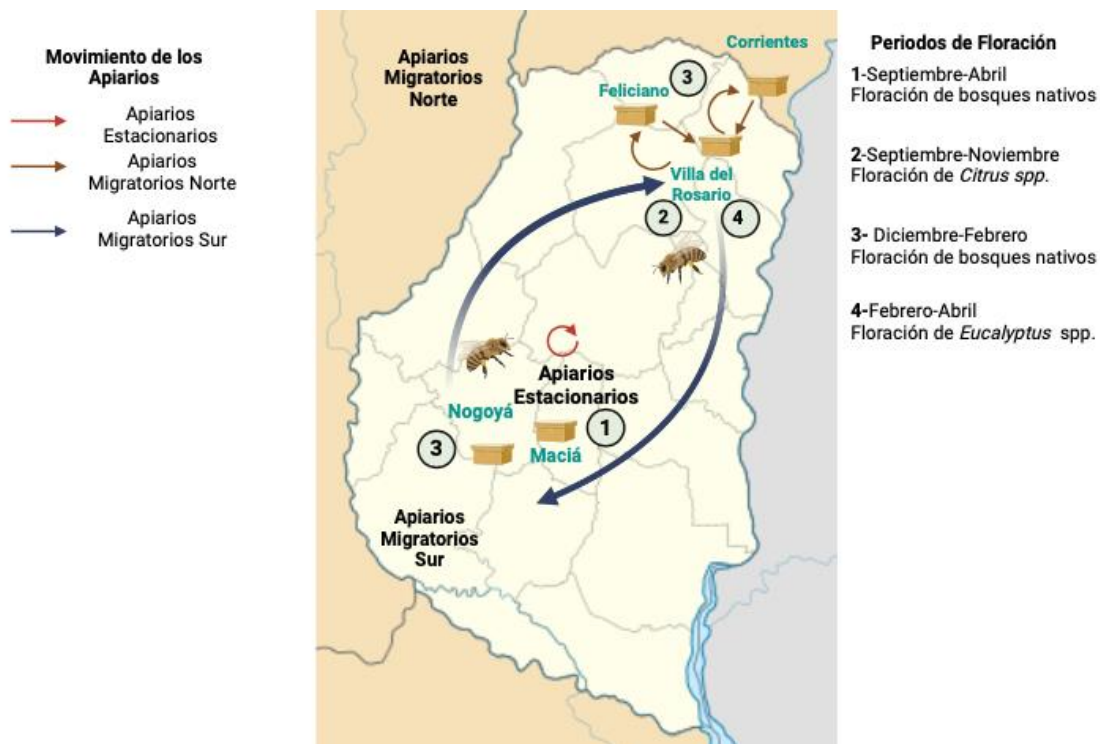


Figura 12: Esquema del movimiento de las colmenas y su ubicación geográfica dentro de la provincia de Entre Ríos. Representación del movimiento que realizan los apicultores con actividad migratoria y la ubicación permanente de apiarios estacionarios durante toda la temporada en zonas poliforales (flecha roja). Las colmenas migratorias inician la temporada ubicada en Villa del Rosario. En diciembre migran hacia el norte (flechas marrones) o hacia el sur (flechas azules) para la floración de bosques nativos. A partir del mes de febrero retornan al punto de origen (Villa del Rosario) para la floración del eucalipto. Figura realizada con Biorender.com.

3.2 Categorización de colmenas

El tamaño de la población de la colonia se utilizó como indicador de la salud de la colmena y se monitoreó en cada evento de muestreo. En consecuencia, las colonias se clasificaron en 3 categorías (C1, C2 y C3). Se analizaron en total 66 colmenas de apiarios estacionarios y 79 de apiarios migratorios.

Durante el inicio de la temporada se muestrearon 34 colmenas estacionarias, clasificándose el 91,2% (31/34) de las mismas en la categoría C1 y el 8,8% (3/34) en la categoría C2. Por otro lado, de las 32 colmenas estacionarias analizadas al final de la temporada, el 65,6% (21/32) pertenecía a la categoría C1, el 9,4% (3/32) a la categoría C2, y el 25% (8/32) a la categoría C3. En el primer muestreo de apiarios migratorios se analizaron 29 colmenas, identificándose el 62,1% (18/29) como colonias de categoría C1 y el 37,9% (11/29) en categoría C3. Al final de la temporada, las colmenas se clasificaron en la siguiente proporción: 50% (25/50) en la categoría C1, 24% (12/50) en la categoría C2 y 26% (13/50) en la categoría C3 (Tabla 7, Figura 13).

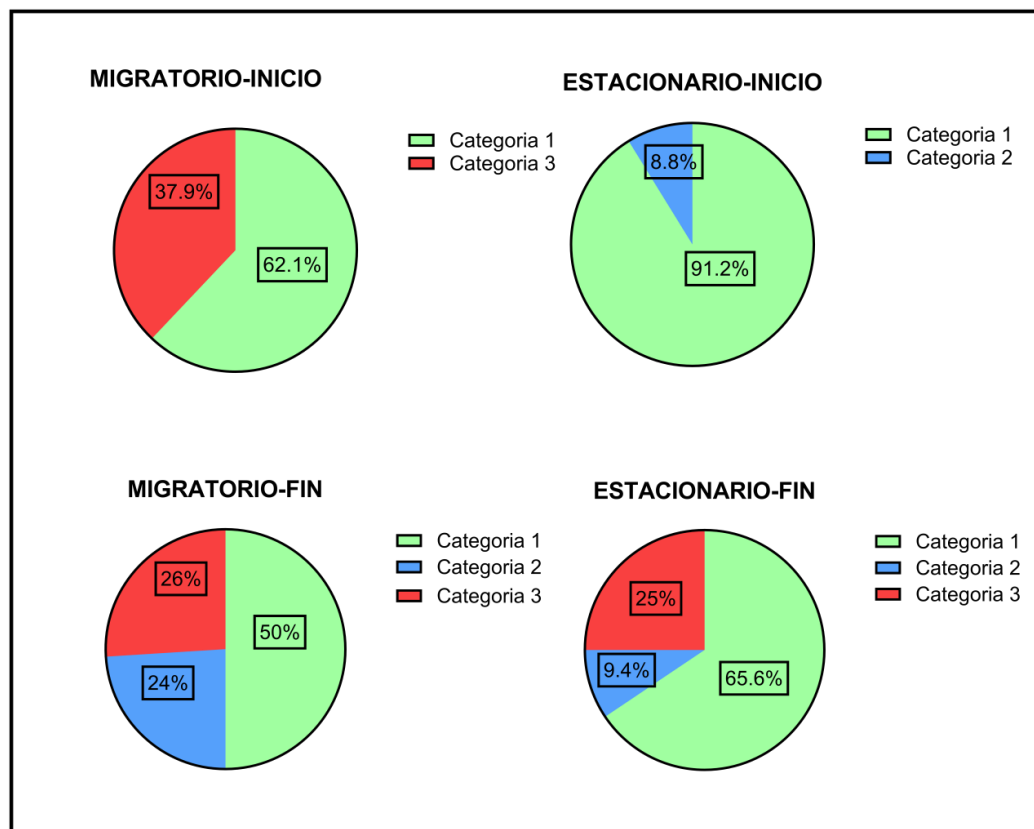


Figura 13: Categorización de colmenas. Los gráficos de torta representan el porcentaje de colmenas en categoría 1 (verde), indicando un nivel de fortaleza fuerte, categoría 2 (azul) nivel de fortaleza medio y categoría 3 (rojo) nivel de fortaleza débil para los apiarios estacionarios y migratorios durante los muestreos realizados en inicio y fin de temporada.

A lo largo de este estudio, las colonias monitoreadas no mostraron signos clínicos asociados con patógenos conocidos. Sin embargo, en 2 colmenas con manejo migratorio se observaron abejas adultas con alas deformadas en los marcos de cría, al inicio de la temporada (Figura 14).

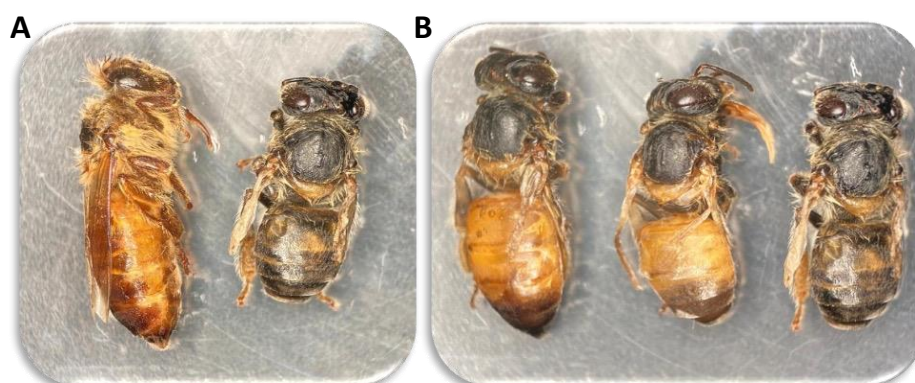


Figura 14: Abejas presentando malformaciones en las alas. Fotografía A: Abeja asintomática para el Virus de alas deformada (izquierda) junto a otro ejemplar presentando alas malformadas. Fotografía B: Abejas con alas deformadas de la misma colonia, presentando reducción en su tamaño, pérdida de vello y cambio de pigmentación. Las muestras fueron recolectadas durante el inicio de la temporada en colonias migratorias.

Muestreo	Variables	Apiarios Estacionarios	Apiarios Migratorios
INICIO DE TEMPORADA	N°Colmenas/ N° Apiarios	34/6	29/5
	Categoría de colmenas	C1: 31 colmenas; C2: 3 colmenas C3:0 colmena.	C1: 18 colmenas; C2: 0 colmena; C3: 11 colmenas.
	Tratamiento contra <i>V. destructor</i> recibidos	1	1 por cada movimiento migratorio*
	Tratamiento contra <i>Nosema spp.</i> recibidos	NO	NO
	Recambio de reinas	SI	SI
	Suplemento dietario	Torta de polen y jarabe de azúcar	Torta de polen y jarabe de azúcar
	Tipo de floración	Bosque nativo	<i>Citrus spp</i>
FIN DE TEMPORADA	N° Colmenas/ N° Apiarios	32/6	50/9
	Categoría de colmenas	C1: 21 colmenas; C2: 3 colmenas; C3:8 colmenas	C1: 25 colmenas; C2: 12 colmenas; C3:13 colmenas
	Tratamiento contra <i>V. destructor</i> recibidos	1	1 por cada momento migratorio*
	Tratamiento contra <i>Nosema spp.</i> recibidos	NO	NO
	Recambio de reinas	NO	NO
	Suplemento dietario	Torta de polen y jarabe de azúcar.	Torta de polen y jarabe de azúcar.
	Tipo de floración	Bosque nativo	<i>Eucaliptus grandis</i>

Tabla 9: Descripción del manejo en apiarios estacionarios y migratorios durante toda la temporada (septiembre 2018-marzo 2019). Los apiarios migratorios durante este trabajo realizaron 3 tratamientos contra el ácaro *V. destructor* coincidiendo en cada operación migratoria (septiembre, diciembre y marzo).

3.3 Diagnóstico de *V. destructor* y *Nosema spp*

En cada evento de muestreo, se obtuvieron abejas melíferas para evaluar los niveles de infestación del ácaro *Varroa destructor* y la presencia del parásito microsporium *Nosema spp.*

En todos los apiarios analizados los niveles de *Nosema spp.* estuvieron por debajo del umbral de tratamiento recomendado (1.000.000 de esporas/ml), a pesar de ello, las colonias sedentarias mostraron niveles de *Nosema spp.* más bajos que las colonias migratorias, tanto al inicio como al final de la temporada (Anexo VI).

En cuanto al análisis de *V. destructor*, los niveles de infestación también estuvieron por debajo del umbral (3%) recomendado para la aplicación del tratamiento en casi todas las muestras. Sólo 2 colonias sedentarias y 2 migratorias presentaron niveles ligeramente superiores al 3% al final de la temporada (Figura 15).

Los bajos niveles de infestación de ácaros observados (previo al tratamiento contra *Varroa destructor*), se debieron al tratamiento riguroso y sincrónico contra el ácaro que los apicultores aplicaron a sus colonias en la zona de estudio (Tabla 9).

También se evaluó la presencia del ácaro en su estado reproductivo mediante muestreos en cría, cuando fue posible. Al analizar la cría operculada se encontraron ácaros parasitando la cría en apiarios con ambos tipos de manejo (Figura 16). Los individuos se agruparon para análisis adicionales separando un total de 54 pooles de cría parasitada, 45 pooles de cría no parasitada y 51 pooles de *Varroa destructor* a partir de colmenas migratorias. Para las colmenas estacionarias se procesaron un total de 16 pooles de cría parasitada, 18 pooles de cría no parasitada y 16 pooles de *V. destructor* (Anexo VII).

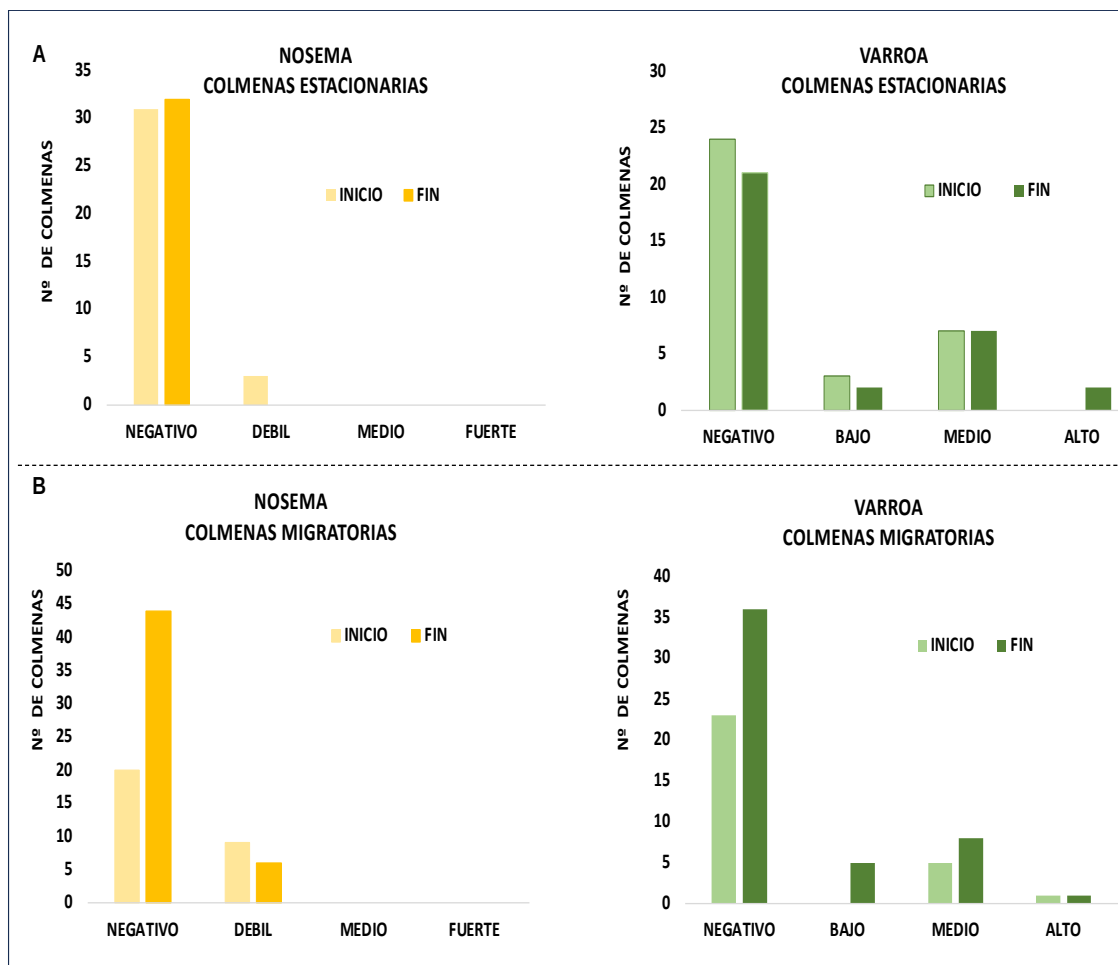


Figura 15: Detección de *Nosema spp* y *V. destructor* en estadio forético. Los gráficos de barra en color amarillo representan el número de colmenas en función del recuento de esporas/ml. El nivel de infestación con *V. destructor* se indica en los gráficos de color verde. En la figura A se representan los resultados obtenidos para las colmenas estacionarias durante inicio (amarillo claro y verde claro) y en fin de temporada (amarillo fuerte y verde fuerte); y en la Figura B las colmenas migratorias durante inicio (color amarillo y verde claro) y fin de temporada (color amarillo y verde fuerte).

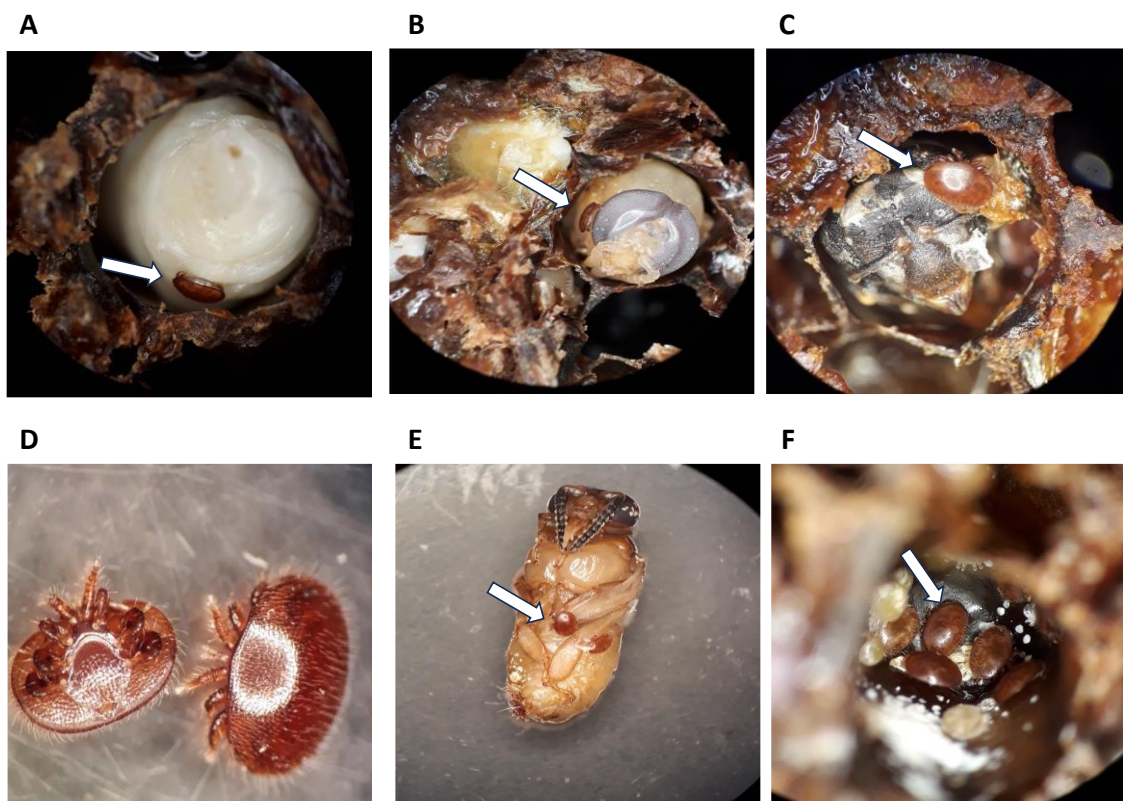


Figura 16: Fotografías de cría de *Apis mellifera* en distintas etapas del desarrollo parasitadas por *Varroa destructor*. A: larva; B: pupa; C: abeja; D: *Varroa destructor* (hembras adultas); E: pupa extraída de la celda con 2 ácaros; F: celda donde se extrajo la pupa E conteniendo 8 ácaros en su interior. Todas las muestras fueron visualizadas utilizando una lupa Olympus con un aumento del 4x.

3.4 Identificación de polen

Las muestras extraídas de pan de polen, permitieron identificar los recursos florales de los que se beneficiaban las colonias al momento de cada muestreo en ambos tipos de manejo. En los apiarios estacionarios, las especies más abundantes encontradas en el pan de abeja fueron las nativas. Al comienzo de la temporada, los recursos disponibles procedían de árboles o arbustos nativos (ej.: *Schinus sp*, *Celtis sp*) exóticos (ej.: *Gleditsia sp*, *Melia azedarach*), o adventicios (ej.: *Trifolium repens*, *Brassicaceae*) y herbáceos cultivados (ej.: *Vicia sp*). Al final de la temporada, el polen encontrado perteneció principalmente a especies nativas como la palmera *Trithrinax campestris*, arbustos (*Baccharis*), o hierbas (*Senecio sp.*, *Grindelia*, *Bidens*) y en menor medida a forrajes cultivados como la alfalfa (*Medicago sativa*).

Para los apiarios migratorios, al inicio de la temporada, el recurso más abundante provino de los *Citrus spp.*, con un menor aporte de plantas nativas, tanto herbáceas (*Senecio sp* y *Cyperus*) como arbóreas (ej.: *T. Myrcianthes cisplatensis*). Sin embargo, al final de la temporada, las plantaciones de *Eucalyptus spp.* proporcionaron el principal recurso floral a las colonias ubicadas en esas zonas y, en menor medida, también hubo

aportes de especies nativas como *Baccharis* y *Trithrinax campestris* (Figura 17 y Anexo VIII).

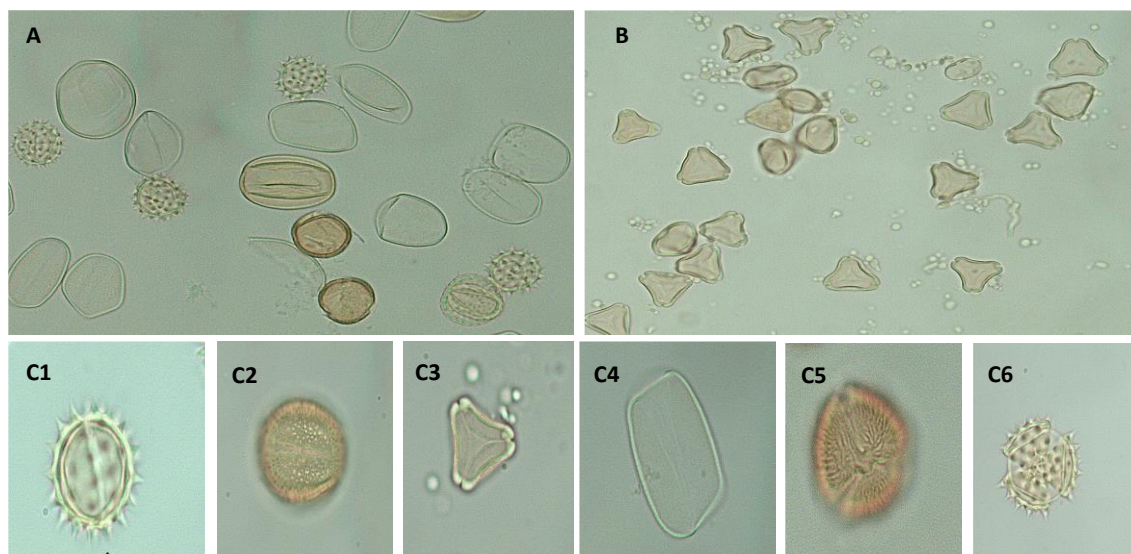


Figura 17: Identificación de polen al microscopio. Fotografía A: muestra de polen extraída de pan de polen de zonas polifloral; Fotografía B: muestra de pan de polen de zona monofloral; Fotografía C1: polen de *Baccharis* sp; Fotografía C2: polen de *Citrus* sp; Fotografía C3: polen de *Eucalyptus grandis*; Fotografía C4: polen de *Trithrinax campestris*; Fotografía C5: polen de *Schinus* sp; Fotografía C6: polen de *Senecio* sp.

3.5 Identificación de haplotipos de *Apis mellífera*

Para estimar la variabilidad genética de la población de estudio, se analizaron 48 colmenas de fin de temporada (Tabla 10), y se evaluaron los polimorfismos de la región intergénica correspondiente a los genes Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo Oxidasa II (COII). Se pudo determinar la presencia de dos haplotipos con origen evolutivo típico de Europa central y el Mediterráneo Oriental, pertenecientes a una rama evolutiva C, identificando los haplotipos C1 y C2J en ambos tipos de manejos.

El haplotipo dominante en las colmenas muestreadas es el C1, cuyo origen se encuentra en la península italiana y es característico de la especie *Apis mellífera ligústica*. Por otro lado, el haplotipo C2J es característico de la subespecie *Apis mellífera cárnica* encontrándose su lugar de origen al sur de Alemania y países vecinos. Una única muestra proveniente de zonas migratorias (apiario V6-4, Villa del Rosario) fue identificada con un haplotipo africanizado A4, es muy probable que esta colonia provenga de una colmena silvestre, durante fin de la temporada, ya que comúnmente los apicultores recuperan enjambres naturales y los incluye en sus apiarios.

Estos resultados revelan que indistintamente del tipo de manejo migratorio o estacionario, predomina la subespecie *Apis mellífera ligústica*, reflejando que la diversidad genética entre población de abejas de manejo migratorio o estacionario no sería un factor de variabilidad en nuestro estudio.

Manejo	Temporada	Apiario	Haplotipo
Migratorio	Fin	V 1-1	C1
Migratorio	Fin	V 1-2	C1
Migratorio	Fin	V 1-3	C1
Migratorio	Fin	V 1-4	C1
Migratorio	Fin	V 2-1	C1
Migratorio	Fin	V 2-2	C1
Migratorio	Fin	V 2-3	C1
Migratorio	Fin	V 2-4	C1
Migratorio	Fin	V 3-1	C1
Migratorio	Fin	V 3-2	C1
Migratorio	Fin	V 3-3	C1
Migratorio	Fin	V 4-1	C1
Migratorio	Fin	V 4-2	C1
Migratorio	Fin	V 4-3	C1
Migratorio	Fin	V 4-5	C1
Migratorio	Fin	V 5-1	C1
Migratorio	Fin	V 5-2	C1
Migratorio	Fin	V 5-3	C2J
Migratorio	Fin	V 5-4	C1
Migratorio	Fin	V 5-5	C1
Migratorio	Fin	V 5-6	C2J
Migratorio	Fin	V 5-7	C1
Migratorio	Fin	V 5-8	C2J
Migratorio	Fin	V 5-9	C1
Migratorio	Fin	V 6-1	C1
Migratorio	Fin	V 6-2	C1
Migratorio	Fin	V 6-3	C1
Migratorio	Fin	V 6-4	A4
Migratorio	Fin	V 6-5	C2J
Estacionario	Fin	M 2-1	C1
Estacionario	Fin	M 2-2	C1
Estacionario	Fin	M 2-3	C1
Estacionario	Fin	M 2-4	C1
Estacionario	Fin	M 2-5	C1
Estacionario	Fin	M 2-6	C1
Estacionario	Fin	M 3-1	C2J
Estacionario	Fin	M 3-2	C1
Estacionario	Fin	M 3-3	C1
Estacionario	Fin	M 3-4	C1
Estacionario	Fin	M 3-5	C1
Estacionario	Fin	M 3-6	C1

Estacionario	Fin	M 4-1	C1
Estacionario	Fin	M 4-2	C1
Estacionario	Fin	M 4-3	C2J
Estacionario	Fin	M 4-4	C1
Estacionario	Fin	M 4-5	C1
Estacionario	Fin	M 5-1	C1
Estacionario	Fin	M 6-4	C1

Tabla 10: Muestras analizadas para la identificación de haplotipos en colmenas migratorias y estacionarias mediante el uso de PCR-RFLP.

3.6 Prevalencia y abundancia del DWV

La presencia y abundancia de DWV se evaluó mediante RT-qPCR PAN. En este estudio, la prevalencia puntual de DWV se definió como la proporción de colonias que dieron un resultado positivo en cada evento de muestreo, mientras que la abundancia de DWV se refirió a la cantidad de ARN viral cuantificada mediante RT-qPCR PAN. Los límites de detección y cuantificación (LOD, LOQ respectivamente) arrojaron los siguientes valores:

LOD: 7,4 copias génicas/reacción.

LOQ: 41 copias génicas/reacción (Figura 10)

Se detectó DWV en todas las áreas de estudio y en todo tipo de muestras, incluidas abejas adultas, crías, ácaros y polen. Sin embargo, la prevalencia puntual y abundancia de DWV en las colonias de abejas melíferas variaron según la fecha de muestreo y el tipo de manejo realizado por los apicultores. El mayor número de colonias positivas (86,2%; 25/29) se obtuvo de muestras de abejas melíferas con manejo migratorio recolectadas en septiembre, mientras las colonias estaban ubicadas en Villa del Rosario para la floración del monocultivo de *Citrus sp.* Esta fecha de muestreo correspondió al aumento de la población de abejas a principios de la primavera, debido al incremento de la postura de huevos por parte de la reina permitiendo el desarrollo de la colonia. Las cargas virales (CV) en aquellas colonias positivas presentaron una media de 5,25 log₁₀ copias génicas/μl de muestra y alcanzaron un valor máximo de 10,37 log₁₀ copias de copias génicas/μl de muestra. En ese momento, en apiarios estacionarios, el 44,11% (15/34) de las colonias resultaron positivas a la detección de DWV y las muestras positivas presentaron una media de CV de 3,70 log₁₀ copias génicas/μl de muestra.

Inmediatamente después de regresar de la floración nativa, las colonias migratorias mostraron una disminución en el número de colonias positivas, detectando el DWV en el 66% (33/50) de las colonias. Para los apiarios estacionarios solo el 53,12%

(17/32) fueron positivas para el virus. Durante fin de temporada, las colmenas positivas con manejo migratorio presentaron una media de 4,13 log10 copias génicas/él de muestra, mientras que la media de CV fue de 4,41 copias génicas/él de muestra para colonias estacionarias (Tabla 11, Figura 18).

Al analizar las CV medias según la categoría de la colmena no observamos una asociación clara entre cargas virales y el tipo de categoría. Sin embargo, las categorías C3 presentaron valores mayores de CV medias, durante inicio de temporada para colmenas migratorias (6,12 log10 copias génicas/él) y en fin de temporada para estacionarias (6,36 log10 copias génicas/él) (Anexo I-F).

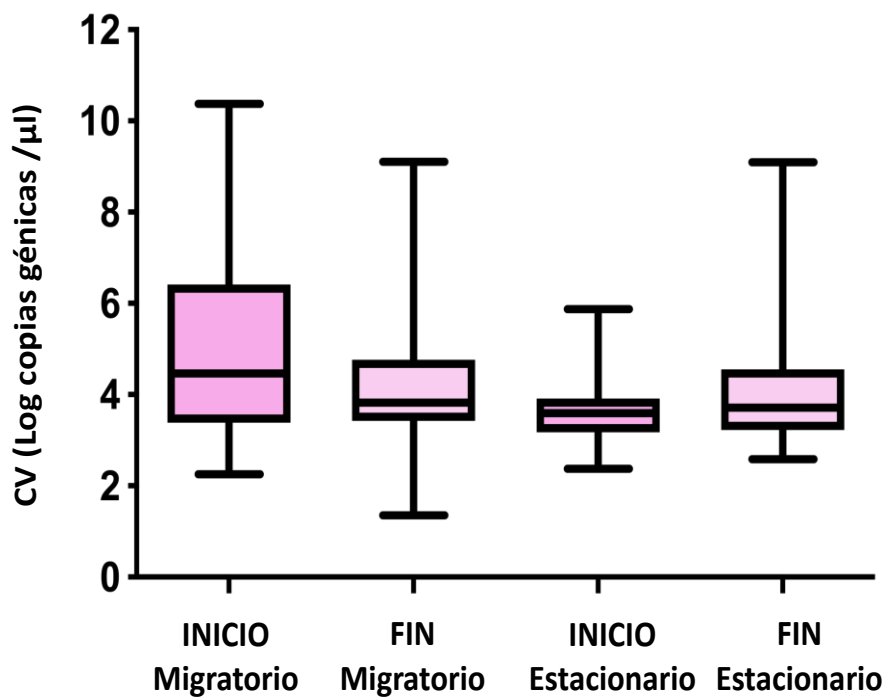


Figura 18: Cuantificación de las cargas virales (CV) del DWV en apiarios migratorios y estacionarios. La CV fue calculada mediante RT-qPCR en colonias migratorias y estacionarias durante el inicio y fin de temporada. CVs fueron expresadas como Log10 copias génicas/él de muestra.

Muestra	Manejo	Temporada	N� colonias positivas	%#	N�Total de colonias	Media CV (log ₁₀ copias génicas/él)
Abejas	Migratorio	Inicio	25	86,2	29	5,25
		Fin	33	66	50	4,13
	Estacionario	Inicio	15	44,1	34	3,70
		Fin	17	53,1	32	4,41

Tabla 11: Detección del DWV por RT-qPCR, según el tipo de manejo y el momento de la toma de muestra. (#): porcentaje de colonias positivas.

También se evaluó la presencia de DWV en la cría. Para ello, las muestras se agruparon y clasificaron en cría parasitada, cría no parasitada y *V. destructor* asociada a cría. Además, se juntaron y examinaron muestras de polen de los marcos de cría.

Al inicio de temporada se detectó un alto porcentaje de muestras positivas en crías parasitadas, crías no parasitadas y *V. destructor* en colmenas migratorias (80,6, 78,3 y 79,3%, respectivamente), sin embargo, para la cría parasitada y no parasitada en colmenas estacionarias se detectó un menor porcentaje de pooles positivos (28,6, 62,5 y 85,7%, respectivamente). Al comparar el número de muestras positivas a lo largo de la temporada, se observó un aumento en el porcentaje de grupos de cría parasitada positivas en colonias estacionarias y migratorias, desde el inicio hasta el final; por otro lado, los valores de cría sin parasitar presentan una disminución en ambos tipos de manejo y el porcentaje de pooles de *V. destructor* a fin de temporada aumenta en migratorios y disminuyó en estacionarios (Tabla 12).

En relación con las muestras de polen obtenidas de los marcos de cría, 13 de 32 muestras resultaron positivas para DWV. Es notorio que se detectó DWV en muestras recolectadas en julio, lo que sugiere que el virus permaneció y/o circuló en las colonias durante la invernada (Tabla 12 y Anexo VIII).

Muestra	Manejo	Temporada	N° Positivos	%	Pooles totales
Cría Parasitada	Estacionario	Inicio	2	28.57	7
		Fin	5	55.56	9
	Migratorio	Inicio	25	80.64	31
		Fin	22	95.65	23
Cría No Parasitada	Estacionario	Inicio	5	62.50	8
		Fin	5	50.0	10
	Migratorio	Inicio	18	78.26	23
		Fin	17	77.27	22
Varroa destructor	Estacionario	Inicio	6	85.71	7
		Fin	7	77.78	9
	Migratorio	Inicio	23	79.31	29
		Fin	19	86.36	22
Polen	Estacionario	Inicio	0	0.0	2
		Fin	2	28.57	7
		Invierno	2	50.0	4
	Migratorio	Inicio	1	25.0	4
		Fin	0	0.0	5
		Invierno	8	80.0	10

Tabla 12: Pooles positivos para el DWV de muestras provenientes de los cuadros cría recolectados durante el inicio y fin de temporada en apiarios con manejo migratorio y estacionario.

3.7 Asociación de presencia del DWV y factores monitoreados

La relación entre el tipo de manejo y diversos factores, incluyendo la prevalencia puntual de DWV, la presencia de otros patógenos, la salud de las colonias, el estado nutricional, la suplementación dietética y el momento del muestreo, fue sometida a un análisis adicional.

Un análisis de componentes principales (PCA), que incorpora variables como el número de cuadros de abejas adultas, la tasa de infestación por *Varroa destructor*, el nivel de infección por *Nosema spp.* y la carga viral de DWV al inicio y al final de la temporada para ambos tipos de manejo, nos permitió evaluar el peso relativo de cada variable en la agrupación de las muestras durante el período de estudio. Los valores propios de los dos componentes principales explicaron el 64,1% y el 67% de la variabilidad total, como se muestra en la Figura 19A y 19B, respectivamente. Las cargas virales de DWV al inicio de la temporada en el manejo migratorio exhibieron la mayor influencia en la dispersión de las colonias en el PCA (Figura 19A, Anexo I-G).

Al inicio de la temporada, el número de muestras positivas para DWV fue significativamente mayor en colonias migratorias que en las estacionarias ($p=0,0005$). También se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de manejo en ese momento al analizar la categoría de la colmena ($p=0,0002$), *Nosema spp.* ($p=0,0252$) y nutrición ($p=0,0551$). Por otro lado, al final de la temporada, *Nosema spp.*, nutrición y suplemento dietético fueron las variables que mostraron diferencias significativas entre colonias migratorias y estacionarias (Tabla 13).

Basándonos en estos hallazgos, se realizó un modelo lineal mixto de efectos generalizados (GLMM) para analizar el impacto de cada variable (número de cuadros de abejas adultas, nivel de infección por *Nosema spp.* y carga viral de DWV) en el manejo en cada momento de muestreo. Se encontró una asociación positiva entre las cargas virales y el manejo migratorio al inicio de la temporada ($p=0,0588$) (Tabla 14).

Finalmente, se llevó a cabo una evaluación del riesgo asociado con la variable que mostró diferencias significativas en el modelo anterior, es decir, la carga viral de DWV en el manejo migratorio al inicio de la temporada. Se encontró que el manejo migratorio aumentó significativamente ($p=0,031$) la probabilidad de tener cargas altas de DWV, con un factor de aumento del 1,98% (Odds Ratio=1,98).

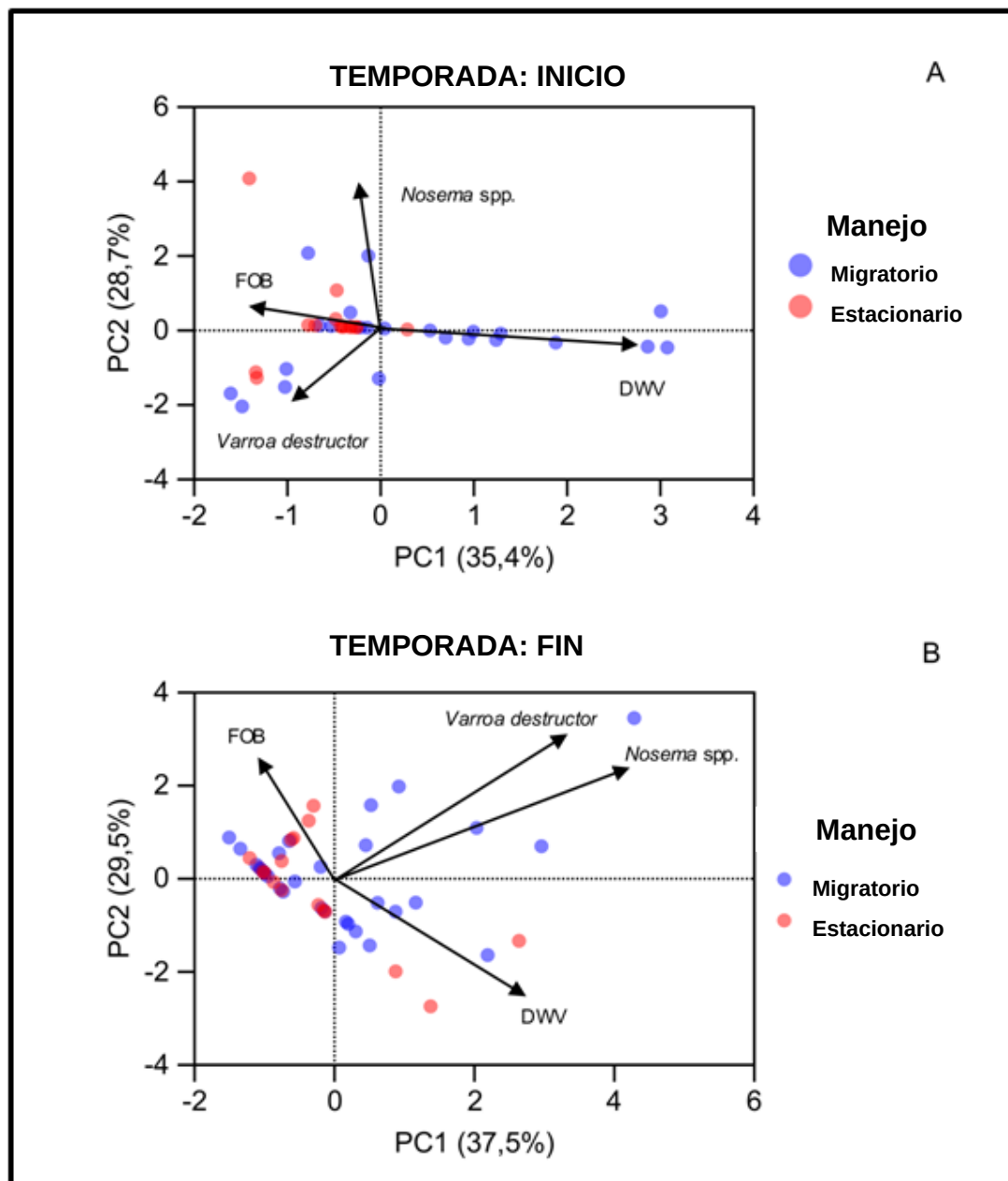


Figura 19: Análisis de componentes principales. Biplot de las colonias que muestra una disímil dispersión en los manejos estacionarios y migratorios para el inicio (A) y el fin de la temporada (B), según cada variable: cuadros de abejas adultas (FOB), nivel de infestación de *Varroa destructor*, nivel de infección de *Nosema spp.* y cargas virales del DWV. Las colonias estacionarias se muestran en rosa y las migratorias en azul.

Temporada	Variable	Nivel	Apiario Estacionario	Apiario Migratorio	χ^2	p-value
INICIO	Detección del DWV	Positivo ND	0,44 0,56	0,86 0,14	11,96	0,0005*
	Categoría de colmena	C1 C2 C3	0,91 0,09 0	0,62 0 0,38	17,16	0,0002*
	Infestación de <i>Varroa destructor</i>	ND Bajo Medio Alto	0,71 0,09 0,20 0	0,79 0 0,17 0,04	3,98	0,2633
	Infección de <i>Nosema spp</i>	ND medio	0,91 0,09	0,69 0,31	5,01	0,0252*
	Nutrición	Regular Bueno Muy bueno	0,47 0,35 0,18	0,62 0,35 0,03	5,80	0,0551*
	Suplemento dietario	Si No	1 0	1 0	0,40	0,5287
	FIN	Detección del DWV	Positive ND	0,53 0,47	0,66 0,34	1,36
Categoría de colmena		C1 C2 C3	0,66 0,09 0,25	0,5 0,24 0,26	3,14	0,2082
Infestación de <i>Varroa destructor</i>		ND Bajo Medio Alto	0,66 0,06 0,22 0,06	0,72 0,1 0,16 0,02	1,77	0,6221
Infección de <i>Nosema spp.</i>		ND Medio	0,88 0,12	1 0	4,14	0,0418*
Nutrición		Regular Bueno Muy bueno	0,19 0 0,81	0 0,36 0,64	21,72	<0,0001*
Suplemento dietario		Si No	0,34 0,66	1 0	44,11	<0,0001*
Resultados de la prueba Chi-cuadrado de Pearson para cada variable entre manejo Migratorio y Estacionario en cada temporada (inicio y fin). Las diferencias significativas se indicaron con (*) en alfa <0,05. Se muestran proporciones para cada nivel en las diferentes variables.						

Tabla 13: Estadísticas resumidas de cada variable al inicio y fin de temporada para el manejo Migratorio versus Estacionario.

Temporada	Variable	Estimate (SE)	Z-value	p-value
INICIO	Intercept	-5,02 (0,98)	-5,10	<0,0001
	DWV	0,13 (0,07)	1,89	0,0588
	Cuadros con abeja adulta	-0,15 (0,10)	-1,60	0,1097
	Infección de <i>Nosema spp</i>	4,1E-06 (5,1E-06)	0,80	0,4209
FIN	Intercept	-5,36 (0,60)	-8,85	<0,0001
	DWV	0,01 (0,09)	0,13	0,8935
	Cuadros con abeja adulta	-0,02 (0,07)	-0,34	0,7354
	Infección de <i>Nosema spp</i>	2,5E-06(3,3E-06)	0,75	0,4528

Tabla 14: Factores explicativos de la gestión migratoria al inicio y al final de la temporada. GLMM con distribución binomial para manejo migratorio, factor aleatorio 'apiario'. $n = 145$ colonias, SE = error estándar.

3.8 Detección de variantes del DWV

Para llevar a cabo este objetivo se plantearon dos diseños de RT-qPCR en tiempo real mediante la metodología de sondas hidrolizables, un formato multiplex y otro uniplex, a fin de tener una herramienta que nos permita detectar la presencia de variantes del DWV. La estandarización se realizó utilizando los controles positivos de cada formato de PCR.

Inicialmente se evaluó el tamaño de cada amplificado mediante PCR de punto final, utilizando concentraciones de cebador y ciclados estándares (Anexo I-D), confirmando el tamaño de cada ultrámero para ser utilizados como control positivo en las PCRs (Figura 20).

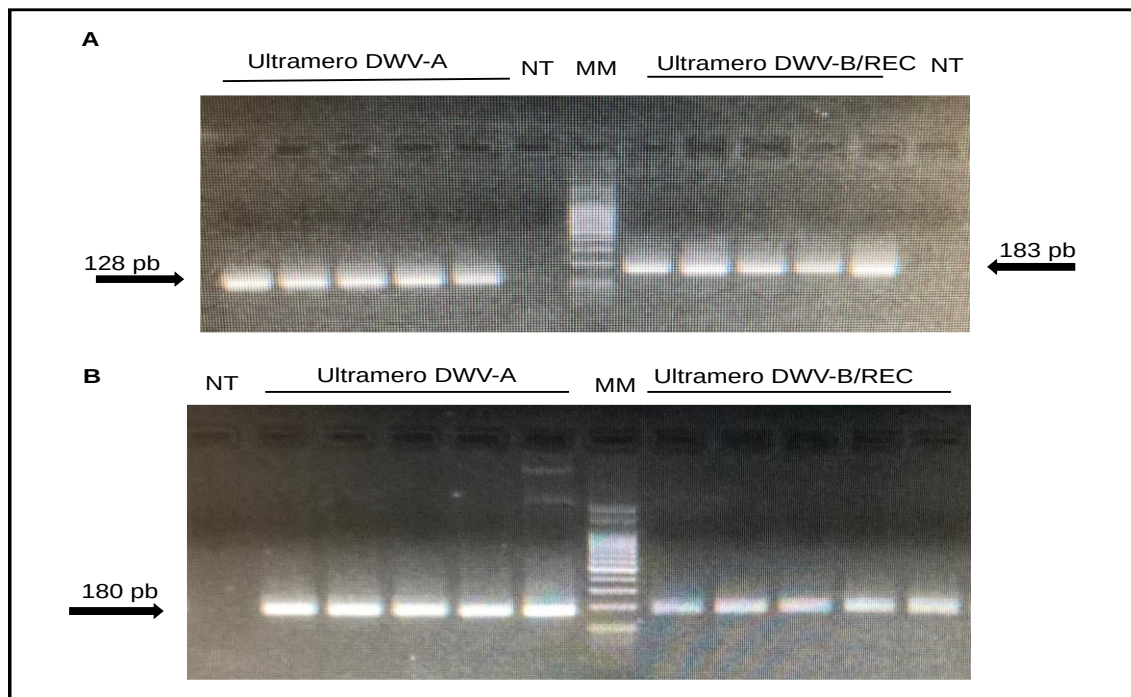


Figura 20: Electroforesis en geles de agarosa 2% mostrando los fragmentos de los ultrámeros sintéticos usados como controles positivos en formato uniplex (A) y multiplex (B) para la detección de variantes del DWV. Gel A: fragmento de 128pb correspondiente a DWV-A, y de 183pb para DWV-B/REC. Gel B: fragmento de 180 pb para DWV-A (izquierda) y DWV-B/REC (derecha). En todas las PCR se incorporó un control sin templado (NT), MM: marcador de peso molecular de 100 pb.

Para determinar la condición óptima de los cebadores y sondas diseñadas, se probaron diferentes concentraciones. La concentración de 200 nM de sonda presentó mejor eficiencia de reacción para todos los formatos de PCR. En relación con las concentraciones óptimas de los cebadores, para el diseño uniplex DWV A y DWV B, la mejor condición de reacción se obtuvo utilizando 400nM de cada cebador.

Además, se evaluaron diferentes temperaturas para el paso de hibridación de los cebadores mediante la aplicación de gradientes térmicos a la reacción. Para el formato uniplex se seleccionó un perfil térmico de 3 pasos. La PCR DWV-A Uniplex presentó una eficiencia de 90-101,6% mientras que la PCR DWV-B Uniplex mostró una eficiencia de 90-96% (Figura 21, Tabla 15).

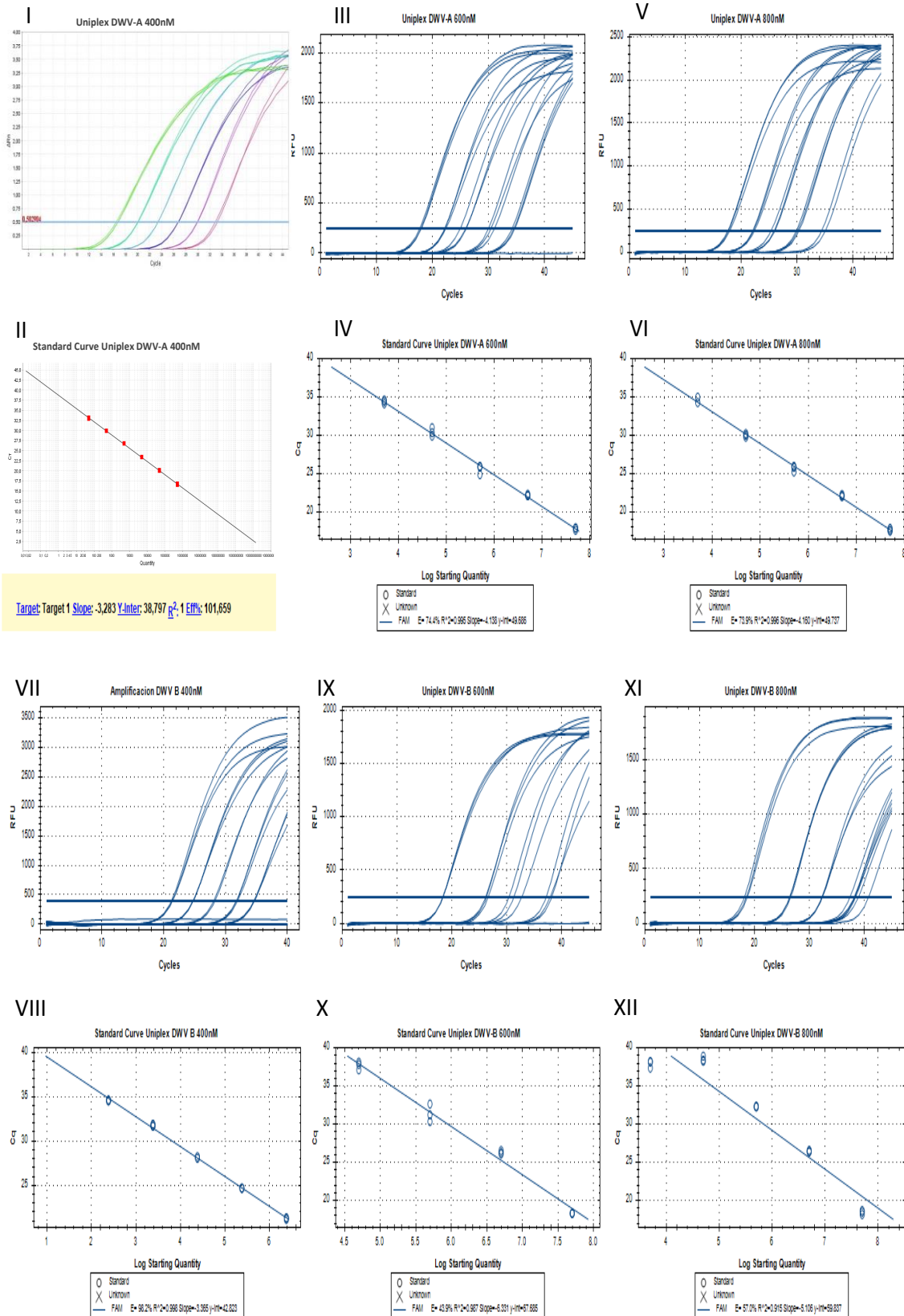


Figura 21: Gráfico de la RT-qPCR Uniplex DWV estandarizada. (I, III, V): Amplificación de la curva estandar de 5 diluciones del control positivo DWV-A empleando 200 nM de sonda y evaluando distintas concentraciones de cebadores 400, 600 y 800 nM respectivamente. Se grafica ΔRn en función del número de ciclos; (II, IV, VI): Gráfico de puntos de los valores de Ct en función de las concentraciones ($\log_{10}$) del templado control y ajuste de la recta de regresión

lineal. (VII, IX, XI): Amplificación de la curva estandar para la variante DWV-B empleando 200 nM de sonda y evaluando diferentes concentraciones de cebadores 400 nM, 600 y 800 nM respectivamente. Se representan 5 diluciones del control positivo DWV-B; (VIII, X, XII): Gráfico de puntos de los valores de Ct en función de las concentraciones (log10) del templado control y el ajuste de la regresión lineal.

Para el formato multiplex las condiciones de reacción que permitieron mayor eficiencia de reacción fueron 200nM de las sondas DWV-A y DWV-B/REC con la combinación de 800nM de cebadores, utilizando un ciclado de 3 pasos. Para la PCR Multiplex se obtuvo una eficiencia de 100.5% para la variante DWV-A y 95% para DWV-B/REC (Figura 22, Tabla 15).

Se utilizaron las 88 muestras positivas para DWV detectadas previamente

De acuerdo con los resultados obtenidos en relación con la eficiencia para las variantes de DWV, se seleccionó el formato múltiplex para continuar con los ensayos de especificidad. Para ello, se utilizaron 88 muestras con resultado detectable para DWV identificadas en este trabajo (Entre Ríos) y 20 con resultado no detectable. Adicionalmente, se incluyeron 19 muestras en las que previamente se había detectado DWV, muestras en las que no había detectado DWV, pero habían resultado detectables a otros virus y muestras presentando coinfección, ABPV (n=10), CBPV (n=6), BQCV (n=11), IABPV (n=1), SBV (n=1), KBV (n=1) se incluyeron, además, tres muestras que presentaron coinfección entre las variantes DWV A y DWV B. Este material fue cedido gentilmente por el laboratorio Bee Reserach Lab del USDA, Maryland, EE. UU.

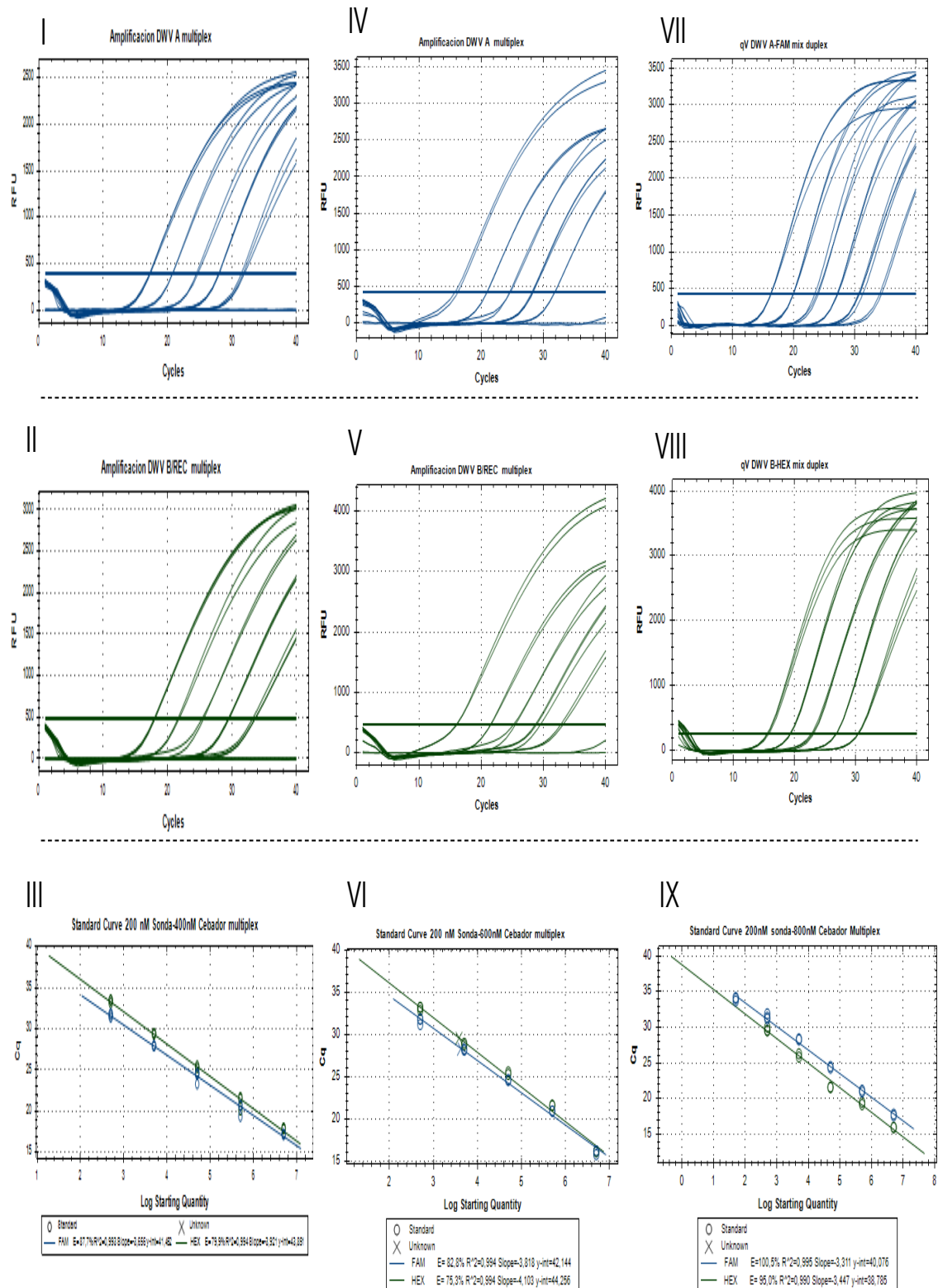


Figura 22: Gráfico RT-qPCR Multiplex DWV. Las gráficas muestran la amplificación de la curva estándar realizada para la variante DWV-A (I, IV, VII) y DWV-B/REC (II, V, VIII) en 5 diluciones de cada control, evaluando igual condición de sonda (200nM) y variando la concentración de cebador 400nM (I, II, III), 600nM (IV, V, VI) y 800nM (VII, VIII, IX). Los gráficos III, VI, IX indican la eficiencia de cada reacción representando el valor de Ct en función de la concentración (log10) del templado control.

PCR	Condición de Reacción 1		Condición de Reacción 2		Condición de Reacción 3	
	Cebadores/ Sonda (nM)	Eff % R ²	Cebadores/ Sonda(nM)	Eff % R ²	Cebadores/ Sonda(nM)	Eff % R ²
Uniplex DWV A	400/ 200	101% R²: 1	600/ 200	74,4% R ² : 0.995	800/ 200	73,9% R ² :0.996
Uniplex DWV B	400/ 200	96,2% R²: 0,996	600/ 200	43,9% R ² : 0.996	800/ 200	57% R ² :0.915
Multiplex DWV A-B/REC	DWV A 400/ 200	87,7% R ² : 0,993	DWV A 600/ 200	82,8% R ² : 0,994	DWV A 800/ 200	100,5% R²: 0,995
	DWV B- REC 400/ 200	79,9% R ² :0,994	DWV B- REC 600/ 200	75,3% R ² :0,994	DWV B- REC 800/ 200	95% R²:0,990

Tabla 15: Condiciones de reacción evaluadas para cada formato de PCR combinando diferentes concentraciones de cebadores (400nM, 600nM, 800nM) bajo una condición estable de sonda (200nM). En amarillo se indica la condición final para cada PCR y su eficiencia.

Todas las muestras provenientes de la provincia de Entre Ríos arrojaron resultados detectables para la variante DWV-A (n=88) únicamente (Anexo III). Con relación a las muestras adicionales, se encontró concordancia para la detección de DWV-A en el 78,95% (15/19).

Para las muestras que presentaban coinfección ABPV/DWV, CBPV/DWV y BQCV/DWV, en todas ellas solo se detectó la variante DWV-A. En el resto de las muestras, en las que se había detectado otro virus únicamente (ABPV, CBPV, BQCV, IABPV, SBV y KBV) no se detectó DWV con la PCR multiplex, confirmando la especificidad de la técnica. Las tres muestras provenientes de EE. UU. fueron positivas para las variantes DWV-A y DWV-B mediante nuestro diseño multiplex. Por último, las muestras identificadas previamente como no detectables para DWV se mantuvieron en esa condición. Todas las reacciones se llevaron a cabo en formato cualitativo, con la finalidad de indicar presencia o ausencia de las variantes del DWV (Tabla 16).

Virus	Total de muestras	Muestras + por RT-qPCR Multiplex	% de Positivos a DWV	Variante detectada
DWV +	19 (ARG)	14	78,94%	DWV A
	3 (EE. UU.)	3	100%	DWV A DWV B
ABPV + DWV -	8	0	-	-
BQCV + DWV -	4	0	-	-
CBPV + DWV -	4	0	-	-
KBV + DWV -	1	0	-	-
IABPV + DWV -	1	0	-	-
SBV + DWV -	1	0	-	-
ABPV + DWV +	2	2	100%	DWV-A
BQCV + DWV +	6	6	100%	DWV-A
CBPV + DWV +	2	2	100%	DWV-A
DWV -	20	0	-	-

Tabla 16: Resultados obtenidos para el ensayo de especificidad de la técnica de RT-qPCR multiplex. Se evaluaron muestras positivas para DWV, muestras coinfectadas con otros virus, muestras positivas para otros virus únicamente, muestras con coinfección de las variantes DWA A/ DWV y muestras con resultados no detectados para DWV.

3.9 Amplificación viral

Para la amplificación viral se utilizaron macerados de muestras positivas por RT-qPCR-PAN, y se seleccionaron macerados de abejas con malformaciones en sus alas (COD: 334) y abejas sin síntomas asociados a la enfermedad (COD: 308). Se amplificaron mediante técnicas “*in vivo*”, para lo cual se realizaron inoculaciones mediante inyección en pupas. Todas las pupas inyectadas con virus se infectaron y mostraron signos típicos de infección viral (oscurecimiento gradual debido a la amplificación viral en los tejidos); por otro lado, en las pupas inyectadas con PBS no se observaron signos de infección viral y mostraron morfología normal (Figura 23).

Luego de determinar la presencia de los virus amplificados (mediante la técnica de RT-qPCR utilizando la metodología, cebadores y controles descritos en el apartado 2.3.4) se procedió a realizar la purificación viral.

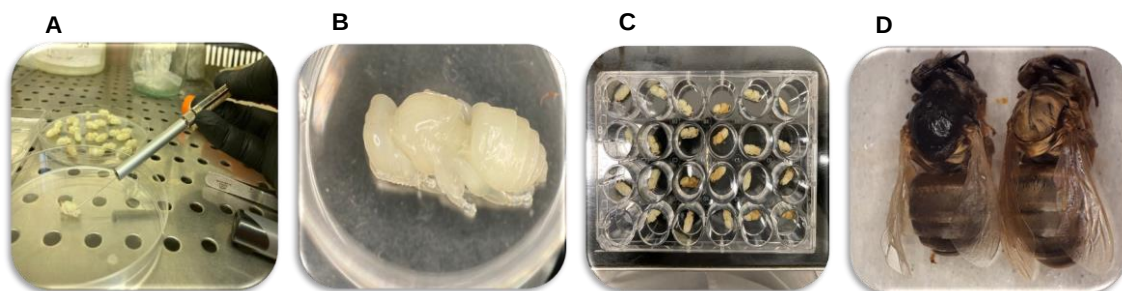


Figura 23: Amplificación viral mediante la técnica "in vivo": Fotografías A: mostrando la inyección de pupas; Fotografía B: pupa en estadio ojo blanco; Fotografía C: placa de cultivo con pupas infectadas (2 días post infección). Fotografía D: abejas a los 7 días post infección, a la izquierda abeja infectada con DWV y a la derecha abeja control. Se observa como la abeja infectada presenta reducción del tamaño, cambio en la pigmentación y pérdida de vello.

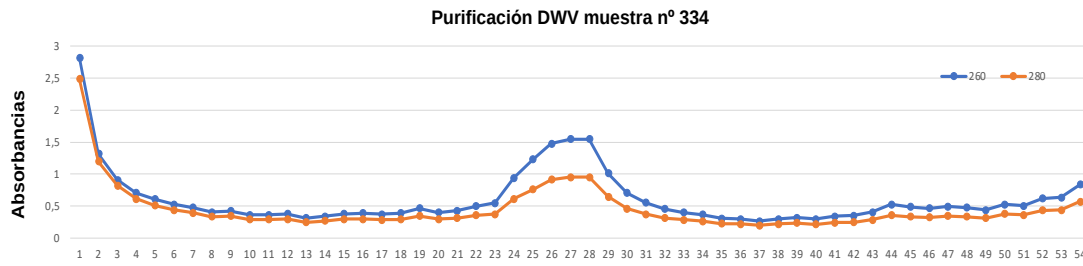
3.10 Purificación viral

Se realizó la purificación del virus DWV mediante gradientes continuos de sacarosa y ultracentrifugación. Para la muestra 334 (sintomática) se observaron los picos de absorbancia a 260nm y 280 nm entre los pocillos 23 y 30, y para la muestra 308 (asintomática) entre los pocillos 27-44. Estos picos correspondían al virus purificado (Figura 24). Finalmente, se tomaron esos eluatos y se realizó la cuantificación de las cargas virales mediante RT-qPCR PAN. La concentración del virus purificado a partir de la muestra 334 fue de $2,38 \times 10^9$ copias génicas/ μ l y a partir de la muestra 308 fue de $1,23 \times 10^9$ copias génicas/ μ l (Tabla 17).

DWV copias génicas/ μ l cuantificado por RT-qPAN					
COD	Copias génicas/abeja	Copias génicas/ μ l muestra	Copias génicas inoculadas (5 μ l) / pupa	Copias génicas/pupa post amplificación	Copias génicas/ μ l virus purificado
308	$2,36 \times 10^{10}$	$4,2 \times 10^6$	$2,10 \times 10^7$	$5,5 \times 10^{12}$	$1,23 \times 10^9$
334	$2,5 \times 10^7$	$9,7 \times 10^6$	$4,85 \times 10^7$	$1,75 \times 10^{10}$	$2,83 \times 10^9$

Tabla 17: Incremento de la carga viral del DWV mediante la amplificación "in vivo" utilizando una muestra sintomática (334) y otra asintomática (308).

A



B

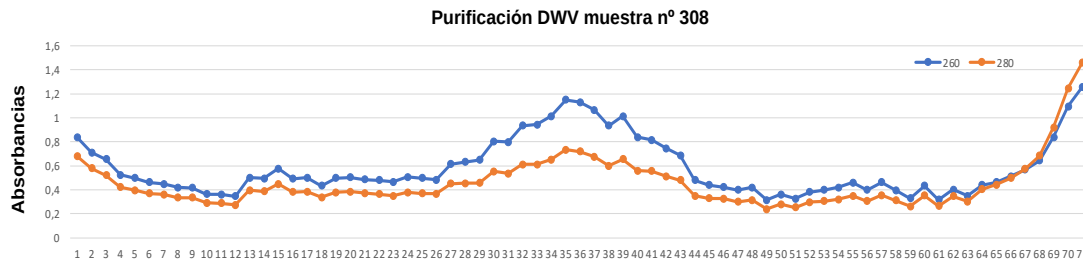


Figura 24: Gráfico de absorancias del gradiente de sacarosa cosechado en fracciones consecutivas correspondiente a la purificación del DWV a partir de una muestra que presentaba malformaciones en sus alas (A-334) y una muestra sin signos asociados a la enfermedad (B-308). En cada fracción se evaluaron las proteínas y los ácidos nucleicos midiendo la absorancia a 280 nm y 260 nm, respectivamente.

3.11 Caracterización del DWV mediante secuenciación

3.11.1 Tipificación de la variante DWV circulante en apiarios migratorios y sedentarios en la provincia de Entre Ríos

Para identificar qué variante del DWV circulaba en las áreas de estudio, se seleccionaron 60 muestras de apiarios estacionarios y migratorios, incluyendo abejas adultas (n= 28), crías (n= 14), *Varroa destructor* (n= 11) y polen (n = 7) (Anexo IV). Además, para mejorar el conjunto de datos de secuencia de Argentina, se incluyeron muestras positivas para DWV de apiarios ubicados en la provincia de Buenos Aires (región con el mayor número de colonias productoras de abejas). El fragmento de 1600 pb obtenido en la segunda ronda de la PCR anidada (Figura 25) se purificó y se secuenció mediante la metodología de SANGER. En las 60 muestras analizadas se identificó la variante A, en base a la secuencia de la helicasa.

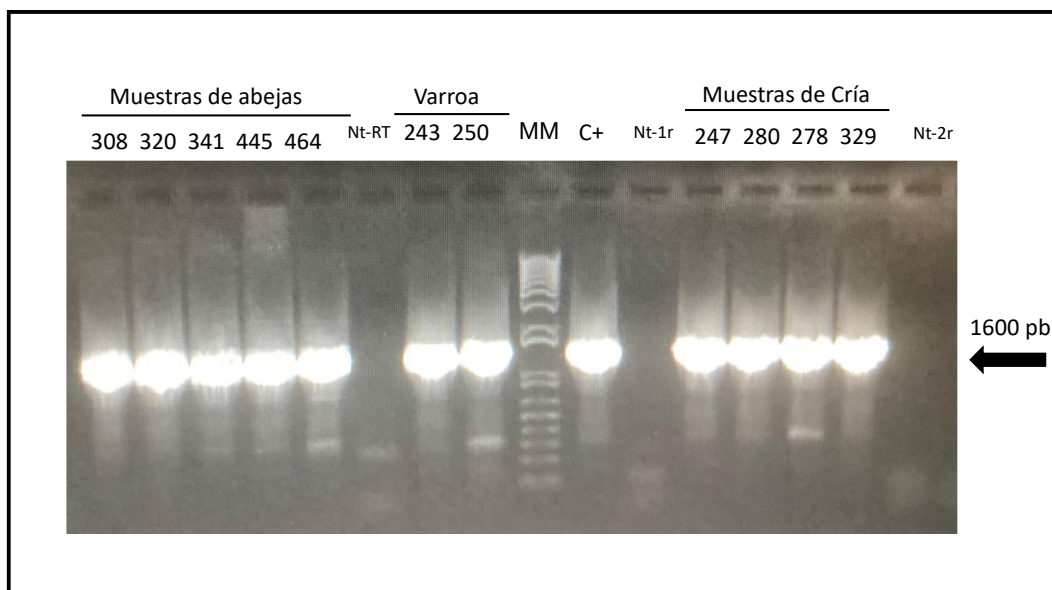


Figura 25: Corrida electroforética en gel de agarosa 1% de los fragmentos de 1600pb obtenidos por RT-nPCR. Se presentan los amplificadores obtenidos de muestras de abejas adultas (COD: 308, 320, 341, 445, 464), *V. destructor* (COD: 243,250) y cría (COD: 247,280,278,329). En cada PCR se incluyó un control positivo y un control sin templado (NT) por cada paso de la PCR anidada (retrotranscripción, ronda de PCR). MM: marcador de peso molecular de 1 kb.

Una vez obtenidas las secuencias se realizó un análisis filogenético incluyendo genomas completos de las distintas variantes del DWV (Anexo III). Este análisis filogenético mostró una fuerte asociación geográfica en la que todas las secuencias argentinas se agrupan con las cepas reportadas para DWV-A. Las muestras de Argentina forman una rama monofilética altamente sustentada (bootstrap = 1000) (Figura 26).

Un análisis detallado de las secuencias argentinas reveló como las muestras de diferentes tipos de manejo (estacionarios y migratorios) se agruparon diferenciándose entre sí (Figura 27). Sin embargo, no se observó agrupamiento diferencial según el tipo de muestra (abeja, cría, ácaro o polen) de donde se detectó el DWV. Las secuencias de Villa del Rosario (migratorios) se agruparon en tres clados de gran soporte (Clado 1, 2 y 3). El clado 1, agrupó la mayor parte de secuencias provenientes de apiarios migratorios recolectados tanto al inicio como fin de la temporada e incluyó solo dos secuencias de apiarios estacionarios de final de la temporada. Estas colmenas estacionarias posiblemente interactuaron con las colmenas migratorias que se trasladaron a zonas de manejo estacionario.

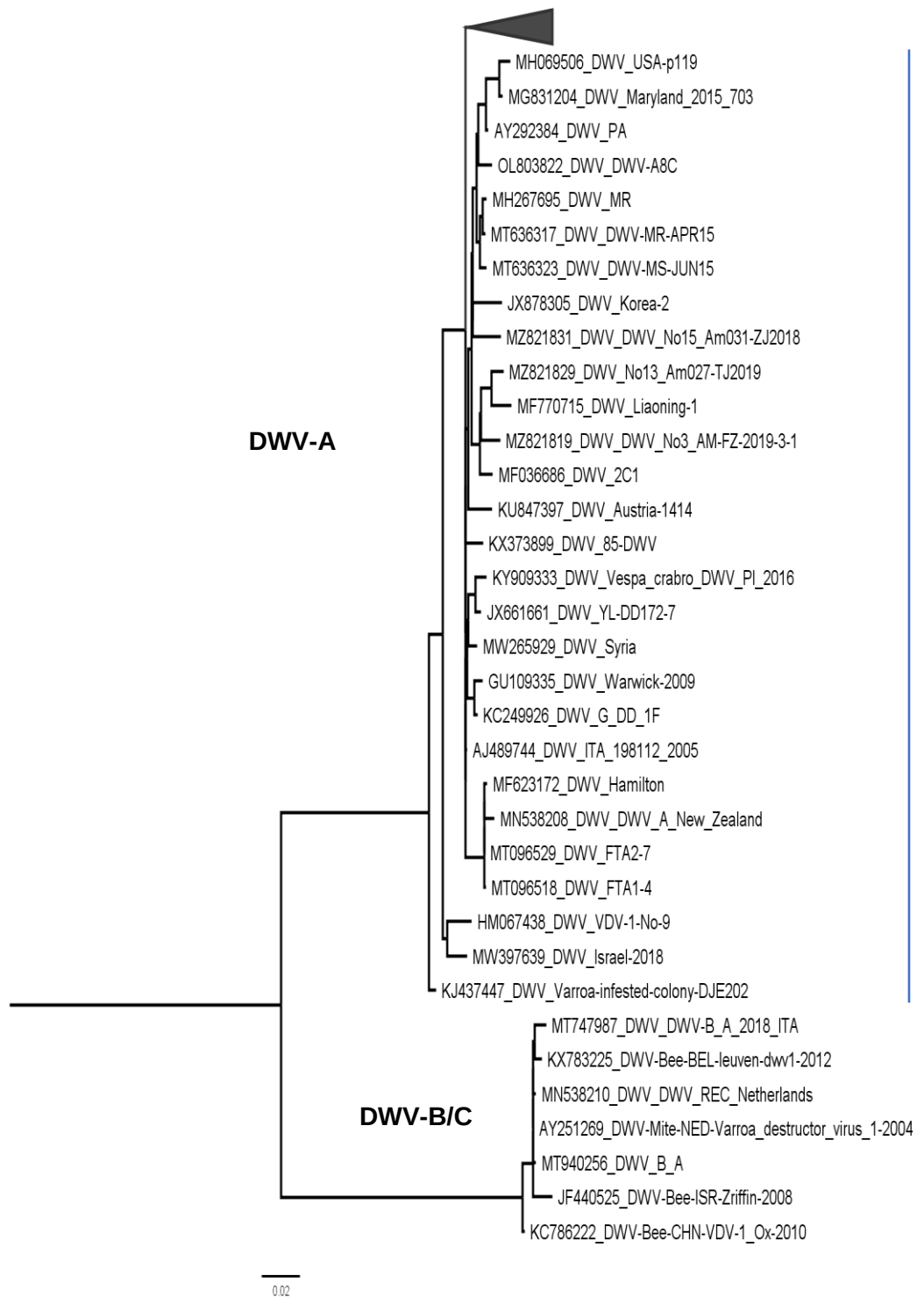


Figura 26: Análisis filogenético del DWV. Árbol filogenético del fragmento de 1600 pb codificante para la proteína no estructural Helicasa, se incluyen secuencias de las variantes DWV A, DWV B y DWV-C (recombinantes) de distintos países (USA, UK, Italia, Países Bajos, Israel, China, España, Suecia, Siria, Corea, Nueva Zelanda, Republica Checa, Australia, Chile, Bélgica). Todas las secuencias de Argentina (▲) se agrupan juntas en la misma rama perteneciendo al clado que caracteriza a las variantes DWV-A.

El clado 2 abarca muestras de apiarios tanto migratorios como estacionarios, revelando dos subramas estrechamente relacionadas. La primera subrama incluye exclusivamente muestras migratorias de inicio de temporada (ER-265-2108 a ER-321-2018). La segunda subrama comprende las secuencias ER-341-2018 a ER-P1-2019, provenientes de apiarios estacionarios. Además, más allá de estas subramas, se observan varias secuencias de apiarios tanto migratorios como estacionarios, de ambas temporadas inicio y fin, sin formar grupos distintos.

El clado 3 presenta la secuencia BA-203-2015, que proviene de un apiario estacionario, posicionada en la base de la rama. A continuación, se observan secuencias de apiarios migratorios, tanto al comienzo como al final de la temporada. Estos apiarios migratorios se aventuraron en la región fronteriza entre las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, sirviendo potencialmente como punto de contacto.

Por otra parte, muestras de Gobernador Maciá (manejo estacionario) también se agruparon en dos grupos monofiléticos con alto soporte. El clado 4 agrupa secuencias aisladas de apiarios estacionarios en 2015, junto con una cepa migratoria de 2019 que comparte una relación genética con la secuencia reportada en Chile, DWV-Chilensis-A1. El clado 5 incluye exclusivamente secuencias de apiarios estacionarios al principio y al final de la temporada. Las secuencias de inicio de temporada están representadas por las cepas BA-108-2015 y ER-378-2018, mientras que las de fin de temporada provienen de apiarios de Entre Ríos en 2019. Las restantes muestras de apiarios estacionarios de la provincia de Buenos Aires se agruparon en un grupo monofilético en la parte inferior del árbol (clado 6), con la excepción de una secuencia obtenida de polen, ER-P11-2019 (Figura 27).

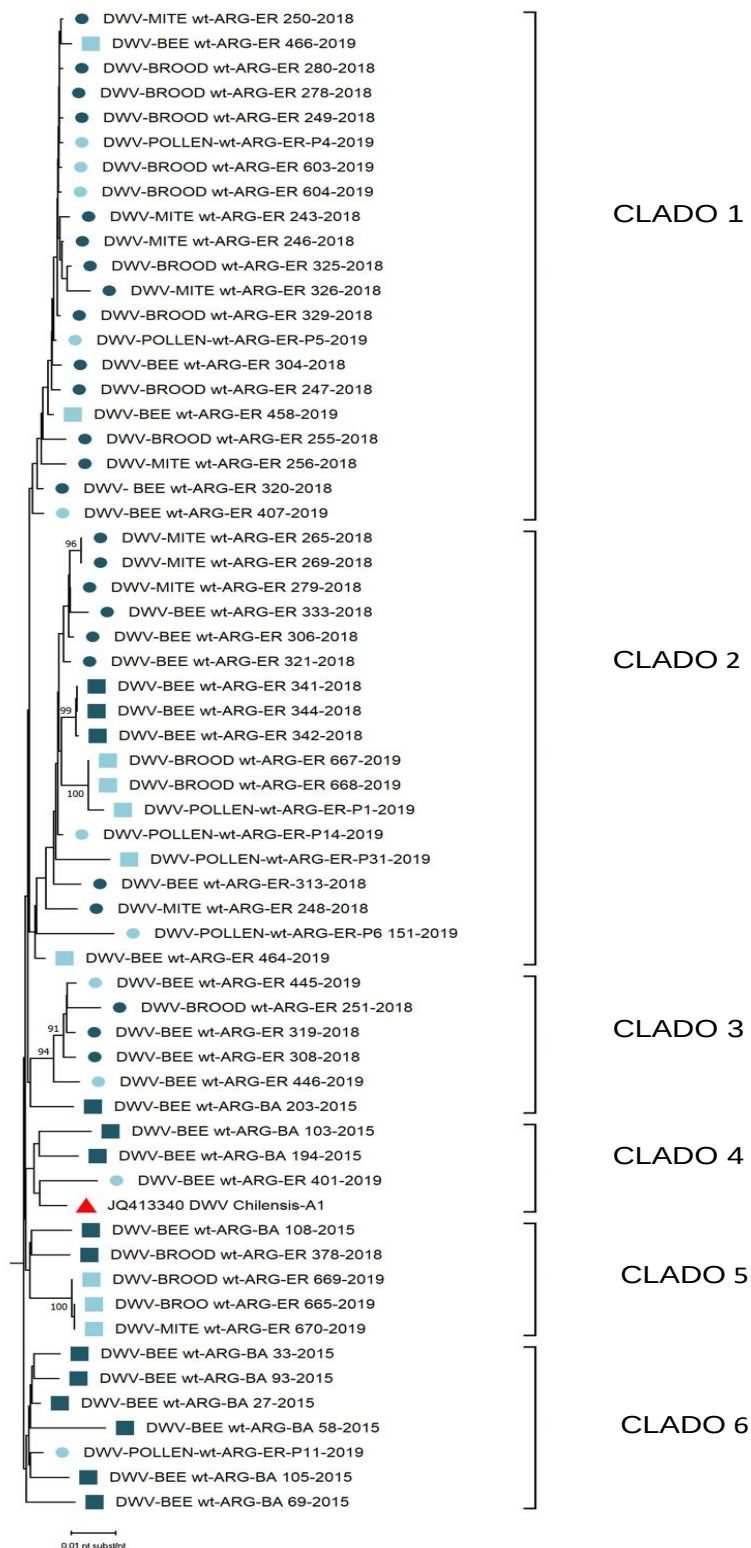


Figura 27: Análisis filogenético de las cepas DWV-A provenientes de Argentina.

Árbol filogenético construido con cepas de Argentina provenientes de colonias estacionarias de inicio (■) y fin de temporada (■) y cepas de colmenas migratorias de inicio (●) y fin de temporada (●). Las muestras de Argentina se agrupan en 6 clados. Se muestra el único genoma completo de Chile (▲). Las secuencias de cepas argentinas se han depositado en GenBank con los siguientes números de acceso OR553510 al OR553569.

3.11.2 Secuenciación de genomas completos (NGS) a partir de muestras sintomáticas y asintomáticas para el DWV.

Para la secuenciación de genomas completos se utilizaron los virus amplificados y purificados de muestras procesadas en el apartado 3.9 y 3.10 que corresponden a, una muestra presentando síntomas asociados a la enfermedad por DWV (COD: 334) y otra asintomática para el DWV (COD: 308).

Se obtuvieron un total de 164 millones de lecturas, distribuidas de la siguiente manera: 71 millones de secuencias para la muestra 308 y 93 millones de secuencias para la muestra 334. La calidad media, medida a través del índice de Phred, mostró valores superiores a QV>30 para todas las posiciones de las lecturas simples. Esto se tradujo en valores satisfactorios de calidad para las lecturas genómicas.

Los genomas secuenciados pertenecieron a la variante DWV-A en su totalidad. El genoma DWV-308 tenía una longitud de 10,187 nt (cobertura 128,709) con un contenido de GC del 37.8%. El genoma DWV-334 presentó una longitud de 10,298 nt (cobertura 492,111) con un contenido de GC del 38,31%.

Las secuencias de los aislados argentinos presentaron una elevada similitud a lo largo de todo su genoma, con un 99% de identidad entre ambas cepas. No se detectaron diferencias significativas entre las secuencias nucleotídicas (96.66%) o aminoacídicas (98.76%) entre ambos genomas, independientemente si la secuencia proviene de una muestra presentando abejas con alas deformes (DWV-A_334) o abejas asintomáticas (DWV-A_308)

La organización de los genomas DWV-Argentina es típica de la familia *Iflaviridae* y consiste en un único marco de lectura abierto (ORF), ubicado entre los nucleótidos 1257 al 9838 para la muestra 334 (2893 aminoácidos) y 1132 a 9813 para la muestra 308 (2893 aminoácidos). Este ORF codifica una poliproteína flanqueada por una región no traducida en los extremos 5' y 3' (UTR) altamente conservada, seguida de una cola de Poli-A (Tabla 16).

Al analizar los genomas se identificaron las proteínas estructurales, y sus genes se mapearon en la sección N-terminal de la poliproteína. Las secuencias aminoacídicas analizadas para esta región mostraron similitud con secuencias reportadas para las cápsides de *Picornavirus* (IPR001676). En la región C-terminal (IPR14872), se encontraron los motivos de secuencias típicos de proteínas no estructurales muy bien reportados para los *Picornavirus*: "Helicasa, superclase 3", virus de ARN de cadena simple" (IPR014759), "Dominio de proteasa 3C/3C-like de *Picornavirales*" (IPR044067) y "Dominio catalítico de la ARN polimerasa dirigida por ARN" (IPR007094).

ID seq	Variante	IRES	Frame	Start	Stop	Nt/aa	Tamaño del genoma
NC_004830	DWV A	1-1144	2	1145	9826	8682/2893	10140
NC_006494	DWV B	1-1117	2	1118	9799	8682/2893	10112
KX373900	DWV C_b_a	1-1108	2	1109	9790	8682/2893	10112
KJ43447	DWV C_a_b	1-1144	2	1145	9826	8682/2893	10140
OR745302	DWV A_308_ER	1-1251	1	1252	9927	8673/2891	10298
OR597290	DWV A_334_ER	1-1131	1	1132	9813	8682/2983	10187
AB070959	KV	1-1156	2	1157	9838	8682/2893	10152

Tabla 18: Identificación del Marco abierto de lectura (ORF) para las secuencias referentes de los subtipos del DWV y los genomas DWV-A de muestras asintomáticas DWV-308 (en negrita) y sintomáticas DWV-334 (en negrita) secuenciados a partir de muestras obtenidas de apiarios de la provincia de Entre Ríos.

Por analogía con virus relacionados y comparación con cepas de DWV previamente reportadas, el orden de las proteínas virales en la poliproteína fue típica de los *Iflavirus* y similar al de los *Picornavirus* de mamíferos (Gromeier et al., 1999), pudiendo determinar sitios putativos de escisión de la proteasa 3C. La poliproteína se procesa mediante digestión con proteasas para producir proteínas funcionales y la proteasa 3C codificada por el virus proporciona la mayor parte de la actividad proteasa (de Miranda & Genersch, 2010). La identificación de estos sitios putativos permitió estimar el N-terminal y C-terminal de cada proteína. Los sitios de la proteasa identificados en los genomas DWV-Argentina se encuentra dentro de los patrones clásicos de las proteasas 3C virales que clivan luego de la glutamina (Q) o el ácido glutámico (E) (Gromeier et al., 1999). Se lograron identificar varios sitios de escisión de este estilo, siendo idénticos en ambos genomas analizados (Figura 28).

Al analizar en detalle la región N-terminal de cada genoma, se pudo identificar la secuencia codificante a un polipéptido líder (Lp; proteína L) hasta el aminoácido 211, seguido de un sitio de corte de la proteasa AKPE(211)MDN, marcando el N-terminar de la proteína estructural VP2, codificada por la región comprendida entre el aminoácido 212 al 464. El N-terminal de la proteína VP1 y VP3 se da en los aminoácidos 486 y 902 respectivamente, comprendida entre los aminoácidos GNNM(485)DNPS para la

proteína VP1 y AIPE(901)GEES para VP3 extendiendo la región codificante a dichas proteínas hasta el aminoácido 880 y 1760.

La proteína VP4 es la proteína estructural de menor tamaño, 20 residuos (465aa-485), posicionándose delante del extremo N-termina de VP3. Para los *Picornavirus*, esta proteína formar parte de una proteína precursora (VP0) junto con la VP1 (Basavappa et al., 1994; Curry et al., 1997).

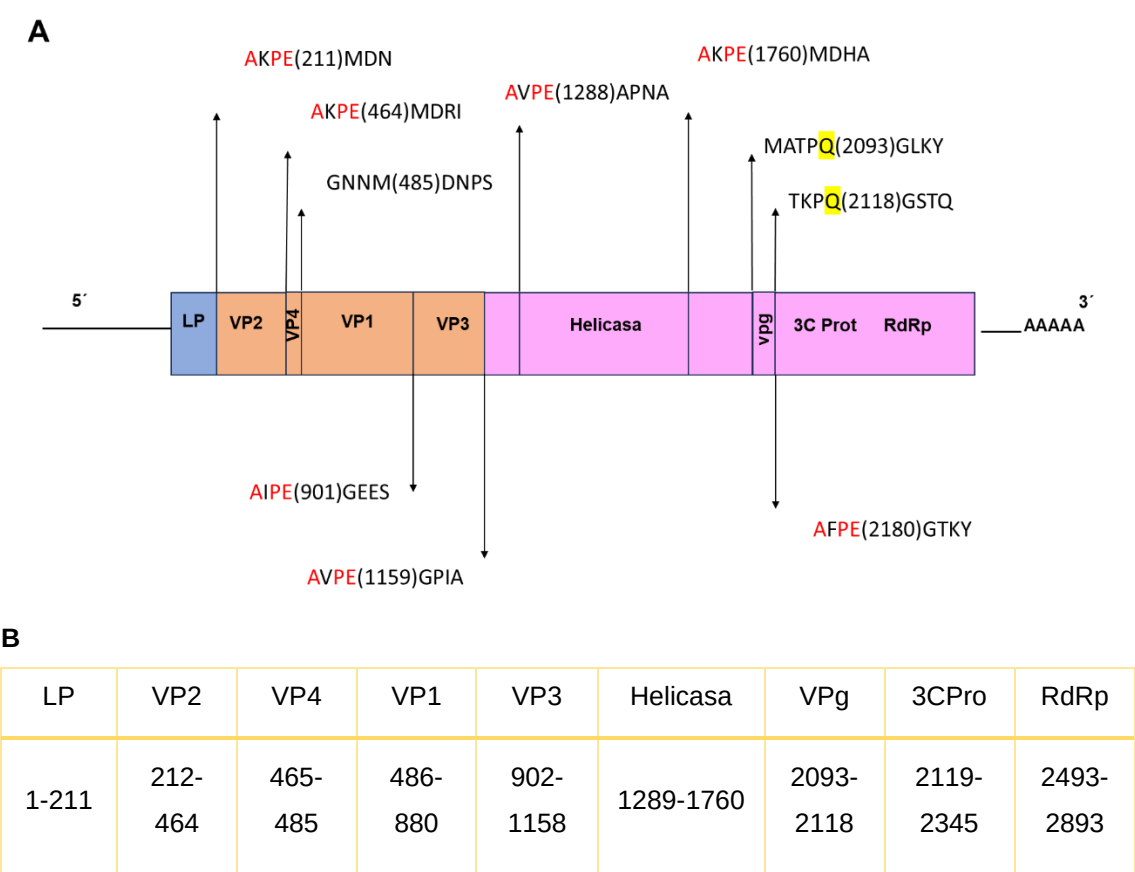


Figura 28: Diagrama del genoma del DWV indicando los sitios putativos de escisión de la proteasa 3C.(A) Se indican los sitios de proteasa determinando los límites putativos de las proteínas estructurales en la región N-Terminal y las proteínas no estructurales en la región C-Terminal de la poliproteína. En rojo se indican los residuos que presentan el mismo patrón de clivaje AxPE, y en amarillo los que clivan después de un residuo de glutamina (Q). (B) Tabla indicando la posición aminoacídica putativa de cada proteína dentro ORF para el DWV utilizando como secuencia de referencia la cepa DWV-A_Arg proveniente de la muestra 334 (OR597290).

En la región C-Terminal de la poliproteína se encontraron sitios de escisión de proteasa 3C con un patrón de corte similares a los sitios de la proteasa VP3 (AxPE). Estos sitios se ubicaron en los residuos 1159, 1760, 1288 y 2180, delimitando el sitio de escisión para la proteína no estructural helicasa, el N-terminal de la proteína 3C Pro y ARN polimerasa dependiente de ARN. Por último, se determinaron dos sitios de proteasa que se diferencian del resto por tener como sitio canónico glutamina (Q) en vez de glutamato (E). Estos sitios se ubican entre la helicasa y el extremo N-terminal de

la 3C Pro, siendo los sitios putativos para la proteína VPg. La VPg es una pequeña proteína común a la mayoría de los virus de ARN de cadena positiva que se une covalentemente al extremo 5' del genoma y participa en la estabilidad del ARN, la replicación y la traducción del genoma (de Miranda and Genersch, 2010). Para los genomas DWV-Argentina esta proteína está codificada por 25 aminoácidos situados entre los residuos 2093-2118 y presentando un sitio de escisión N-terminal diferente de lo reportado en otros genomas MATPQ (2093) GLKY.

Por otra parte, se realizó una comparación de la secuencia aminoacídica de los genomas DWV-Argentina frente a los distintos subtipos del DWV. Las cepas argentinas presentaron una identidad de secuencia del 98.65% con la variante DWV-A (cepa de USA, NC_004830), 95.37% con DWV-B (cepa de Holanda, NC_006494). Se incluyeron cepas recombinantes; la secuencia argentina presentó 98.06% con un aislado DWV-C_Reino Unido (KJ437447), 97.79% de similitud con DWV-C_Francia (KX373900) y 98.89% de similitud (KV: AB070959) una cepa de Japón del virus Kakugo.

Mediante el alineamiento de las secuencias, se pudo determinar que la región más variable entre ellos se presenta en la región codificante a la proteína líder (L). La región comprendida entre los aminoácidos 110 al 133 es una de las más variables dentro de la proteína L presentando mayor cantidad de cambios para la variante DWV-B tal como se muestra en la figura 28. Sin embargo, la variabilidad se detiene a partir del residuo 211, justo después de los sitios de escisión de proteína L-VP2.

Las regiones más conservadas entre los distintos subtipos del DWV se encuentran en regiones codificantes de proteínas no estructurales. Entre los aminoácidos 1460-1575 se extienden los dominios de la helicasa A (1472GxxGxGKS1479), B (1518Qx5DD1525) y C (1561KKx4Px5NTN1575), los cuales no presentan diferencias entre los residuos de las variantes de DWV y los genomas DWV-Argentina. Lo mismo ocurre con los ocho dominios de la RdRp (2493-2828 aa), incluyendo los motivos centrales IV, V y VI involucrados en la catálisis y la unión de nucleósidos trifosfatos (Figura 29).

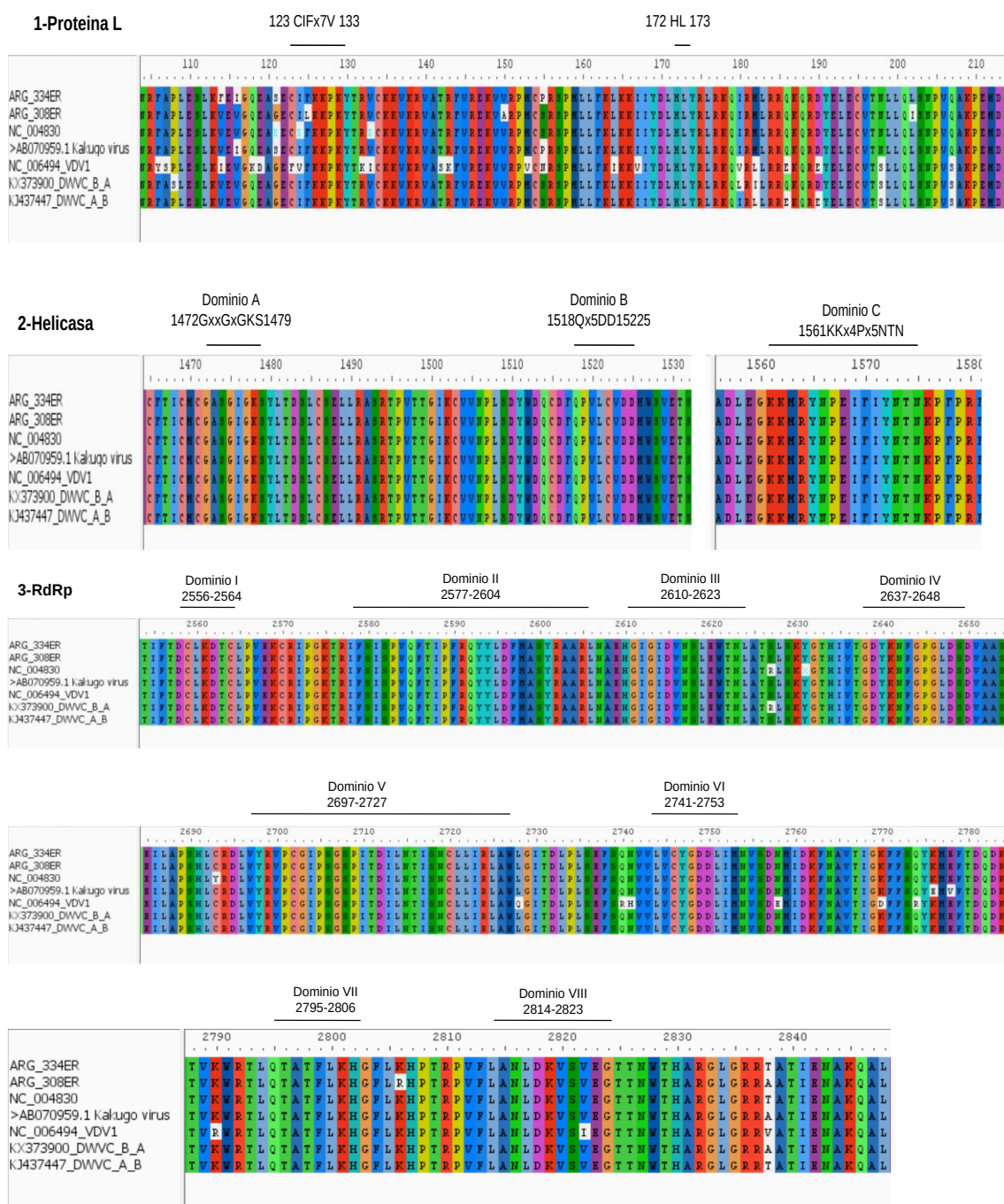


Figura 29: Alineamiento múltiple de secuencia aminoacídica de las proteínas L, Helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN de las variantes del DWV. Para el alineamiento se utilizaron secuencias referentes para DWV-A: NC_004830, DWV-B: NC_006494, DWV-C_B_A: KX373900, DWV-C_A_B: KJ437447, KV: AB070959 junto a las secuencias de los genomas DWV-308 (OR597290) y DWV-334 (OR745302) reportados en este trabajo. Se analizaron las regiones codificantes para la proteína líder-L, proteínas no estructurales helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN.

Posteriormente, se realizó un análisis filogenético con las secuencias de genomas completos incluyendo todas las variantes reportadas para DWV y las cepas secuenciadas en este trabajo. Los genomas DWV-Argentina se agrupan dentro de un clado de la variante A, confirmando lo analizado previamente para la región codificante

de la proteína Helicasa clasificada dentro del subtipo A. Los genomas completos reportados para DWV-A se agrupan principalmente en 3 clados. El Clado 1 y 2 están estrechamente relacionados, el clado 1 agrupa en su mayoría a genomas aislados de EE. UU., también están presentes muestras de España, Italia y Eslovenia. Además, incluye al único genoma reportado en Chile (JQ413340), el cual presenta mayor similitud a la secuencia OR361528 de EE. UU. El clado 2 comprende secuencias MH267695 al KU847397 proveniente de Europa (Suecia y Austria) únicamente.

Las secuencias de argentina se agrupan en el clado 3, en una rama que contienen muestras provenientes de aislados asiáticos (China y Corea del Sur). Sin embargo, DWV-A_308 y DWV-A_334 se separan en una subrama monofilética quedando expuesta sobre la base del clado 2, mostrando similitud con muestras provenientes de Asia y Europa (Figura 30).

Al analizar la región codificante de la helicasa, la única secuencia reportada de Latinoamérica (Chile) mostró una estrecha relación con las secuencias de Argentina. Mediante un análisis de similitud entre los genomas de Argentina y Chile, se pudo examinar en detalle las regiones donde presentaban similitudes o diferencias, utilizando como secuencias de referencia una cepa de Asia (Corea) y otra de América del Norte (EE. UU.) (Figura 31).

A lo largo del genoma, las cuatro secuencias mostraron un porcentaje de similitud mayor al 95%. Sin embargo, al utilizar la cepa de EE. UU. como referencia (Figura 30A), la secuencia de Chile mostró un porcentaje de similitud del 98% a partir de la región codificante para las proteínas no estructurales. La región donde las secuencias de Argentina y Corea presentaban mayor variabilidad frente a la cepa de EE. UU. fue en los primeros 1000-1500 pares de bases, lo cual concuerda con lo analizado anteriormente. En esta región variable codificante para LP y VP2, solo la secuencia de Chile (96%) mostró una mayor similitud con la de EE. UU., mientras que la secuencia de Corea mostró un 88% y la de Argentina un 90%.

Por otro lado, al utilizar la secuencia de Corea como referencia (Figura 30B), los primeros 1000 pares de bases fueron los más variables entre las cuatro secuencias. La secuencia de Argentina en la región codificante para las proteínas VP2 y VP4 mostró una menor similitud con las demás secuencias. Sin embargo, a partir de los 3000-9000 pares de bases, mostró un 96% de similitud con la secuencia de Corea. Las secuencias de Chile y EE. UU. mantuvieron un patrón similar de similitud frente a la cepa de Corea, variando su porcentaje a lo largo del genoma.

Al analizar detalladamente la región codificante para la proteína helicasa (3800-5300 pares de bases) en ambos análisis, las cuatro secuencias mostraron el mayor

grado de similitud (97%). Por lo tanto, es evidente que la región codificante para la proteína helicasa es conservada entre la variante DWV-A analizadas.

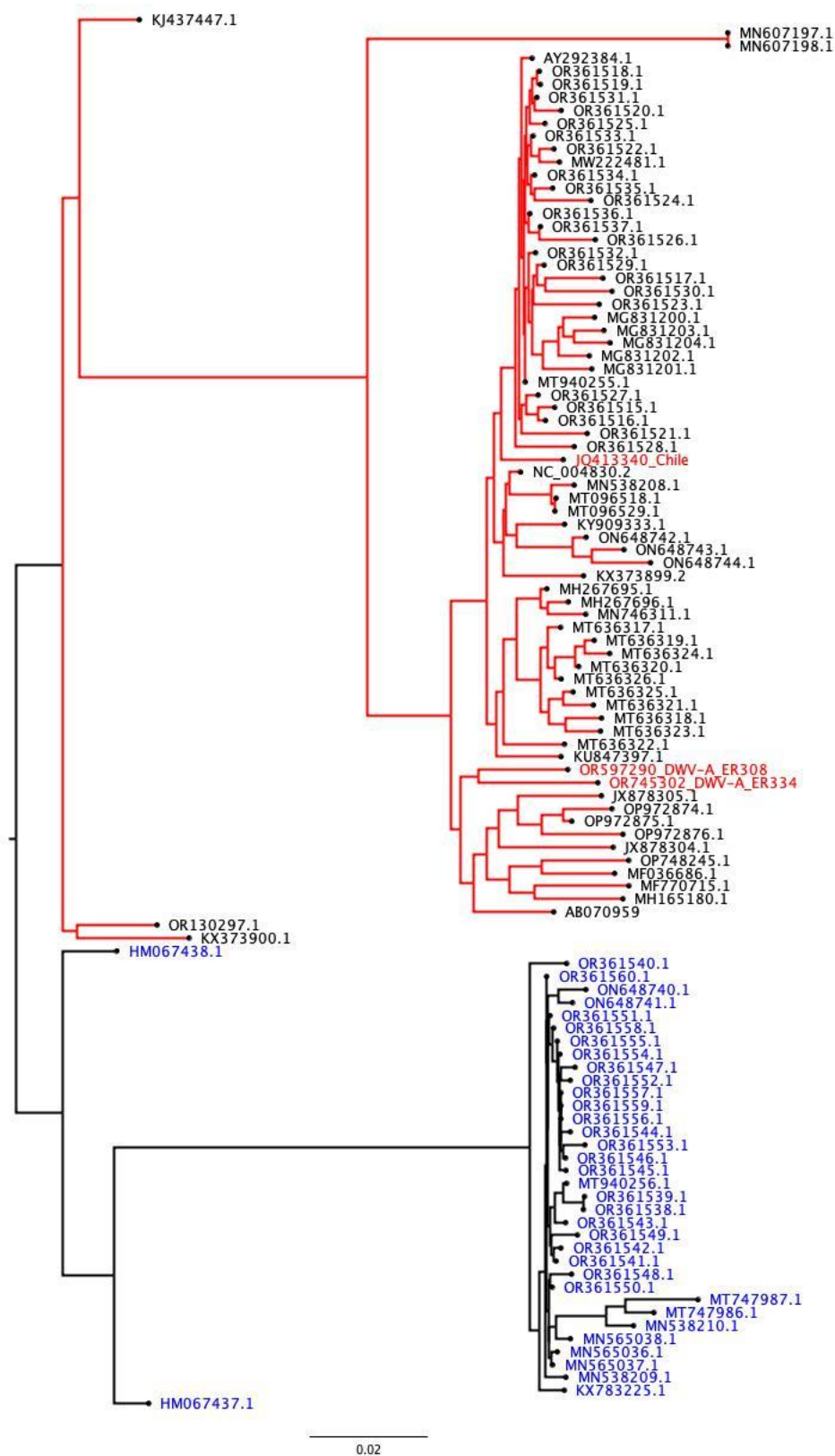


Figura 30: Análisis filogenético (Neighbor-Joining) de las cepas reportadas para DWV-Argentina. Árbol filogenético construido con las secuencias de genomas completos de la

variante DWV-A (rojo), DWV-B/DWV-C (azul). Dentro del clado DWV-A se indican las cepas aisladas en Sudamérica: Chile (JQ413340), las cepas de Argentina DWV-A_ER308 (OR597290) y DWV-A_ER334 (OR745302).



Figura 31: Análisis de similitud entre los genomas completos DWV-A de Argentina y secuencias de China, EE.UU. y Chile. En este análisis se utilizaron secuencias de nucleótidos de los genomas completos para la variante DWV-A. Se incluyeron: secuencia reportada en este trabajo (OR745302), secuencia de Chile (JQ413340), secuencia de Corea (JX878305.1) y secuencia de E.E.U.U. (OR361528.1). Para explicar la distancia genética entre dos o más secuencias se utilizó el modelo de Kimura de 2 parámetros. (A) El análisis Simplot se llevó a cabo utilizando como referencia la secuencia E.E.U.U. (B) Simplot utilizando la secuencia de referencia de Corea. En el eje Y se indica el porcentaje de similitud y en el eje X la posición del nucleótido en el genoma.

Capítulo 4



4 DISCUSIÓN

La abeja melífera habita en una amplia variedad de climas y ambientes. La diversidad y cantidad de flores que hay en estos ambientes determina el desarrollo de una colonia. Al implementar prácticas de manejo adecuado, se maximiza el potencial de producción, fomentando un estado de salud óptimo para las colonias (Carlos et al., 2022). Sin embargo, la presencia de parásitos y patógenos, tales como *Varroa destructor*, *Nosema* spp. y virus, amenazan la salud de la colonia.

En Argentina, a partir de la década de los 90 se ha reportado la presencia de virus en *Apis melífera*, identificando hasta el momento 10 virus diferentes en el territorio; entre ellos se mencionan el DWV, SBV, ABPV, CBPV, BQCV, IABPV, AmFV y LSV (Salina et al., 2021). Estudios realizados por Molineri y col (2017) dentro de la ecorregión que comprende a las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa, indicaron entre los virus analizados al DWV como uno de los más prevalentes (Molineri et al., 2017). Este virus se ha reportado también en la provincia de Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba (Sguazza et al., 2013) y se sabe que su distribución está asociada a la dispersión del ácaro *Varroa destructor*, el cual fue reportado en nuestro país por primera vez en 1976 (De La Sota, 2020). Sin embargo, hasta el momento no se encuentra estudiada la prevalencia del DWV a nivel territorio como tampoco existen trabajos que analicen la diversidad genética de este virus. Por ello, uno de los objetivos de esta tesis fue detectar y caracterizar las diferentes variantes del DWV en apiarios de clima templado, particularmente en la provincia de Entre Ríos.

La apicultura argentina se ha destacado por la producción de mieles claras principalmente provenientes de pradera (Ferrari; Carlos Alberto; Otero, 2011). En los últimos tiempos, la intensificación de la agricultura ha generado modificaciones en los escenarios productivos apícolas con la aparición de zonas multiflorales y zonas monoflorales asociadas a los cultivos de especies agrícolas. En consecuencia, los apicultores también han modificado sus procedimientos realizando un manejo migratorio o estacionario, según la floración, con el propósito de aumentar su producción de miel.

Entre las provincias destacadas para la producción de miel se encuentra Entre Ríos (colmenas totales: 859.406 RENAPA 2024), región que implementa ambos tipos de manejo. Los departamentos de Concordia y Federación albergan el mayor número de colonias (363.659, RENAPA 2024) dentro de la provincia. En esta zona se desarrolla la citricultura, permitiendo a los apicultores la producción de miel monofloral (de *Citrus* spp.), la multiplicación de colonias durante el inicio de la temporada y la posterior trashumancia a zonas de bosques nativos donde se alojan apiarios con manejo sedentario. Las colonias migratorias regresan a su lugar de origen hacia el final de la temporada para aprovechar la floración del *Eucalyptus* spp. Este movimiento de las

colonias se realiza con el objetivo de mejorar la producción de miel y obtener distintas variedades.

La transhumancia a zonas con recursos florales abundantes es una práctica que se realiza en todo el mundo. La misma ha logrado potenciar la producción de miel, minimizar la suplementación dietaria y disminuir la pérdida de colonias, generando un mejor rendimiento económico comparado con los apiarios estacionarios (Kumsa et al., 2020; Sharma et al., 2013). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que cuando la actividad migratoria se realiza para brindar servicios de polinización, la conjunción del estrés por el transporte y el estrés nutricional por la permanencia en una zona de monocultivo puede comprometer la salud de la colonia aumentando el riesgo de adquirir y propagar patógenos y parásitos (Alger et al., 2018).

En la provincia de Entre Ríos se llevan a cabo procedimientos migratorios y estacionarios, de acuerdo con la disponibilidad floral y los objetivos del apicultor. Por ello, en este trabajo de tesis se planteó analizar el impacto que el tipo de manejo tiene sobre la presencia y abundancia de unos de los patógenos más importantes para las abejas melíferas: el Virus de las alas deformes. Los resultados obtenidos de esta tesis revelan que el beneficio otorgado por la migración a zonas multiflorales puede disiparse cuando las colonias terminan la temporada con monocultivo, impactando negativamente en la salud de la colonia y aumentando el número de colonias infectadas con el DWV.

Se encontró que el 62,06% (90/145) de las muestras procesadas estaban infectadas con DWV, y se observó una asociación significativa entre la presencia del virus, el momento de la toma de muestras y el tipo de manejo, especialmente al inicio de la temporada en colmenares migratorios ($p:0,0005$).

Estudios previos, como el realizado por Welch y sus colegas en Massachusetts (Welch et al., 2009), han demostrado los impactos que otorga la práctica migratoria en zonas de monocultivo; las colonias migratorias mostraron una alta prevalencia de virus, incluyendo DWV, BQCV en comparación con las colmenas estacionarias. En este trabajo de tesis se encontraron resultados similares, con una mayor prevalencia puntual de DWV en colonias migratorias, especialmente al comienzo de la temporada, y un mayor riesgo de ser positivas al DWV en comparación con las colmenas estacionarias.

En relación con la abundancia del DWV, las cargas virales en las colonias migratorias, durante inicio de temporada, fueron mayores a las observadas en colonias estacionarias, en contraste con un estudio español en el cual detectaron el virus en el 53% de las colonias analizadas y no encontraron diferencias claras entre el manejo migratorio y estacionario en términos de cargas virales (Jara et al., 2021). Sin embargo, el principal hallazgo reportado por estos autores revela el impacto negativo que presenta la actividad migratoria y su estrés asociado, al aumento del nivel de infestación de

Varroa destructor y *Nosema* spp. Las colonias migratorias analizadas aumentaron marcadamente el nivel de varroasis después del período de verano (post migración) y el aumento de nosemosis en la zona migratoria. Esta situación es diferente a lo observado en este trabajo de tesis, ya que la detección de *Nosema* spp no presentó diferencias significativas entre el tipo de manejo o el momento de toma de muestra. Solo el 12% (18/145) de las muestras analizadas presentaron recuento de esporas que no supera el umbral requerido para realizar tratamiento en la zona de estudio (1.000.000 esporas/ml). En cuanto a la detección de *Varroa destructor*, en estadio forético, no se han detectado porcentajes altos de infestación en ningún momento del muestreo (inicio vs fin de temporada) y tampoco se encontraron diferencias significativas por tipo de manejo (migratorio vs estacionario), aún cuando la toma de muestra haya ocurrido previo al tratamiento contra el ácaro. Al analizar la cría sellada fue posible detectar la presencia de *V. destructor* en colmenares migratorios y estacionarios, predominando en apiarios migratorios tanto al inicio y fin de temporada. La presencia de *Varroa destructor* en la cría evidencia la circulación del ácaro en ambas zonas, aún en colonias en las que no se detectó *Varroa destructor* en estado forético. De esta manera, queda reflejado que al momento de la toma de muestra gran parte de *Varroa destructor* presente se encontraba en estadio reproductivo.

Aunque en este estudio no se puede concluir si el tipo de manejo influye en la presencia o propagación de estos patógenos, como se ha evidenciado en otras investigaciones (Alger et al., 2018; Jara et al., 2021), es notable que los niveles de *Nosema* spp. y *Varroa destructor* fueron consistentes en ambos tipos de manejo y a lo largo de toda la temporada. Es crucial resaltar que los bajos niveles de varroasis observados no deben pasarse por alto. En otras regiones del mundo, se han registrado niveles de infestación de *Varroa destructor* mucho más altos que los encontrados en este estudio, oscilando entre el 6% y más del 30% (Abban et al., 2024; Dainat et al., 2012; Robi et al., 2023). Además, en otras provincias de Argentina se han reportado valores de infestación entre el 0.5% y el 19% (Brascesco et al., 2021; Giacobino et al., 2014). En contraste, en este trabajo, solo el 3.44% (5/145) de las colmenas analizadas presentaron niveles iguales o superiores al 3% durante toda la temporada.

Varroa destructor tiene un papel muy importante en la transmisión del DWV (Martin and Brettell, 2019), ya que su población está influenciada por la dinámica de la población hospedadora, con un aumento de su parasitismo a medida que avanza la temporada (Rosenkranz et al., 2010; Sammataro et al., 2000). Mantener niveles bajos de *V. destructor* es una tarea crítica para evitar la dispersión de virus y el aumento de las cargas virales, tal como se ha demostrado en varios estudios (Martin et al., 2012; Wilfert et al., 2016).

Los bajos niveles de infestación de *Nosema* spp. y *Varroa destructor* en este estudio se atribuyen al riguroso manejo contra estos patógenos en la zona de muestreo. Los apicultores realizan un control minucioso de los mismos debido al gran número de colmenas que manejan para la trashumancia, por tal motivo, los controles de patógenos se incrementan en este tipo de manejo (Traynor, Pettis, et al., 2016). Por otro lado, los apiarios estacionarios también intensifican el control de estos patógenos, ya que suelen tener colmenas migratorias cerca durante ciertos períodos de la temporada, lo que puede aumentar el riesgo de infestación.

Por otra parte, está reportado que una nutrición adecuada mejora y mantiene la salud de las colonias y que el contenido nutricional del polen varía según la región geográfica (Brodschneider and Crailsheim, 2010b). Los polinizadores de cultivos monoflorales, al tener reducida la diversidad floral presentan una mayor susceptibilidad a las enfermedades (Antúñez et al., 2015; Brodschneider&Crailsheim, 2010b). En este trabajo de tesis, las abejas melíferas de colmenares migratorios se alimentaron principalmente del monocultivo de *Citrus* sp durante inicio de temporada o *Eucalyptus* spp en fin de temporada. Las muestras de polen recolectadas del interior de la colonia confirman la presencia dominante de dichos monocultivos según el momento de toma de muestra. Esta falta de diversidad floral podría estar favoreciendo el aumento de colonias positivas para DWV y afectando la fortaleza de la colonia. En este sentido, se observó que los colmenares migratorios expuestos al monocultivo durante inicio de temporada mostraron mayor porcentaje de muestras positivas (86%) al DWV. Así mismo, el 38% de estas colmenas pertenecieron a una categoría C3, indicando una condición débil en su fortaleza según el tamaño de su población. Si bien, el 62% restante de las colonias migratorias fueron clasificadas en una categoría fuerte (C1) durante inicio de temporada, las colmenas C3 presentaron mayor carga viral en abejas adultas.

Aún cuando se ha reportado que la nutrición afecta una variedad de aspectos sobre las abejas como su biología, fisiología, el comportamiento, la susceptibilidad a patógenos y la respuesta inmunitaria (Alaux et al., 2010; DeGrandi-Hoffman et al., 2010; DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015; H. Kim et al., 2024; Li et al., 2019), es importante ser cauteloso ya que se requieren análisis del aporte proteico que otorga el tipo de polen hallado, pero entendemos que la falta de diversidad nutricional podría ser un factor que afecta la salud de la colonia. En varios estudios se analizó el impacto ocasionado por el estrés nutricional, evidenciando una relación positiva para las zonas multiflorales y la supervivencia anual de las colmenas (Corona et al., 2023; Smart et al., 2016) .

Alger y sus colegas observaron los beneficios de trasladar colonias migratorias a zonas multiflorales. Notaron que las colonias que regresaban de monocultivos de almendros mostraban mayores tasas de *Varroa destructor* y una reducción en el tamaño

de la población en comparación con las colonias estacionarias. Sin embargo, estos efectos se revertían cuando las colonias eran llevadas de vuelta a zonas multiflorales, donde prevalecían bosques mixtos y humedales leñosos. Esto favorecía la recuperación de la fortaleza de las colonias, presentando un tamaño poblacional similar en ambos tipos de manejo y reduciendo las tasas de *Varroa destructor* a un mes de la exposición multiflora. Estos resultados respaldan la importancia crítica de la actividad migratoria a zonas multiflorales para la supervivencia y salud de las colonias (Alger et al., 2018).

Recientemente, se han publicado estudios realizados en plantaciones de *Eucalyptus grandis* en Uruguay, que demuestran el impacto negativo del estrés nutricional en la fortaleza de las colonias. Aquellas colmenas expuestas únicamente al monocultivo mostraron una reducción en el tamaño de la población, menor cría y una mayor susceptibilidad a enfermedades en comparación con las colonias expuestas al monocultivo, pero con el suministro de suplementos dietéticos de polen multiflora (Branchiccela et al., 2019).

En esta tesis, las colmenas migratorias en fin de temporada regresaron a la zona de origen (Villa del Rosario) para la floración de *Eucalyptus spp* luego de un periodo de trashumancia a zonas multiflorales. En ese momento, se detectó un 24% menos de colonias positivas al DWV que en inicio de temporada; además, las colonias regresaron con mayor fortaleza debido a la recuperación del tamaño poblacional. En este sentido, se identificaron solo 24% de colonias en categorías débiles (C3), 26% en medias (C2) y 50% de colonias en categoría fuerte (C1). Estos resultados revelan los beneficios de la entrada multiflora durante la migración a montes nativos y refuerzan la utilidad de la transhumancia para mejorar la calidad nutricional de las colonias. Sin embargo, las colmenas migratorias ingresan a la invernada con el almacenamiento de polen monoflora de *Eucalyptus spp*. Esta especie, presenta bajo contenido de lípidos, bajo porcentaje de proteína cruda y deficiente en isoleucinas. Esta composición nutricional no satisface los requisitos mínimos necesarios para el mantenimiento de la colonia y la cría (Manning, 2001; Somerville & Nicol, 2006), de tal manera que los apicultores deben agregar suplemento dietario para que la colonia pueda tener reserva suficiente y sobrevivir el invierno. En este escenario, es concebible pensar que los beneficios otorgados por la actividad migratoria son transitorios y se pierden al permanecer durante fin de temporada en zonas de monocultivo. Los apiarios migratorios que permanecen en esta zona de monocultivo durante fin de temporada podrían no sobrevivir el invierno o aquellos que logren llegar al inicio de la temporada siguiente y recuperan su tamaño poblacional en primavera, son los que hayan presentado mayor diversidad florar al cierre de la temporada, tal como se observan en lo reportado por *B. Branchiccela y col* (Branchiccela et al., 2019). En consecuencia, estos resultados podrían explicar lo

observado en las colonias migratorias y resalta la importancia de abordar las prácticas migratorias con precaución, particularmente cuando las colonias regresan a un área monofloral después de permanecer en áreas multiflorales. Las colonias que experimentan esta situación entran al invierno en un estado no óptimo, lo que las hace débiles y con mayor presencia de DWV al inicio de la siguiente temporada.

Los apiarios estacionarios se localizaron en la región central de la provincia de Entre Ríos, donde el néctar proviene de especies nativas, en su mayoría de árboles y arbustos (G. A. Fagúndez & Caccavari, 2006). Esta es una zona de alta diversidad floral permitiendo un ingreso variado de polen en las colonias, favoreciendo a los colmenares estacionarios de inicio de temporada gozar de un nivel poblacional alto y una condición de salud fuerte (91%-C1). Durante fin de temporada, luego del periodo de tiempo que comparten los recursos con colmenares migratorios, se observa una reducción de colonias en categoría fuerte (66%-C1) y la presencia de colmenas débiles (C3) en un 25%. Incluso durante fin de temporada todos los apiarios estacionarios fueron positivos para DWV. Estos resultados podrían mostrar un impacto negativo del movimiento migratorio dado por el aumento de la competencia por el alimento, al compartir los sitios de alimentación, y por la posible potenciación de la transmisión horizontal de patógenos (Alger et al., 2019)

La actividad migratoria genera, además, condiciones de estrés debido al traslado por largas distancias durante periodos cortos y continuos con la finalidad de brindar servicio de polinización o en busca de una mejor alimentación (Melicher et al., 2019; vanEngelsdorp et al., 2013). El transporte afecta la fisiología de las abejas, y en tal sentido, se ha reportado que colonias con actividad migratoria sufren una reducción del tamaño de la glándula hipofaríngea y una regulación negativa de ciertos genes inmunes y de resistencia al estrés (Ahn et al., 2012). Incluso, los cambios de temperatura durante el transporte afectan a la viabilidad de las colonias (Melicher et al., 2019). Además, se ha demostrado que la relocalización en un área nueva provoca desorientación y pérdida de los individuos durante los primeros días post traslado (Nelson & Jay, 1989). En esta tesis no se analizaron estos parámetros, pero es probable que las colonias migratorias hayan sufrido los efectos negativos del transporte, contribuyendo esto a debilitar las colonias previo a la invernada.

Por otra parte, uno de los objetivos de este trabajo fue poder determinar la variante circulante de DWV en la zona de estudio. El método más común para el diagnóstico de virus que afectan a insectos es la detección de su genoma mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Las metodologías diseñadas en su mayoría se centran únicamente en la detección de los virus que más frecuentemente

afectan a la abeja melífera, pero son pocas las metodologías descriptas para la detección de variantes del DWV (Bradford et al., 2017; J. M. Kim et al., 2020).

La caracterización de la variante circulante DWV se ha reportado recientemente solo en apiarios de la provincia de Buenos Aires y Santa Fe. Se identificaron las variantes A y B en la provincia de Buenos Aires a partir de colmenas que presentaban un alto porcentaje de infestación con varroa (Brasesco et al., 2021)

Por tal motivo, se presenta como un desafío enorme el poder contar con herramientas que permitan identificar de forma certera los subtipos del DWV. En esta tesis se logró estandarizar con éxito una RT-qPCR multiplex, que permite detectar en la misma reacción la presencia de variantes DWV-A y DWV-B/C, mediante la utilización de sondas hidrolizables específicas para cada variante. Además de ser una metodología adecuada para detectar las variantes *master* de DWV, los ensayos realizados en este trabajo demostraron que es una metodología con alta especificidad diagnóstica, ya que no presentó detección cruzada con otros virus que infectan a las abejas y no detectó el DWV en muestras previamente caracterizadas como no infectadas con el mismo. La RT-qPCR multiplex desarrollada permitirá realizar en el futuro un análisis más exhaustivo a la hora de detectar la presencia del virus pudiendo contar con una herramienta de rápida detección y específica de las variantes del DWV.

Dada la escasez de información disponible sobre el Virus de las Alas Deformes (DWV) en nuestra área de estudio, uno de los principales objetivos de este trabajo fue identificar la variante específica del DWV presente en las muestras recolectadas mediante secuenciación. Inicialmente, se llevó a cabo el análisis de la secuencia correspondiente a la helicasa utilizando la secuenciación por Sanger en 60 muestras obtenidas de diversas fuentes, como abejas adultas, crías parasitadas, crías no parasitadas, *V. destructor* y polen. En contraste con lo reportado en la zona central del país por Brasesco y col., en las muestras de Entre Ríos se identificó únicamente la variante *master* A del DWV. La presencia de una sola variante circulante en la región centro-norte de la provincia de Entre Ríos, pudo haber sido favorecida por los bajos niveles de infestación de *V. destructor* observados durante toda la temporada. Esta situación particular posiblemente evitó la introducción o propagación de otras variantes del DWV, en contraposición a los hallazgos de Ryabov y sus colegas, quienes informaron sobre una cepa recombinante del DWV con mayor virulencia, la cual replicaba a niveles elevados cuando era transmitida por *V. destructor* (Ryabov et al., 2014). El análisis filogenético realizado reveló que todas las secuencias argentinas mostraron una estructura geográfica común, ya que no se agruparon con ninguna otra secuencia a nivel mundial, excepto una proveniente de Chile. Además, en uno de los apiarios se observaron abejas con deformidades en las alas (COD 333). De manera

interesante, las secuencias obtenidas tanto de colonias sintomáticas como asintomáticas para la región de la helicasa presentaron una similitud de aminoácidos del 99%

Por último, uno de los aportes importantes que se desprende de los ensayos realizados en este trabajo de tesis fue la secuenciación del genoma completo de la variante circulante en apiarios de la provincia de Entre Ríos. La secuenciación masiva realizada a partir de muestras de abejas con malformaciones en sus alas (DWV-A_ARG_334ER, IDGenbank: OR745302) y abejas asintomáticas para DWV (DWV-A_ARG_ER308, IDGenbank: OR597290), permitió caracterizar la variante DWV-A en ambas muestras. La calidad de las lecturas obtenidas permitió secuenciar ambos genomas en su totalidad, con un tamaño de 2893 aminoácidos. Este resultado representa el primer reporte de genomas completos del DWV y el primer genoma viral completo de un virus que afecta a *Apis mellífera* en la República Argentina.

Mediante un análisis detallado de las secuencias se identificaron las regiones putativas correspondientes a las proteínas estructurales y no estructurales del DWV. Las mismas conservan el orden de las proteínas virales típica para los *Iflavirus*, y similar al de los *Picornavirus* de mamíferos (Gromeier et al., 1999). Ambos genomas presentaron una similitud del 99% en su secuencia tanto nucleotídica como aminoacídica

El análisis filogenético posterior realizado sobre los genomas completos reveló que los genomas asociados con la variante DWV-A se dividen en tres clados distintivos. Las cepas argentinas se agrupan en una subrama separada dentro de un clado, mostrando similitudes solo con los genomas reportados en Asia. En contraste, el árbol filogenético anterior, que examinaba solo una región del genoma (helicasa), mostraba que la cepa chilena se agrupaba con las secuencias argentinas. Aunque en el análisis de la región de la helicasa, la cepa chilena mostraba una mayor similitud con las secuencias argentinas debido a una mayor homología en esa región específica, al analizar los genomas completos, la cepa chilena exhibió una mayor distancia evolutiva y se agrupó con muestras procedentes de Europa y Estados Unidos.

Por otra parte, debido a la escasa variabilidad genética entre las secuencias de muestras sintomáticas y asintomáticas de la provincia de Entre Ríos, no se encontró asociación entre la presencia de alas deformes o la severidad de la enfermedad y alguna secuencia específica dentro del genoma. Resultados similares fueron observados por Brettell y sus colegas al analizar genomas completos de muestras provenientes de colmenas en Brasil y Hawái. En su estudio, analizaron abejas que presentaban malformaciones en sus alas, así como abejas asintomáticas parasitadas con *Varroa destructor* y sin parasitar. Aunque las abejas sintomáticas mostraron una mayor carga

viral, al comparar los genomas completos de DWV, no pudieron encontrar diferencias consistentes entre los genomas, observando una mayor variación entre ubicaciones geográficas que entre fenotipos. A diferencia de esta tesis doctoral, los autores identificaron distintas variantes del virus (DWV A, B y recombinantes), con DWV-A predominando en muestras sintomáticas y asintomáticas. Concluyeron que no se puede atribuir la presencia de alas deformes a una variante en particular (Brettell et al., 2017). En otros trabajos, en cambio, se ha propuesto que las variantes recombinantes entre las maestras DWV-A y DWV-B pueden dar lugar a una infección virulenta (Ryabov et al., 2014).

Las abejas con alas deformes se han convertido en un signo universal de la presencia del DWV, especialmente en colonias infectadas con *Varroa destructor*. Normalmente, la proporción de abejas con estas deformidades es inferior al 1%, ya que la mayoría de ellas mueren en etapas tempranas o poco después de emerger. El DWV, al igual que muchos otros virus que afectan a las abejas, suele circular de manera encubierta en la mayoría de las colonias, sin mostrar signos clínicos evidentes (de Miranda & Genersch, 2010; Kevill et al., 2021).

Se ha observado consistentemente que las abejas con alas deformes tienen niveles más altos de DWV en comparación con las abejas asintomáticas (Brettell et al., 2017). Por lo tanto, actualmente, un factor asociado con la presencia de alas deformes es una alta carga del DWV, que a menudo está relacionada con niveles elevados de infestación de *Varroa destructor*. Sin embargo, como se ha demostrado, no se puede atribuir la presencia de alas deformes a una variante específica del DWV, ya que varios factores pueden influir en la manifestación de los signos asociados a la enfermedad (Brettell et al., 2017; Kevill et al., 2019b; Martin et al., 2012; Moore et al., 2011).

La caracterización de una de las variantes *master* del DWV en este trabajo de tesis otorga una información valiosa y relevante para futuros estudios, diseño de nuevas metodologías de detección y control del DWV.

Este trabajo refuerza la importancia que representa implementar un manejo adecuado para mitigar la propagación de patógenos y parásitos, así como la necesidad de abordar el estado nutricional para mantener la salud de las colonias de abejas melíferas. Los hallazgos presentados en este trabajo ofrecen una comprensión más profunda de los factores que afectan la salud de las abejas al implementar la actividad migratoria dentro de la provincia de Entre Ríos y destacan la importancia de abordar medidas preventivas para garantizar el bienestar de las colonias y la productividad de la apicultura en Argentina.

5 CONCLUSIÓN

Este trabajo de tesis presenta información relevante y novedosa sobre la presencia del DWV en la provincia de Entre Ríos, así como su caracterización.

Fue posible detectar la presencia del DWV en muestras de abeja adulta, cría, *V. destructor* y polen recolectadas durante este estudio. Se detectó la presencia del virus en el 62.06% de las muestras analizadas. Sin embargo, la prevalencia puntual varío según el momento del muestreo y el tipo de manejo, siendo mayor para los apiarios migratorios durante el inicio de la temporada con un 86.2% de colonias positivas.

Se evidenció que la migración a zonas monoflorales durante la temporada puede aumentar la prevalencia del DWV. Se encontró una asociación positiva entre la presencia del virus, el momento de toma de muestra y el tipo de manejo, siendo significativo para los colmenares migratorios durante el inicio de la temporada.

Nuestros resultados revelan que el beneficio otorgado por la migración a zonas multiflorales queda enmascarado cuando las colonias terminan la temporada con monocultivo, tal como se observó en las colonias migratorias que invernaron con el polen de *Eucalyptus ssp.* Esto impactó negativamente el estado nutricional y la fortaleza de la colonia pudiendo provocar que, al inicio de la siguiente temporada, un gran número de colmenas presenten categoría débil (C3) y mayor prevalencia de DWV.

La detección de *Nosema spp.* y *V. destructor* forético se mantuvieron en valores inferiores a los requeridos para dar tratamiento durante todo el estudio, sin presentar diferencias marcadas entre el tipo de manejo o el momento de toma de muestra. Por ello, no fue posible determinar si la presencia de estos patógenos genera una influencia sobre la prevalencia y abundancia del DWV. Este resultado se debió a un manejo riguroso, continuo y sincronizado por los apicultores.

Fue posible caracterizar la variante circulante del DWV en apiarios con actividad sedentaria y migratoria. El análisis de las muestras de abejas, cría, *V. destructor* y polen determinó la presencia de una única variante maestra de DWV (DWV-A) circulante en la región centro-norte de la provincia de Entre Ríos.

El análisis filogenético reveló que las muestras provenientes de Argentina se agrupaban en una rama monofilética altamente sustentada, demostrando una fuerte asociación geográfica.

Los virus amplificados mediante técnicas *in vivo*, de muestras asintomáticas y sintomáticas para el DWV se purificaron y se incorporaron al cepario del Instituto de Virología (INTA).

Se logró la secuenciación de genomas completos de la variante circulante en los apiarios de la provincia de Entre Ríos, reportando por primera vez un genoma completo para la variante DWV-A en la República Argentina. Esto brinda una información valiosa

para futuras investigaciones sobre las variantes virales presentes en el país y el desarrollo de estrategias futuras para mitigar la dispersión de estos virus.

Por último, fue posible estandarizar una RT-qPCR multiplex con la finalidad de contar con herramientas certeras de detección y caracterización de variantes de DWV para futuros estudios y el diseño de estrategias de control.

Esta tesis doctoral aporta conocimiento sobre la prevalencia del DWV dentro de una de las provincias con mayor impacto en la actividad apícola, evidenciando como las prácticas de manejo pueden impactan sobre la salud de la colonia, poniendo en manifiesto la importancia de abordar las practicas migratorias con precaución y como el control riguroso de patógenos tales como *V. destructor* y *Nosema spp* evitan que se produzcan perdidas de colonias o efectos negativos en la producción de miel.

Este trabajo aporta el primer reporte de genomas completos para el DWV, identificando una de las principales variantes master presentes en gran parte del mundo. Esto brinda un conocimiento valioso y esencial para el estudio de los virus que afectan a la salud y el bienestar de la abeja melífera.

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados.

Gonzalez FN, Ferrufino C, Dus Santos MJ, Carignano HA. Complete genome sequence of deformed wing virus and black queen cell virus isolated from honeybees (*Apis mellifera*) in Argentina. *MicrobiolResourAnnounc*. 2024 Mar 12;13(3): e0102523. doi: 10.1128/mra.01025-23. Epub 2024 Feb 1. PMID: 38299840; PMCID: PMC10927652.

Gonzalez FN, Raticelli F, Ferrufino C, Fagúndez G, Rodríguez G, Miño S, Dus Santos MJ. Detection and characterization of Deformed Wing Virus (DWV) in apiaries with stationary and migratory management in the province of Entre Ríos, Argentina. *Sci Rep*. 2024 Jul 20;14(1):16747. doi: 10.1038/s41598-024-67264-7. PMID: 39033233.

Come hijo mío, de la miel, porque es buena.
Y el panal es dulce a tu paladar.
Así será a tu alma el conocimiento de
la sabiduría;
Si la hallares tendrás recompensa,
Y al fin tu esperanza no será cortada.
Proverbios 24; 13-14.

ANEXO I: DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A-PCR-RFLP: Identificación de Haplotipos de Apis melífera

La mezcla de reacción se realizó en 25 µl de volumen final, conteniendo: 1 µM de cada cebador, 0.5 mM de dNTP (Boehringer Mannheim), 1.5 mM de MgCl₂ (InbioHighway), 1X de tampón de reacción (InbioHighway), 1U de Taq polimerasa (InbioHighway) y 5 µl de ADN total como templado. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100 (MJ Research). Se verificó el resultado de las reacciones corriendo 5 µl de producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El perfil térmico de la reacción fue el siguiente: 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C y una elongación final de 2 minutos a 72°C.

Posteriormente, se digirió una alícuota de 10µl del producto de PCR con las enzimas Dpn I (siguiendo los antecedentes de Sheppard et al. 1996) y Hinf I (Promega, Madison, MN, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones enzimáticas se incubaron a 37°C durante 3 hs utilizando el tampón y las condiciones indicadas por el proveedor. Los fragmentos de restricción fueron separados y visualizados en gel de agarosa al 4% p/v, teñido con GelRed y fotografiado bajo luz UV.

B-PCR-plásmido PAN-DWV: Construcción del control positivo para la detección de DWV.

La mezcla de reacción incluyó: 5 µl de buffer de reacción 5x (Promega), 0,5 µl de dNTPs 10 mM (Promega); 0,5 µl de cada cebador PAN-DWV_L (L_F y L_R) de 10µM; 0,25 µl de 2.5U/µl Taqpol. (Promega); 13,25 µl H₂O (Sigma). Se agregaron 5 µl de ADNc. Como control negativo se incorporó un tubo al que se le agregó H₂O en lugar de ADNc. El perfil térmico de la reacción de PCR fue el siguiente: 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos 95°C, 30 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C y una elongación final de 7 minutos a 72°C.

C-PCR-Helicasa DWV: Para la secuenciación por SANGER.

La mezcla de reacción contenía 5 µl de ADNc, 5 µl de tampón de reacción 5x (Promega-cloruro de magnesio 1,5 mM en el volumen de reacción final), 0,5 µl de dNTP 10 mM (Promega), 0,5 µl de cebadores (10 µM), 0,25 µl de 5U/µl de polimerasa, y 13,75 µl de agua ultrapura (agua destilada con ADNasa, libre de ARNasa; Invitrogen/Sigma) para un volumen total de 25 µl. Se incluyeron controles positivos y negativos en todos los ensayos. Las amplificaciones anidadas se realizaron en un termociclador SimpliAmp Thermalcycler Applied Biosystems, mediante el siguiente perfil térmico para ambas PCR: 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos 95°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto y 30 segundos a 72°C y una elongación final de 10 minutos a 72°C.

Para las reacciones de primera ronda se utilizaron los cebados: 155 y 156. En la segunda ronda la detección de variante DWV A mediante el uso de cebadores denominados 151y 153, DWV-B cebadores 152-154.

D-PCR estándar para DWV.

Mix de reacción usando una enzima GoTaq polimerasa (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante, cebadores ida/vuelta 400nM según cada PCR, bajo un perfil térmico: 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C y una elongación final de 5 minutos a 72°C. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador SimpliAmp Thermalcycler Appliedbiosystems.

E-PCR Locke para la detección de los siguientes virus:

DWV, ABPV, CBPV, IABPV, BQCV, SBV y KBV.

La síntesis de ADNc se realizó mediante las condiciones previamente mencionadas en el apartado 2.3.2, utilizando el cebador específico para cada virus.

Todas las qPCR se realizaron en un volumen final de 12,5 µl conteniendo 6,25 µl de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0,5 µl de cada cebador (10 µM), 2,75 µl de H₂O y 2,5 µl de ADNc previamente sintetizado.

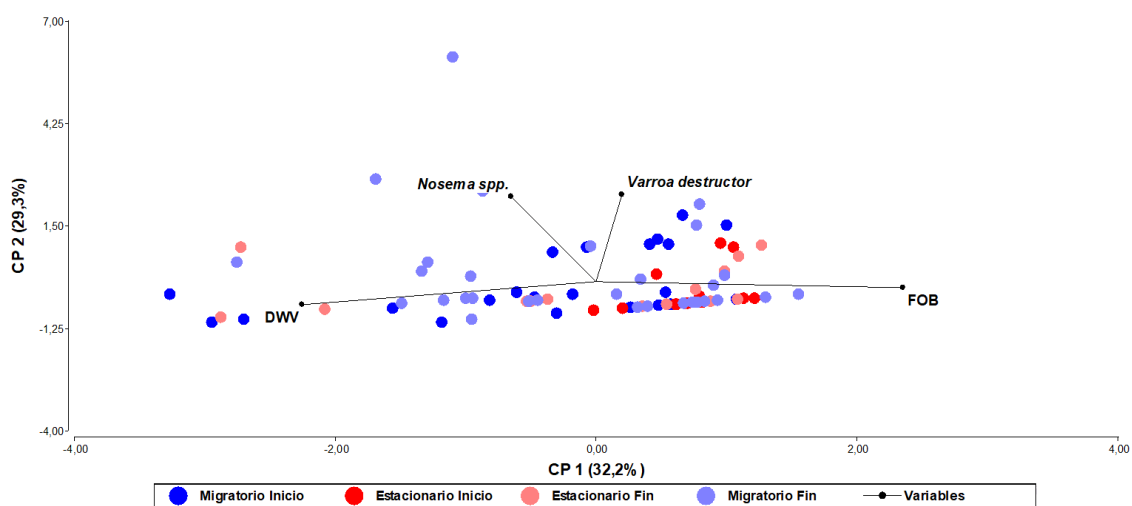
Cebadores:

Virus	Cebador	fragmento	Secuencia del cebador
DWV	Fv	RdRp	TTCATTAAAGCCACCTGGAACATC
DWV	Rv	RdRp	TTTCCTCATTAAGTGTGTCGTTGA
ABPV	Fv	RdRp	TCATACCTGCCGATCAAG
KBV- ABPV- IAPV	Rv	RdRp	CTGAATAATACTGTGCGTATC
KBV	Fv	RdRp	CCATACCTGCTGATAACC
IAPV	Fv	RdRp	CCATGCCTGGCGATTAC
BQCV	Fv	RdRp	AGTGGCGGAGATGTATGC
BQCV	Rv	RdRp	GGAGGTGAAGTGGCTATATC
CBPV	Fv	VP1	CAACCTGCCTCAACACAG
CBPV	Rv	VP1	AATCTGGCAAGGTTGACTGG
SBV	Fv		TTGGAACCTACGCATTCTCTG
SBV	Rv		GCTCTAACCTCGCATCAAC

F-Cargas virales en función de la categoría de la colmena:

Manejo	Temporada	Categoría	Total de colmenas	%+	Total de Positivos	Media CV (log ₁₀ copias génicas/μl)
Migratorio	Inicio	C1	18	83,33	15	5,24
		C2	-	-	-	-
		C3	11	90,9	10	6,12
	Fin	C1	25	64	16	4,22
		C2	12	58,33	7	3,85
		C3	13	76,92	10	4,13
Estacionario	Inicio	C1	31	48,38	15	3,69
		C2	3	0	0	-
		C3	-	-	-	-
	Fin	C1	21	52,3	11	4,22
		C2	3	100	3	3,88
		C3	8	37,5	3	6,36

G-PCR Análisis de Componentes Principales Global:



PCA global: Explica un 61,5 % de la variabilidad total del análisis del conjunto de datos, incluyendo los datos recolectados para apiarios migratorios y estacionarios durante el inicio y fin de temporada.

ANEXO II: ENCUESTAS UTILIZADAS EN LOS MUESTREOS.

Formularios utilizados al momento de realizar los muestreos en apiarios migratorios y estacionarios (Temporada 2018-2019).

Encuesta de manejo:

Realiza monitoreo de *Varroa destructor* NO..... SI.....
 Fecha.....
 Realiza control de *Varroa destructor* NO..... SI.....
 Otoño 2018. Fecha.....
 Origen del producto: Comercial..... Artesanal.....

Principio activo: Oxálico..... Timol..... Amitraz..... Flumetrina.....
Otro.....

Primavera 2018. Fecha.....

Origen del producto: Comercial..... Artesanal.....

Principio activo: Oxálico..... Timol..... Amitraz..... Flumetrina.....
Otro.....

Realiza recambio de reina NO..... SI.....

Qué utiliza? Celda real..... Reina fecundada..... Otro.....

Con Qué frecuencia recambia? Anual..... Bianaual..... Más de 2 años.....
Nunca.....

Recambia cuadros de la cámara de cría? NO..... SI.....

Menos del 30% por año.....

30% por año.....

Más del 30% por año.....

Alimenta con sustitutos proteicos? NO..... SI.....

Origen del producto Comercial.....

Nombre.....

Fabricación Propia Ingredientes:

Alimenta con sustitos energéticos? NO..... SI.....

Con qué alimenta? Jarabe de azúcar.....

Jarabe de maíz de alta fructosa.....

Azúcar:.....

Otro:.....

Registro dentro del apiario:

Fecha: Hora: N° colmenas

Apiario/ Nombre del apicultor:

Número Colmena	Cuadros con abejas	Categoría	Cuadros con cría	Miel				Pan de polen				Muestra VA		Muestra V		Otro Insecto	Observaciones
				MB	B	R	M	MB	B	R	M	si	no	si	no		
1	CA	Cat.	CC														
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	

En observaciones:

Indique en caso de ver la presencia de otros insectos dentro de la colmena.

Indique en caso de observar abejas muertas en la piquera, con dificultad de vuelo, alas deformadas, temblorosas o presencia de *Varroa destructor*.

Registre si en el apiario se detectan colmenas muertas.

MIEL:

*MB: muy bueno (más de dos cuadros de miel en el alza de cría).

*B: bueno (al menos dos cuadros de miel en el alza de cría).

*R: regular (un cuadro de miel en el alza de cría).

M: malo (1/4 del cuadro presenta miel en el alza de cría).

PAN DE POLEN:

*MB: muy bueno (dos cuadros completos de polen en la cámara de cría).

*B: bien (cuadro completo de polen en la cámara de cría).

*R: regular (corona de polen rodeando al menos 3 cuadros de cría).

*M: malo (ausencia de polen o un cuadro de cría presentando corona de polen).

*VA: muestra recolectada para la detección de virus.

*V: muestra recolectada para la detección de *Varroa destructor* forético.

ANEXO III: SECUENCIAS DEL VIRUS DE ALAS DEFORMADAS (DWV) UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.

Genomas completos

ID Secuencia	Variante DWV	Origen	Tipo de secuencia
MT747987	DWV-REC	Italia	genoma completo
MN538210	DWV-REC	Países Bajos	genoma completo
MT940256	DWV-REC	USA	genoma completo
HM067438	DWV-A	UK	genoma completo
MW397639	DWV-A	Israel	genoma completo
MZ821829	DWV-A	China	genoma completo
MT096518	DWV-A	España	genoma completo
MH267695	DWV-A	Suecia	genoma completo
MH069506	DWV-A	USA	genoma completo
MW265929	DWV-A	Siria	genoma completo
MF770715	DWV-A	China	genoma completo
JX878305	DWV-A	Corea	genoma completo
MZ821831	DWV-A	China	genoma completo
MF036686	DWV-A	China	genoma completo
MF623172	DWV-A	Nueva Zelanda	genoma completo
OL803822	DWV-A	República Checa	genoma completo
AJ489744	DWV-A	Italia	genoma completo
KJ437447	DWV-A	UK	genoma completo
MZ821819	DWV-A	China	genoma completo
KU847397	DWV-A	Austria	genoma completo

AY292384	DWV-A	USA	genoma completo
MG831204	DWV-A	USA	genoma completo
JQ413340	DWV-A	Chile	genoma completo
MN538208	DWV-A	Nueva Zelanda	genoma completo
MT096529	DWV-A	España	genoma completo
KX373899	DWV-A	USA	genoma completo
MT636323	DWV-A	Suecia	genoma completo
MT636317	DWV-A	Suecia	genoma completo
KY909333	DWV-A	Italia	genoma completo
JX661661	DWV-A	UK	genoma completo
GU109335	DWV-A	UK	genoma completo
KC249926	DWV-A	UK	genoma completo
JF440525	DWV-B	Israel	genoma completo
KC786222	DWV-B	China	genoma completo
KX783225	DWV-REC	Bélgica	genoma completo
AY251269	DWV-B	Países Bajos	genoma completo
OR597290	DWV-A	Argentina*	genoma completo
OR745302	DWV-A	Argentina*	genoma completo
OR553510	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553511	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553512	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553513	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553514	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553515	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553516	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553517	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553518	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553519	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553520	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553521	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553522	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553523	DWV-A	Argentina*	Fragmento

OR553524	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553525	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553526	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553527	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553528	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553529	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553530	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553531	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553532	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553533	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553534	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553535	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553536	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553537	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553538	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553539	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553540	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553541	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553542	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553543	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553544	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553545	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553546	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553547	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553548	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553549	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553550	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553551	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553552	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553553	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553554	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553555	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553556	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553557	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553558	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553559	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553560	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553561	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553562	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553563	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553564	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553565	DWV-A	Argentina*	Fragmento

OR553566	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553567	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553568	DWV-A	Argentina*	Fragmento
OR553569	DWV-A	Argentina*	Fragmento

* Secuencias caracterizadas en este trabajo.

Secuencias analizadas por SANGER

DWV/Host-Wt/ARG/Strain/year	COD	Manejo	Muestra	Año	Nº GenBank
DWV-BEE wt-ARG-BA 27-2015*	27	Estacionario	Abeja	2015	OR553510
DWV-BEE wt-ARG-BA 33-2015*	33	Estacionario	Abeja	2015	OR553511
DWV-BEE wt-ARG-BA 58-2015*	58	Estacionario	Abeja	2015	OR553512
DWV-BEE wt-ARG-BA 69-2015*	69	Estacionario	Abeja	2015	OR553513
DWV-BEE wt-ARG-BA 93-2015*	93	Estacionario	Abeja	2015	OR553514
DWV-BEE wt-ARG-BA 103-2015*	103	Estacionario	Abeja	2015	OR553515
DWV-BEE wt-ARG-BA 105-2015*	105	Estacionario	Abeja	2015	OR553516
DWV-BEE wt-ARG-BA 108-2015*	108	Estacionario	Abeja	2015	OR553517
DWV-BEE wt-ARG-BA 194-2015*	194	Estacionario	Abeja	2015	OR553518
DWV-BEE wt-ARG-BA 203-2015*	203	Estacionario	Abeja	2015	OR553519
DWV-MITE wt-ARG-ER 243-2018*	243	Migratorio	Varroa	2018	OR553520
DWV-MITE wt-ARG-ER 246-2018*	246	Migratorio	Varroa	2018	OR553521
DWV-BROOD wt-ARG-ER 247-2018*	247	Migratorio	Cría	2018	OR553522
DWV-MITE wt-ARG-ER 248-2018*	248	Migratorio	Varroa	2018	OR553523
DWV-BROOD wt-ARG-ER 249-2018*	249	Migratorio	Cría	2018	OR553524
DWV-MITE wt-ARG-ER 250-2018*	250	Migratorio	Varroa	2018	OR553525
DWV-BROOD wt-ARG-ER 251-2018*	251	Migratorio	Cría	2018	OR553526
DWV-BROOD wt-ARG-ER 255-2018*	255	Migratorio	Cría	2018	OR553527
DWV-MITE wt-ARG-ER 256-2018*	256	Migratorio	Varroa	2018	OR553528
DWV-MITE wt-ARG-ER 265-2018*	265	Migratorio	Varroa	2018	OR553529
DWV-MITE wt-ARG-ER 269-2018*	269	Migratorio	Varroa	2018	OR553530
DWV-BROOD wt-ARG-ER 278-2018*	278	Migratorio	Cría	2018	OR553531

DWV-MITE 279-2018*	wt-ARG-ER	279	Migratorio	Varroa	2018	OR55353 2
DWV-BROOD 280-2018*	wt-ARG-ER	280	Migratorio	Cría	2018	OR55353 3
DWV-BEE 304-2018*	wt-ARG-ER	304	Migratorio	Abeja	2018	OR55353 4
DWV-BEE 306-2018*	wt-ARG-ER	306	Migratorio	Abeja	2018	OR55353 5
DWV-BEE 308-2018*	wt-ARG-ER	308	Migratorio	Abeja	2018	OR55353 6
DWV-BEE 313-2018*	wt-ARG-ER	313	Migratorio	Abeja	2018	OR55353 7
DWV-BEE 319-2018*	wt-ARG-ER	319	Migratorio	Abeja	2018	OR55353 8
DWV-BEE 320-2018*	wt-ARG-ER	320	Migratorio	Abeja	2018	OR55353 9
DWV-BEE 321-2018*	wt-ARG-ER	321	Migratorio	Abeja	2018	OR55354 0
DWV-BROOD 325-2018*	wt-ARG-ER	325	Migratorio	Cría	2018	OR55354 1
DWV-MITE 326-2018*	wt-ARG-ER	326	Migratorio	Varroa	2018	OR55354 2
DWV-BROOD 329-2018*	wt-ARG-ER	329	Migratorio	Cría	2018	OR55354 3
DWV-BEE 333-2018*	wt-ARG-ER	333	Migratorio	Abeja	2018	OR55354 4
DWV-BROOD 378-2018*	wt-ARG-ER	378	Estacionari o	Cría	2018	OR55354 5
DWV-BEE 341-2018*	wt-ARG-ER	341	Estacionari o	Abeja	2018	OR55354 6
DWV-BEE 342-2018*	wt-ARG-ER	342	Estacionari o	Abeja	2018	OR55354 7
DWV-BEE 344-2018*	wt-ARG-ER	344	Estacionari o	Abeja	2018	OR55354 8
DWV-BEE 401-2019*	wt-ARG-ER	401	Migratorio	Abeja	2019	OR55354 9
DWV-BEE 407-2019*	wt-ARG-ER	407	Migratorio	Abeja	2019	OR55355 0
DWV-BEE 445-2019*	wt-ARG-ER	445	Migratorio	Abeja	2019	OR55355 1
DWV-BEE 446-2019*	wt-ARG-ER	446	Migratorio	Abeja	2019	OR55355 2
DWV-BROOD 603-2019*	wt-ARG-ER	603	Migratorio	Cría	2019	OR55355 3
DWV-BROOD 604-2019*	wt-ARG-ER	604	Migratorio	Cría	2019	OR55355 4
DWV-BEE 458-2019*	wt-ARG-ER	458	Estacionari o	Abeja	2019	OR55355 5
DWV-BEE 464-2019*	wt-ARG-ER	464	Estacionari o	Abeja	2019	OR55355 6
DWV-BEE 466-2019*	wt-ARG-ER	466	Estacionari o	Abeja	2019	OR55355 7
DWV-BROO 665-2019*	wt-ARG-ER	665	Estacionari o	Cría	2019	OR55355 8

DWV-BROOD wt-ARG-ER 667-2019*	667	Estacionario	Cría	2019	OR553559
DWV-MITE wt-ARG-ER-668-2019*	668	Estacionario	Varroa	2019	OR553560
DWV-BROOD wt-ARG-ER 669-2019*	669	Estacionario	Cría	2019	OR553561
DWV-MITE wt-ARG-ER 670-2019*	670	Estacionario	Varroa	2019	OR553562
DWV-POLEN-wt-ARG-ER-P1-2019*	P1	Estacionario	Polen	2019	OR553563
DWV-POLEN wt-ARG-ER-P4-2019*	P4	Migratorio	Polen	2019	OR553564
DWV-POLEN-wt-ARG-ER-P5-2019*	P5	Migratorio	Polen	2019	OR553565
DWV-POLEN-wt-ARG-ER-P6_151-2019*	P6	Migratorio	Polen	2019	OR553566
DWV-POLEN-wt-ARG-ER-P11-2019*	P11	Migratorio	Polen	2019	OR553567
DWV-POLEN-wt-ARG-ER-P14-2019*	P14	Migratorio	Polen	2019	OR553568
DWV-POLEN-wt-ARG-ER-P31-2019*	P31	Estacionario	Polen	2019	OR553569

* Secuencias caracterizadas en este trabajo.

ANEXO IV: GEORREFERENCIACIÓN DE LOS APIARIOS MIGRATORIOS Y ESTACIONARIOS.

ZONA	Temporada	Periodo	Manejo	Apiario	Coordenadas
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante norte	V1	(-30.8039860,-57.9190780)
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante norte	V4	(-30.7801630,-57.8964600)
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante norte	V2	(-30.8114320,-57.9228860)
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante norte	V3	(-30.8307882,-57.8874963)
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante sur	V5	(-30.8620820,-57.9214390)
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante sur	V6	(-30.8729817,-57.9227469)
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante sur	V7	(-30.8866112,-57.9637294)
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante sur	V8	(-30.8473719,-57.8863436)
Villa del Rosario	INICIO	sept-Nov	Trashumante sur	V9	(-30.8661501,-57.8971774)
Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante norte	V1	(-30.5103310,-59.0336360)
Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante norte	V4	(-30.4918819,-59.0292088)
Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante norte	V2	(-29.8511600,-57.3997050)

Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante norte	V3	(-29.8319628,-57.3498287)
Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante sur	V5	(-32.4265640,-59.5422670)
Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante sur	V6	(-32.4265640,-59.5422670)
Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante sur	V7	(-32.4330660,-59.5424833)
Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante sur	V8	(-32.3944667,-59.7597617)
Villa del Rosario	Migración *	Dic-Feb	Trashumante sur	V9	(-32.3949624,-59.7779752)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante norte	V1	(-30.8039860,-57.9190780)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante norte	V4	(-30.7801630,-57.8964600)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante norte	V2	(-30.8114320,-57.9228860)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante norte	V3	(-30.8307882,-57.8874963)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante sur	V5	(-30.8620820,-57.9214390)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante sur	V6	(-30.8729817,-57.9227469)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante sur	V7	(-30.8866112,-57.9637294)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante sur	V8	(-30.8473719,-57.8863436)
Villa del Rosario	FIN	Feb-sept	Trashumante sur	V9	(-30.8661501,-57.8971774)
Macia	INICIO	sept-Feb	Sedentario	M1	(-32.1797437,-59.3616498)
Macia	INICIO	sept-Feb	Sedentario	M2	(-32.1610574,-59.2900670)
Macia	INICIO	sept-Feb	Sedentario	M3	(-32.1805803,-59.4054419)
Macia	INICIO	sept-Feb	Sedentario	M4	(-32.1074373,-59.2847569)
Macia	INICIO	sept-Feb	Sedentario	M5	(-32.1143083,-59.2915908)
Macia	INICIO	sept-Feb	Sedentario	M6	(-32.1989811,-59.2735992)
Macia	FIN	Mar-sep	Sedentario	M1	(-32.1797437,-59.3616498)
Macia	FIN	Mar-sep	Sedentario	M2	(-32.1610574,-59.2900670)
Macia	FIN	Mar-sep	Sedentario	M3	(-32.1805803,-59.4054419)
Macia	FIN	Mar-sep	Sedentario	M4	(-32.1074373,-59.2847569)
Macia	FIN	Mar-sep	Sedentario	M5	(-32.1543704,-59.4042748)
Macia	FIN	Mar-sep	Sedentario	M6	(-32.1989811,-59.2735992)

(*): Momento de migración a bosques nativos de apiarios Trashumantes, en este periodo no se realizaron tomas de muestras . La ubicación geográfica permite identificar los momentos migratorios durante la temporada 2018-2019.

ANEXO V: GENOMAS COMPLETOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO

Secuencias de los genomas completos obtenidos en este trabajo a partir de muestras sintomáticas y asintomáticas para el DWV-A.

>DWV_A_ARG_ER334_sintomatica

```
TACGTATTGATCATTTTTATAATGACTTGCGTAGCATGAGCTACTATAATGTTTGTT
CATGGCTACTATCTAAAATTGTTAGTTGCACCGTAATTCGCTATGGGGGGCGATTT
ATGCCTTCCATAGCGAATTACGGTGCAACTAACAAATTTAGATAGTAGCCATGAAC
AAACATTATAGTAGCTCACTACGTATTGATCATTTTTATAATGACTTGCGTAGCATG
AAGCGCATGTTTGTTAGTTGTAAGTATGTTACTTTGCAAGTTGGAGTTTACTATTTTG
GATTATGAATATGTGCACTTAGTGTCTGTATTTATAGTCGTTTGTGGTTCAAGGTTT
TGTGTTAGTAGTACACTTATGTATGAATGTACCTTTGGTATGAATGTTATAGAATGA
CAATATCGAAAGAAAAATCTTTATAAAATACAAAAATATTGTTTTTATTATTTTCGATA
TGGTGTTTTATAGAGTAGATTGCCATGTGACCGCTCATAGAAGTCCATTATGGTTT
ATCAATCGAAGTCGAATGTATTTATAAGAATATTATACTTAATTAGTAATATTAGTAG
TCCGTAAGTATTATCATCCTTTTACAGTTTGATGTGATAATAGACCACTGCAGTATC
GAGTAGAGTTTCAAATGCGTAGTGCAATAGTACAATCACTGTCACCGACCATCTAT
TGTAATGATAGGTCTGTGCGAAACCATTATTTATGAAGTGACTAGCAATCATGGAT
TAAATTAGATGGTATTCTAGTTTATAGAGGTGATTGCGCGCTGCGGTGCGACTGAAA
CTTCTAAATTAGCATGTCAGATTGTATTATGAATGCGTTAGTAGTAATTTCTGCGAT
AGAGCTGGGACCCCTCAGTCTCTCAGGTATTGTATGAGGCGAAAGTGTGAAAGTT
TTGTATGTGTTTTTATATGTACGACTGTATCGGGACTTCCTTTAGCAAGAATCCTTT
TAATACAGTATAATTCGTGCTACGGTACGTTACGTTTCGCAGGGCACCCGTTAATGT
CTCATAGCCCAGACGATGACGGATGGAAAGACATCATATTTTATTTTAATGCTGTC
TTTATTGCTGATTTATTTTGCTGTTTTTATTTGCTATTTTATATTTGCTGATTTTCATT
ATTGCGAAATATATTGCTTTGCTATTCTTATTATATACGTTAGATTCAATTTTATTTT
CTTATATTTTCAATTTAAGTTTGATTTTGAAGGTAAATATATATAATTAATTATTAATA
ATGGCCTTTAGTTGCGGAAGTCTTTCTTACTCTGCCGTCGCCCAAGCTCCGTCTGT
CGCCTACGCACCTCGTACGTGGGAAATTGATGAAGCTAGGCGGCGCCGAGTCAT
TAAACGTTTGGCGCTGGAGCAAGAACGTATTCGTAACGTTCTTGACGTTGACGTC
TATAACCAAGCGACATGGGAACAGGAGGACGCACGCGATAATGAGTTTCTAACG
GAACAATTAATAATTTATATACTATTTATTCGATTGCTGAACGTTGTACGCGTCGG
CCCATCAAAGAGCACTCTCCTATATCAGTTTTCGAATAGGTTTGCCCCACTGGAATC
CCTCAAGTTCGAAATCGGGCAAGAAGCAAGCGAATGTATATTTAAGAAACCCAAAT
ATACGCGCGTTTGCAAGAAAGTGAAGCGTGTGCAACTCGCTTCGTTTCGCGAAAA
AGTTGTTTCGTCCTATGTGTCCAGATCCCCTATGCTATTGTTTAAGCTTAAGAAAAAT
TATTTATGACTTGCATTTATATAGGTTAAGAAAACAGATTAGGATGTTGAGACGTCA
AAACAGCGCGATTATGAGTTAGAGTGTGTCACTAATCTGTTACAATTATCGAATC
CGGTGCAGGCAAAACCAGAGATGGATAACCCTAATCCAGGACCTGATGGTGAGG
GTGAAGTTGAATTAGAAAAAGATAGTAACGTCGTTTTAACAACTCAGCGAGATCCT
AGCACGTCTATTCCAGCGCCGGTGAGCGTAAATGGAGTAGATGGACTAGTAATG
ATGTAGTAGATGATTATGCCACAATCACATCTCGATGGTATCAAATTGCTGAATTT
GTTTGGTTCGAAGGATGATCCGTTTGATAAGGAATTGGCACGTTTAATTTTGCTCG
TGCGTTGTTATCTAGTATAGAGGCTAATTCCGATGCTATTTGTGATGTGCCTAACA
CTATCCCATTTAAGGTGCACGCATATTGGCGAGGCGATATGGAAGTTAGAGTTCA
AATTAATTCAAATAAATTCGAAGTTGGTCAATTACAAGCTACTTGGTATTATTCGGA
TCATGAAAATTTGAATATATCGTCTAAGAGAAGCGTTTATGGATTTTCACAAATGGA
TCATGCTTTGATTAGTGCGTCAGCAAGTAACGAAGCAAAATTAGTTATTCCGTTTA
AGCATGTTTATCCATTTTTACCGACAAGAATTGTGCCAGATTGGACTACTGGCATT
```

TTAGATATGGGTGCTTTGAACATTCGTGTAATTGCTCCCTTACGGATGAGCGCTAC
TGGTCCAACACTACTTGTAAATGTCGTCGTGTTTATTAATAATAACAGCGAGTTTAC
AGGAACTTCTTCTGGTAAGTTTTACGCAAGCCAAATCAGGGCAAACCTGAGATG
GATCGTATATTAATTTGGCAGAGGGATTGTTGAATAATACGATTGGTGGTAACAA
TATGGATAATCCTTCTTACCAACAATCTCCTCGTCATTTTGTCCCGACTGGTATGC
ATAGTTTtagctTTAGGTACTAATTTAGTTGAACCATTACATGCATTACGTTTGGATG
CGGCTGGTACGACACAACATCCTGTAGGTTGTGCTCCTGATGAAGATATGACTGT
ATCCTCTATAGCATCTCGATACGGACTAATTAGACAGATAACAATGGAAGAAAGATC
ATGCTAAAGGATCACTTTTGTACAATTAGATGCTGATCCATTTGTGGAGCAAAGA
ATTGAAGGTACGAACCCGATATCTCTGTATTGGTTCGCACCCGTGGGTGTAGTAT
CTAGTATGTTTATGCAATGGCGTGGTTCATTAGAATATAGGTTTGATATTATAGCAT
CCCAATTTCACTAGGTAGATTAATTGTAGGTTATGTGCCTGGTTTGACAGCGTCT
TTGCAACAGCAAATGGACTATATGAAGTTGAAGTCATCAAGTTATGTAGTATTTGAT
TTGCAAGAAAGTAATAGCTTTACTTTGAGGTACCATATGTTTCATATAGACCATGG
TGGGTGCGTAAGTATGGTGGCAATTATTTACCCTCGTCAACTGACGCTCCTAGTA
CATTGTTTATGTATGTGCAGGTCCCGTTGATACCTATGGAAGCTGTTTCAGATACC
ATCGATATTAATGTGTACGTACGGGGCGGTAGATCATTGAAGTTTGTGTTCCAGT
CCAACCTAGCTTAGGTTTGAATTGGAATACAGACTTTATTTTACGTAATGACGAAG
AATACAGGGCTAAGACAGGTTATGCACCATATTATGCTGGAGTGTGGCATAGCTTT
AATAATAGTAATTCTCTTGTTTTTAGGTGGGGATCTGCTTCTGATCAAATTGCTCAG
TGGCCGACAATTTCAGTACCAAGAGGTGAGCTAGCTTTCTTACGAATTAGGGATG
GAAAGCAAGCTGCTGTAGGAACCTCAACCTTGGCGTACGATGGTTGTTTGGCCTTC
TGGTCATGGTTATAATATTGGTATACCTACGTATAATGCTGAACGAGCTCGCCAGC
TTGCTCAACACTTATATGGTGGTGGATCATTAAGTATGAGAAGGCCAAACAATTA
TTTGTTCCTGCTAATCAACAAGGACCTGGCAAAGTAAGTAATGGAAATCCGGTATG
GGAAGTTATGCGTGCACCGTTGGCAACGCAGCGTGCGCATGTTCAAGATTTTGAA
TTTATTGAAGCTATTCCAGAAGGAGAGGAGTCTCGTAACACTACAGTCTTGGATAC
GACCACTACTTTACAGTCGAGTGGATTTGGTCGCGCCTTCTTTGGAGAAGCTTTTA
ATGATCTTAAACGTTAATGCGACGATATCAATTATATGGTCAATTATTATTGTCCG
TTACTACGGATAAGGATATTGATCATTGTATGTTTACCTTCCCTTGTTTACCACAAG
GGTTAGCGTTAGACATTGGTTCTGCTGGCTCTCCACATGAAATCTTTAATAGATGT
CGTGATGGTATTATACCATTAATTGCATCTGGATATAGATTTTATAGAGGAGATTG
CGTTATAAGATTGTTTTTCCAAGTAATGTTAATAGCAACATTTGGGTACAACATCGA
CCGGATCGTAGACTAGAAGGATGGTCCGCGGCTAAGATTGTAAATTGTGATGCTG
TGTCTACTGGTCAAGGGGTGTATAATCATGGTTATGCTAGTCACATTCAAATTACG
CGTGTAATAATGTTATAGAATTGGAAGTTCCATTTTATAATGCTACTTGTTATAATT
ATTTACAGGCGTTTAATGCGTCTAGCGCTGCATCTAGTTATGCAGTATCTTTAGGA
GAAATATCGGTTGGTTTTCAAGCTACGAGTGATGACATTGCATCTATTGTTAATAAA
CCTGTTACTATTTATTATAGTATTGGAGATGGTATGCAGTTTTCTCAATGGGTTGGA
TATCAACCGATGATGATCCTAGACCAGCTTCTGCAACAGTAGTAAGGGCCGTGC
CTGAGGGCCCTATTGCGAAGATTAATAAACTTCTTCCATCAAACAGCCGACGAAGTT
AGAGAAGCTCAGGCAGCAAAGATGCGTGAAGATATGGGTGTGGTTGTCCAAGAT
GTTATTGGAGAACTTAGCCAGGCCATACCAGATCTTCAACAACCGGAGGTTCAAG
CAAATGTCTTCTCGCTGGTGTCTCAGTTAGTGCATGCTATTATAGGTACTAGTTTG
AAGACAGTTGCTTGGGCGATTGTTTCGATTTTTGTGACTTTAGGATTAATTGGACG
CGAAATGATGCATTCAGTTATTACTGTAGTCAAGCGGTTACTTGAGAAATATCACT
TGGCGACGCAACCCCAAGGAATCCGCCAGTTCAAGTACTGTTATATCTGCCGTTCC
AGAAGCTCCCAATGCTGAAGCGGAGGAGGCAAGTGCTTGGGTATCTATTATTTAT
AATGGTGTGTGTAATATGCTTAATGTGGCTGCTCAAAAACCGAAACAATTTAAAGA
TTGGGTAAAATTAGCTACTGTAGATTTTAGTAATAATTGTAGAGGTAGTAACCAGG
TATTTGTATTTTTTAAGAATACATTTGAAGTGTTGAAGAAAATGTGGGGTTATATTTT
TTGTCAGAGTAATCCTGCAGCGCTTTGTTGAAAGCTGTGAATGACGAGCCTGAA
ATTCTGAAAGCATGGGTGAAAGAATGTCTGTATTTGGATGATCCCAAATTCAGAAT
GCGTCGAGCGCATGATCAAGAGTATATCGAGAGAGTGTTTGCGGCACATTCATAT
GGACAAATTCTGCTACATGATTTAACTGCTGAAATGAATCAATCACGAAATTTGAG

TGTGTTTACACGTGTGTATGATCAAATTTCAAATTTGAAGACCGATCTTATGGAAAT
GGGATCGAATCCATATATAAGGCGTGAATGTTTTACGATATGCATGTGTGGTGCAT
CTGGAATTGGAAAATCATATTTGACCGATTCTTTATGCAGCGAGCTCTTACGTGCG
AGTCGTA CTCTGTGACAACAGGCATAAAATGTGTTGTTAATCCATTATCTGATTAT
TGGGATCAATGTGATTTTCAACCCGTTTTGTGCGTTGATGATATGTGGAGTGTGGA
AACATCCACTACGCTCGATAAGCAGTTGAATATGCTTTTCCAGGTTTATTCTCCTA
TCGTGCTTTCTCCTCCTAAAGCTGATTTAGAAGGTAAGAAAATGCGATATAACCCG
GAAATATTCATATACAATACGAATAAACCTTTCCCGAGGTTTGATCGCATTGCTATG
GAAGCTATTTATCGGCGTAGAAATGTTTTGATTGAATGTAAAGCGAATGAAGAGAA
GAAGCGAGGATGTAAGCATTGTGAGAATGATATCCCTATTGCTGAATGTAGTCCTA
AGATGCTAAAAGATTTTTCATCATATTAAATTTAGGTATGCACATGATGTATGTAATT
CCGAGACTACATGGTCTGAATGGATGACGTATAATGAATTTCTTGAATGGATAACT
CCTGTGTATATGGCTAACCGTCGTAAGGCGAATGAATCGTTTAAGATGCGTGTGG
ATGAAATGCAAATGTTACGTATGGATGAACCATTGGAAGGTGATAATATTCTCAAT
AAGTATGTTGAAGTCAATCAGCGTTTAGTGAGGAAATGAAGGCTTTTAAGGAGC
GTACGCTATGGTCGGATTTACATCGCGTAGGTGCGGAAATTAGTGCGTCAGTTAA
GAAAGCTTTGCCGACCATTTCATAACCGAAAAATTACCACATTGGACTGTTCAAT
GTGGTATCGCTAAACCTGAGATGGACCATGCTTATGAGGTTATGAGTTCGTATGC
AGCCGGAATGAATGCAGAGATTGAAGCGCATGAACAAGTTCGGCGTTCATCAGTG
GAATATGCAGAGCCTCAAGCTCCAAGAAATCCTGATGATGAAGGACCAACCATAG
ATGAAGA ACTTATGGGCGATACTGAATTTGCATCACAGGCTTTAGAACGTCTTGTG
GATGAAGGTTATATAACTGGAAAACAGAAGAAATATATAGCTACGTGGTGTAGTAA
GCGTCGTGAACATACTGGTGACTTTGATCTTGTGTGGACTGATAATTTGCGTGTGT
TAAGTGCGTATGTACACGAACGTTTCATCTTCAACTCGGCTTTCTACGGATGATGTT
AAGTTATATAAAACAATTAGCATGTTGCATCAAAAGTATGATACCACAGAGTGTGC
TAAATGTCAACATTGGTATGCTCCGTTGACTGATATCTACGTTGATGACAAGAAAT
TGTTTTGGTGTGAGAAAGAGAAAAAGACACTTATTGACGTCCGAAAATTGTGAGAA
GAAGATGTGACTGTTCAATCGAAATTGATTAATTTATCTGTTCTTTGTGGTGAAGT
GTGTATGTTACATTCAAAATATTTCAATTATCTTTTCCATAAAGCATGGTTGTTTGA
GAACCCAACTTGGCGCTTAATATATAATGGTACCAAGAAGGGTATGCCTGAGTACT
TTATGAATTGTGTGGATGAGATTTTATTAGATTCTAAATTTGGTAAAGTGAAAGTGT
GGTTGCAAGCGATCATTGATAAGTATTTAACTCGTCCTGTGAAAATGATTTCGTGAT
TTTCTTTTCAAGTGGTGGCCGCAAGTTGCGTATGTGTTGAGCTTGCTAGGTATAAT
TGGTATAACTGCGTATGAAATGAGAAATCCGAAACCAACTTCTGAGGAATTAGCTG
ATCATTATGTGAATAGGCATTGTAGCTCTGATTTTTGGTCAACAGGAATGGCAACA
CCTCAAGGATTGAAATATAGTGAAGCAGTAACAGCAAAGGCACCTCGAATCCATA
GATTGCCAGTTACTACTAAGCCTCAGGGGTCAACACAACAAGTAGACGCTGCTGT
GAATAAAATCTTACAGAACATGGTTTACATTGGTGTGTTTTCCCAAAGTGCCTG
GTAGTAAGTGGCGAGATATTAATTTTAGGTGTCTTATGCTTCATAATAGGCAATGTT
TAATGTTGAGGCATTATATTGAGTCGACTGCCGCCTTTCTGAGGGAACCAAGTA
CTATTTTAAGTATATTCAATCAAGAGACTAGAATGTCTGGTGATATTTCTGGTAT
TGAAATTGATTTATTGAATTTACCTAGATTGTATTATGGTGGTCTCGCGGGAGAGG
AGTCATTTGACAGCAATATTGTGCTTGTGACTATGCCTAATCGTATTCTGAGTGT
AAGAGCATTATTAATTTATAGCGTCACATAATGAACATATGCGTGCGCAGAAATGA
TGGAGTGTAGTA ACTGGCGATCATACTCAGCTATTGGCTTTTCGAGAATAATAATA
AGACTCCGATAAGTATCAATGCTGATGGTTTTGTATGAGGTTATACTTCAAGGAGTA
TATACTTATCCATACCATGGCGATGGTGTGTTGTGGTTTCGATATTGTTATCTCGGAA
TTTACAACGGCCAATTATAGGTATCCATGTTGCTGGTACTGAAGGATTGCATGGCT
TTGGAGTTGCTGAACCACTTGTACATGAAATGTTACCGGTAAAGCAATCGAGAGT
GAAAGAGAGCCGTATGATCGTGTGTATGAACTTCCGTTGCGTGAATTAGATGAAT
CTGATATTGGTTTAGATACCGATTTATATCCGATTGGTAAAGTGGATGCAAAGTTA
GCTCATGCTCAAAGCCCTTCTACTGGGATCAAAAAGACGCTTATTCATGGAACATT
TGATGTAAGGACTGAACCAAATCCGATGTCGTCACGTGATCCAAGAATAGCACCG
CATGATCCTTTAAAGTTAGGGTGTGAAAAGCATGGTATGCCTTGTTACCGTTTTAA
TAGGAAACATCTGGAATTAGCGACAAATCATTGAAAGAAAAATTAGTTTCGGTAG

TTAAACCAATAAATGGTTGCAAGATTAGAAGTTTGCAAGATGCTGTATGTGGTGTA
CCTGGTGTGGATGGGTTTGATTTCGATATCTTGAATACTAGTGCTGGTTTTCTTT
GTCTTCATTAAAGCCACCTGGAACATCAGGTAAGCGATGGTTGTTTGACATTGAGC
TACAAGATTCGGGATGTTATCTTTGCGTGGAATGCGTCCCGAACTTGAGATTCAA
TTATCAACGACACAGTTAATGAGGAAAAAGGGAATAAAACCTCACACTATATTCAC
GGATTGTTTGAAAGATACTTGTGCTGTGGAAAAATGTAGAATACCTGGTAAGA
CTAGAATATTTAGTATAAGTCCGGTACAGTTTACTATACCGTTTAGACAGTATTACT
TAGATTTTATGGCATCCTATCGAGCTGCGCGACTTAATGCTGAGCATGGTATTGGT
ATTGATGTTAACAGCTTAGAATGGACAAATTTGGCAACAAGTTTGTCAAAGTATGG
CACTCATATCGTGACGGGTGACTATAAGAATTTTGGCCCCGGATTAGATTCCGAT
GTTGCAGCTTCGGCGTTTCGAGATTATTATCGACTGGGTATTACATTATACTGAAGA
AGATAATAAGATGAAATGAAGCGAGTAATGTGGACCATGGCGCAGGAGATTTTA
GCGCCTAGTCATCTATGTCGTGACTTAGTGTACCGAGTACCTTGTGGAATTCCATC
AGGTTCTCCGATAACGGACATTTTGAATACAATTTCAAATTGTCTGTTAATTAGGTT
AGCTTGGTTAGGTATTACTGATTTGCCGTTATCCGAATTCTCTCAAATGTTGTTCT
TGTCTGTTATGGTGACGATCTTATCATGAATGTTAGCGATAACATGATCGATAAGT
TTAATGCCGTGACGATAGGAAAATTCTTTTCACAATATAAGATGGAATTTACGGAT
CAGGATAAATCAGGAAATACTGTAAAGTGGCGGACGTTACAGACTGCTACTTTCTT
AAAACATGGGTTCTTAAAACATCCAACCTAGACCTGTGTTTCTAGCTAACCTGGACA
AGGTTTCGGTAGAAGGAACGACGAATTGGACCCATGCTCGAGGATTGGGTCGTC
GTACAGCAACTATAGAGAATGCTAAACAAGCGCTAGAGTTAGCATTTCGGATGGGG
TCCAGAATACTTTAACTATGTTAGAAATACTATCAAAATGGCTTTTGACAAGTTAGG
TATTTATGAAGATCTCATCACATGGGAAGAAATGGACGTTTCGATGTTATGCTAGCG
CGTAGTATTTAATTTTGAATACTCATTAGTTTTAATTTTATTTTAGGTTATTGGAATC
GAGGGAAGTACCACCCCCCAAGACCTTCGTTTTAAATCTACTAAGAGGAGTAAAC
CTATATATAAGAGTCTAAAGACAGAGTGGATTAGACCATCATCTTAGCTTATATGT
GGGGAAGGTTGAGTTGCCTCTAAAGACTCAGCTCCATAGTAGAGTAGTTTTAATTA
CGATTAAAGTGGTACTCTAGGTTAGGTGTTACTCGCGTATTATCAACTAGTGGTAA
TGCGTCCTAATTTTAGTATAGTTTTAACCATAATAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>DWV_A_ARG_ER308_asintomatica.

CCATAGCGAATTACGGTGCAACTAACAATTTTAGATAGTAGCCATGAACAAACATT
ATAGTAGCTCACTACGTATTGATCATTTTTATAATGACTTGCGTAGCATGAAGCGC
ATGCTTGTAGTTGTAACCTATGTTACTTTGCAAGTTGGAGTTTACTATCTTGATTAT
GAATATGTGCACTTAGTGTCTGTATTTATAGTCGTTTGTGGTTCAAGGTTTTGTGTT
AGTAGTACACTTATGTATGAATGTACCTTTGGCATGAATGTTATAGAATGACAATAT
CGAAGGAAAACTTTTATAAAATACAAAATATTGTTTTTATTATTTTCGATATGGTGT
TTTATAGAGTAGATTGCCATGTGACCGCTCATAGAAGTCCATTATGGTTTATCAAT
CGAAGTTGAATGTATTTATAAGGACATTATACTTAATTAGTAATATTAGTAGTCCGT
AACTATTATCATCCTTTTTTCAGTTTGATGTGATAATAGACCACTGCAGTATCGAGTA
GAGTTTCGAATGCGTAGTGCAATAGTATAATCACTGTCACCGACCATCTATTGTAA
CGATAGATCTGTCGGAACCATTATTTATGAAGTGACTAGCAATCATGGATTAAAT
TAGATGGTATTCTAGTTTAGAGGTGATTCGGCGCTGCGGTGCGACTGAAACTTCT
AAATTAGCATGTCAGATTATATTATGAATGCGTTAGTAGTAATTTCTGCGATAGAGC
TGGGACCCCTCAGTCTCTCAGGTATTGTACGAGGCGAAAGTGTAAGTTTTGTA
TGTGTTGTTATATGTACGACTGTATCGGGACTTCCTTTAGCAAGAATCCTTTTAATA
CAGTATAATTTGTGCTACGGTACGTTACGTTTCGAGGGCACCCGTTAATGTCTCAT
AGCCCAGACGATGACGGATGGAAAGACATCATATTTTATTTAATGCTGTCTTTATT
GCTGATTTATTTTGCTGTTTTTATTTGCTATTTTATATTTGCTAATTTTCATTATTGCG
AAATATATTACATTGCTATTTTTATTATATACGCTAGATTCAATTTTATTTTCTATA
TTTTCAATTTAACTTTGATTTTGAAGGTAAATATATATAATTAATTATTAATAATGGC
TTTTAGTTGTGGAACCTTTCTTACTCTGCCGTCGCCAAGCTCCGTCTGTGCGCT
ATGCACCTCGTACATGGGAGGTTGATGAAGCTAGGCGGCGCCGAGTCATTAAAC
GTTTGGCGCTGGAGCAAGAACGCATTCGTAACGTTCTTGACCTTGACGTCTATGC

CCAGGCGACATGGGAACAGGAGGACGCGCGCGATAATGAGTTCCTGATGGAACA
ATTAACAATTTATACACTATTTATTCGATCGCTGAACGTTGTACGCGTCGGCCTAT
CAAAGAGCACTCTCCTATATCAGTTTCGAATAGGTTTGCCCCATTGGAATCCCTCA
AGGTCGAGGTCGGTCAAGAAGCAGGCGAATGTATATTGAAGAAACCTAAATATAC
GCGCGTTTGTAAGAAAGTGAAGCGTGTTGCAACTCGCTTTGTTCTGTAAGAAAGTT
GCTCGTCCTATGTGCTCTAGATCCCCTATGCTATTATTTAAGCTTAAGAAAATTATT
TATGATTTGCATTTATATAGATTAAGAAAACAGATTAGGATGTTGAGACGTCAAAAA
CAGCGCGATTATGAGTTAGAGTGTGTCACTAATCTGTTACAAATATCGAATCCGGT
GCAGGCAAAACCAGAGATGGATAACCCTAATCCAGGACCTGATGGTGAGGGTGA
AGTTGAATTAGAAAAGGATAGTAATGTTGTTTTAACAACTCAGCGAGATCCTAGTA
CATCTATTCCAGCGCCGGTGAGCGTAAAATGGAGTAGATGGACTAGTAATGATGT
AGTAGATGATTACGCCACAATCACATCTCGATGGTATCAGATTGCTGAATTTGTTT
GGTCGAAGGATGATCCATTTGATAAGGAGTTAGCACGTTTAATTTTGCCTCGTGCA
TTGTTATCTAGTATAGAGGCTAATTCTGATGCTATATGTGATGTGCCTAATACCATC
CCATTTAAGGTACACGCATATTGGCGAGGCGATATGGAAGTTAGAGTTCAAATTA
TTCAAATAAATTCCAAGTTGGTCAATTACAAGCTACTTGGTATTATTCGGATCATGA
GAATTTGAATATATCGTCTAAGAGAAGCGTTTATGGATTTTCACAAATGGATCATG
CTCTGATTAGTGCGTCAGCAAGTAACGAGGCAAAATTAGTTATTCCGTATAAGCAT
GTTTATCCATTTTTACCGACAAGAATTGTGCCAGATTGGACTACTGGCATTCTAGA
TATGGGTGCTTTGAATATTCGTGTAATTGCTCCCTTACGGATGAGTGCTACTGGTC
CAACTACCTGTAATGTCGTCGTGTTTATTAAATTAATAACAGCGAGTTTACAGGG
ACTTCTTCTGGTAAGTTTTATGCGAGCCAAATCAGGGCAAAACCTGAGATGGATC
GTATATTAATTTAGCAGAAGGATTGTTGAATAACACGATTGGTGGTAATAATATG
GATAATCCTTCTTATCAACAATCTCCTCGCCATTTTGTCCCGACTGGTATGCACAG
CTTAGCTTTAGGTACTAATCTAGTTGAACCATTACATGCATTACGTTTGGATGCAG
CCGGTACAACACAACATCCTGTAGGTTGTGCTCCTGATGAAGATATGACTGTATCC
TCCATTGCATCTCGATATGGACTAATTAGACGGGTACAATGGAAGAAAGATCATGC
TAAAGGATCACTTTTGTTACAATTAGATGCTGATCCATTTGTGGAGCAAAGAATTG
AAGGTACGAATCCAATATCTTTGTATTGGTTCGCACCCGTGGGTGTAGTATCTAGT
ATGTTTATGCAATGGCGTGTTTCATTAGAATATAGGTTTGATATTATAGCATCCCAA
TTTCATACTGGTAGGTTAATTGTAGGCTATGTGCCCGGTTTGACAGCATCTCTGCA
ACTTCAAATGGACTATATGAAATTGAAGTCATCGAGTTATGTAGTATTTGATTTACA
AGAAAGTAATAGTTTCACTTTTGGAGTGCCTTATGTTTCATATAGACCATGGTGGG
TGCGTAAATATGGTGGCAATTATTTGCCTTCGTCAACTGACGCTCCTAGTACATTA
TTTATGTATGTGCAGGTTCCGTTGATACCTATGGAAGCTGTTTCAGATACTATTGAT
ATCAATGTGTACGTACGGGGCGGTAGTTCAATTTGAAGTTTGTGTTCCAGTCCAACC
TAGTTTAGGTTTGAATTGGAATACAGACTTTATTTTACGTAATGACGAAGAATACAG
AGCTAAGACAGGTTATGCACCATATTATGCTGGAGTGTGGCATAGCTTTAATAATA
GTAATTCTCTTGTTTTTAGGTGGGGATCTGCTTCTGATCAAATTGCTCAGTGCCCG
ACAATTTCAGTACCAAGAGGTGAGCTAGCTTTCTTACGAATTAAGGATGGAAAGCA
AGCTGCTGTAGGAACCAACCTTGGCGTACGATGGTTGTTTGGCCTTCTGGTCAT
GGTTATAATATTGGTATACCTACGTATAATGCTGAACGAGCTCGCCAGCTTGCACA
ACATTTATATGGTGGTGGATCATTAAGTATGAGAAGGCCAAACAATTATTTGTTT
CTGCTAATCAACAAGGACCTGGTAAGGTAAGTAATGGAAATCCGGTATGGGAAGT
TATGCGTGCAACATTGGCAACACAGCGTGCGCAAATTCAGATTTTGAATTTATTG
AAGCTATTCCAGAAGGAGAGGAGTCTCGTAATACTACAGTCTTGGATACGACCAC
TACTTTACAGTCGAGTGGATTTGGTCGCGCATTCTTTGGAGAAGCTTTTAATGATC
TTAAAACGTTAATGCGACGATATCAATTATATGGTCAATTATTATTGTCCGTTACTA
CGGATAAGGATATTGATCATTGTATGTTTACCTTCCCTTGCTTACCACAAGGGTTA
GCGTTAGACATTGGTTCTGCTGGCTCTCCACATGAAATCTTTAATAGATGTCGTGA
TGGTATTATACCATTAATTGCATCTGGATATAGATTTTATAGAGGAGATTTGCGTTA
TAAGATTGTTTTTCCAAGTAATGTTAATAGTAACATCTGGGTACAACATCGACCGG
ATCGTAGATTGGAAGGATGGTCCGCGGCTAAGATTGTAAATTGTGATGCTGTATCT
ACTGGTCAAGGGGTGTATAATCATGGTTACGCTAGTCACATTCAAATCACGCGTGT
AAATAATGTTATAGAATTGGAAGTTCCATTTTATAATGCTACTTGTATTAATTATTA

CAGGCGTTTAATGCGTCTAGCGCTGCATCTAGTTATGCAGTATCTTTAGGAGAAAT
ATCGGTTGGTTTTCAAGCTACAAGTGATGATATTGCAGCTATTGTTAATAAACCTGT
TACTATTTATTATAGTATTGGAGATGGTATGCAATTTTCTCAGTGGGTTGGATATCA
ACCGATGATGATCCTAGACCAGCTTCCTGCACCAGTAGTAAGGGCCGTGCCTGAG
GGCCCTATTGCGAAGATTA AAAA CTCTCCATCAAACAGCCGACGAAGTTAGAGA
AGCTCAGGCAGCAAAGATGCGAGAAGATATGGGTATGGTTGTTCAAGATGTTATT
GGAGAACTTAGCCAGGCCATACCGGATCTTCAACAACCGGAGGTTCAAGCAAATG
TTTTCTCACTGGTGTCTCAGTTAGTGCATGCTATTATAGGTACTAGTTTGAAGACA
GTTGCTTGGGCGATTGTTTTCGATTTTTGTGACTTTAGGATTAATTGGACGCGAAAT
GATGCATTCAGTTATTACTGTAGTCAAGCGGTTACTTGAGAAATATCACTTGGCGA
CGCAACCCCAGGAATCCGCCAGTTCAAGTACTGTTATATCTGCCGTTCCAGAAGC
TCCAATGCTGAAGCGGAGGAGGCAAGTGCTTGGGTATCCATTATTTATAATGGT
GTGTGTAATATGCTTAACGTGGCTGCTCAAAAACCGAAACAATTTAAAGATTGGGT
AAAATTAGCTACTGTAGATTTTAGTAATAATTGTAGAGGTAGTAACCAGGTATTTGT
ATTTTTCAAGAATACATTTGAAGTGCTAAAGAAAATGTGGGGTTATGTATTTTGTCA
GAGTAATCCTGCAGCGCGTTTGTTGAAAGCTGTGAATGACGAGCCTGAAATTTTG
AAAGCATGGGTGAAAGAATGTCTGTATTTGGATGATCCCAAATTTAGAATGCGTCG
AGCGCATGATCAAGAGTATATCGAGAGAGTGTTTGCGGCACATTCATATGGACAA
ATTCTGCTACATGATTTAACTGCTGAAATGAATCAATCACGAAATTTGAGTGTGTTT
ACACGTGTGTATGATCAAATTTCAAATTGAAGACCGATCTTATGGAAATGGGATC
GAATCCATATATAAGGCGTGAATGTTTTACGATATGCATGTGTGGTGCATCTGGAA
TTGGAAAATCATATTTGACCGATTCTTTATGCAGCGAGCTCTTACGTGCGAGTCGT
ACTCCTGTGACAACAGGCATAAAATGTGTTGTTAATCCATTATCTGATTATTGGGAT
CAATGTGATTTTCAGCCTGTTTTGTGCGTTGACGATATGTGGAGTGTTGAAACGTC
TACTACGCTCGATAAGCAGTTGAATATGCTTTTCCAGGTTTATTCCCCTATCGTGC
TTTCTCCTCCTAAAGCTGATTTAGAAGGTAAGAAAATGCGATATAACCCGGAAATA
TTCATATACAATACGAATAAACCTTTCCCGAGGTTTGATCGTATTGCTATGGAAGC
TATTTATCGGCGTAGAAATGTTTTAATTGAATGTAAAGCGAGTGAAGAGAAGAAGC
GAGGATGTAAGCATTGTGAGAATGATATTCCTATTGCTGAATGTAGTCCTAAGATG
TTGAAAGATTTTCATCATATTAATTTAGGTATGCACATGATGTATGTAATTCGAG
ACCACATGGTCTGAATGGATGACGTATAATGAATTTCTTGAATGGATAACTCCTGT
GTATATGGCTAATCGGCGTAAGGCGAATGAATCGTTTAAGATGCGTGTGGATGAA
ATGCAAATGTTACGTATGGATGAACCATTTGGAAGGTGATAATTTCTCAATAAGTA
TGTTGAAGTTAATCAGCGCTTAGTGAGGAAATGAAGGCATTTAAGGAGCGTACA
CTATGGTCAGATTTACATCGCGTAGGTGCGGAAATTAGTGCGTCAGTTAAGAAAG
CTTTACCAACTATTTCCATAACCGAAAACTACCACATTGGACTATTAGTGTGGTA
TTGCTAAACCTGAGATGGACCATGCTTATGAGGTTATGAGTTTCGTATGCAGCTGG
AATGAATGCAGAGATTGAAGCGCATGAACAGGTTTCGGCGTTCATCAGTGAATGT
CAATATGCAGAGCCTCAAGCTCCAAGAAATCCTGATGATGAAGGACCAACCATAG
ATGAAGAACTTATGGGCGACACTGAATTCACATCACAGGCTCTAGAACGTCTTGT
GGATGAAGGTTATATAACTGGAAAACAGAAGAAATATATAGCTACGTGGTGTAGTA
AGCGCCGTGAACACACTGCTGACTTTGATCTTGTGTGGACTGATAATTTGCGTGT
GTTAAGCGCGTATGTGCACGAACGTTTCATCTTCAACTCTACTTTCTACGGATGACG
TCAAGTTATATAAAACGATTAGCATGTTACATCAAAAGTATGATACTACGGAGTGT
GCTAAATGTCAACATTGGTATGCTCCGTTAACTGATATATATGTTGATGACAAGAA
ATTGTTCTGGCATCAGAAAGAGAAAAAGACACTTATTGATGTTGAAAATTGTGCA
AAGAAGATGTGACTGTTCAATCGAAATTGATTAATTTATCCGTTTCTTGTGGTGAA
GTGTGTATGTTACATTCAAATATTTCAATTATCTTTTCCATAAAGCGTGGTTGTTT
GAGAACCCAACTTGGCGCCTAATATATAATGGTACCAAGAAGGGTATGCCTGAAT
ACTTTATGAATTGTGTGGATGAAATTTCAATAGATTCCAAATTTGGTAAAGTGAAAG
TGTGGTTGCAAGCGATTATTGATAAGTATTTAACTCGTCCCGTGAAATGATTTCG
GATTTTCTTTTCAAGTGGTGGCCGCAAGTTGCGTATGTGTTGAGCTTGCTAGGTAT
AATTGGTATAACTGCGTATGAAATGAGAAATCCGAAACCAACTTCTGAGGAATTAG
CTGATCATTATGTAAATAGACATTGTAGCTCTGATTTTTGGTCACCAGGAATGGCA
ACACCTCAAGGATTGAAATATAGTGAAGCAGTAACAGCAAAGGCACCTAGAATCC

ATAGATTGCCAGTTACTACTAAGCCTCAGGGATCAACACAACAAGTAGACGCTGC
TGTGAATAAAATTTTACAGAATATGGTTTACATTGGTGTGTTTTCCCAAAAGTGCC
TGGTAGTAAGTGGCGAGATATTAATTTTAGGTGTCTTATGCTTCATAATAGGCAAT
GTTTGATGTTGAGGCATTATATTGAGTCGACTGCTGCCTTTCCTGAGGGAACCAA
GTACTATTTTAAGTATATTCATAATCAAGAGACTAGGATGTCTGGTGATATTTCTGG
TATTGAAATTGATTTGTTGAATTTACCTAGATTGTATTATGGTGGACTCGCGGGAG
AGGAGTCATTTCGATAGCAATATCGTGCTTGTGACTATGCCTAATCGTATTCCTGAG
TGTAAGAGCATTATTAATTTATAGCGTCACATAATGAACATATACGTGCTCAGAAT
GATGGAGTGTTAGTAAGTGGCGACCATCAGCTATTGGCTTTCGAGAATAATAA
TAAACTCCAATAAGCATCAATGCTGATGGTTTGTATGAGGTTATACTTCAAGGAG
TATACTTATCCATACCATGGCGATGGTGTGTTGTGGTTTCGATATTGTTATCTCGG
AATTTACAACGGCCAATTATAGGTATCCATGTTGCTGGTACTGAAGGATTGCATGG
TTTTGGAGTTGCTGAACCACTTGACATGAAATGTTACCCGGTAAAGCAATCGAGA
GTGAAAGAGAGCCGTATGATCGTGTGTATGAACTTCCATTGCGTGAATTAGATGAA
TCTGATATTGGTTTAGATACCGATTTATATCCGATTGGTAGAGTGGATGCAAACT
AGCTCATGCTCAAAGCCCTTCTACTGGGATTAAGGAGACGCTTATCCATGGAACT
TTGACGTAAGGACTGAACCAAATCCTATGTCATCACGTGATCCAAGAATAGCGCC
GCATGATCCTTTGAAGTTAGGGTGTGAAAAGCATGGCATGCCTTGTTACCGTTTA
ATAGGAAACATCTGGAAGTACGACAAATCATTTGAAGGAAAAATTAGTTTCGGTA
GTTAAACCAATAAATGGTTGCAAGATTAGAAGTTTGAAGATGCTGTATGTGGTGT
GCCTGGTTTAGATGGGTTTGATTGATATCTTGGAACTAGTGCTGGTTTTCTT
TGTCTTCATTAAAGCCACCTGGAACATCAGGTAAGCGATGGTTGTTTGACATTGAG
CTACAAGACTCGGGATGTTATCTTTGCGTGGAATGCGTCCCGAACTTGAGATCC
AATTATCAACGACACAGTTAATGAGGAAAAAGGGAATAAAACCTCACACTATATTC
ACGGATTGTTTGAAAGATACTTGTTTGCCTGTGGAAAAATGTCGAATACCTGGTAA
GACTAGAATATTTAGCATAAGTCCGGTACAGTTTACTATACCGTTTAGACAGTATTA
CTTAGATTTTATGGCATCCTATCGAGCTGCACGACTTAATGCCGAGCATGGCATTG
GTATTGATGTTAACAGCTTAGAATGGACTAATTTGGCAACAAGTTTGTCAAAGTAC
GGCACTCATATCGTGACGGGTGACTATAAAATTTTGGCCCTGGATTAGATTCCGA
TGTTGCAGCTTCGGCATTTCGAAATTATTATTGACTGGGTATTGCATTATACTGAAG
AAGATAATAAAGACGAAATGAAGCGAGTAATGTGGACCATGGCGCAGGAGATTTT
GGCGCCTAGTCATCTATGTCGTGATTTAGTGTACCGAGTGCCTTGTTGGAATTCCAT
CAGGTTCTCCGATAACGGACATTTTGAATACAATTTCAAATTGTCTGTTAATCAGGT
TAGCTTGGTTAGGTATTACTGATTTGCCTTTATCCGAATTCTCTCAAATGTTGTTT
TTGTTTGTTATGGTGATGACCTCATCATGAATGTGAGTGATAACATGATTGATAAAT
TTAACGCTGTGACAATAGGGAAATCTTTTACAATATAAGATGGAATTTACGGAT
CAAGACAAATCAGGAAATACCGTGAAGTGGCGGACGTTACAGACTGCTACTTTCT
TGAAGCATGGGTTTTTAAGACATCCAAGTACAGCTGTGTTTTTGGCTAACCTAGAC
AAGGTTTCAGTAGAAGGAACGACGAATTGGACCCATGCTCGAGGATTGGGTCGTC
GTGCGGCAACCATAGAGAATGCTAAACAAGCGCTAGAGTTAGCATTTGGATGGGG
CCCAGAATACTTTAACTATGTTAGAAGTACTATTAAATGGCTTTTGACAAGTTGGG
TATTTATGAAGACCTCATCACATGGGAAGAAATGGATGTTAGATGTTATGCTAGCG
CGTAGTATTTAATTTGAATACTCATTAGTTTTAATTTTATTTTAGGTTATTGGAATT
GAGGGAAGTACCACCCCCCAAGACCTTCGTTTTAAATCTACTAAAAGGAGTGAAC
CTATATATAAGAGTCTAAAGACAGAGTGGATTAGACCATCATCTTAGCTTATATAT
GGGGAAGGTTGAGTTGCCTCTAAAGACTCAGCTCCATAGTAGAGTAGTTTTAATTA
CGATTAAAGTGGTACTCTAGGTTAGGTGTTACTCGCGTATTATCAACTAGTGGTAA
TGCCTCCTAATTTTAGTATAGTTTTAACCATAATAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

PROTEINAS ESTRUCTURALES:

>ARG_334ER_LP

MAFSCGTLSSAVAQAPSVAYAPRTWEIDEARRRRVIKRLALEQERIRNVLDVDVYNQ
ATWEQEDARDNEFLTEQLNNLYTISIAERCTRRPIKEHSPISVSNRFAPLESCLKFEIGQ

EASECIFKKPKYTRVCKKVKRVATRFRVREKVVVRPMCPRSPMLLFKLKKIYDLHLYRLR
KQIRMLRRQKQRDYELECVTNLLQLSNPVQAKPE

>ARG_334ER_VP1

DNPSYQQSPRHFVPTGMHSLALGTNLVEPLHALRLDAAGTTQHPVGCAPDEDMTVS
SIASRYGLIRQIQWKKDHAKGSLLLQLDADPFVEQRIEGTNPISLYWFAPVGVVSSMF
MQWRGSLEYRFDIIASQFHTGRLIVGYVPGLTASLQQQMDYMKLKSSSYVFDLQES
NSFTFEVPYVSYPWWVRKYGGNYLPSSTDAPSTLFMYVQVPLIPMEAVSDTIDINVY
VRGGRSFEVCVPVQPSLGLNWNTDFILRNDEEYRAKTGYAPYYAGVWHSFNNSNSL
VFRWGSASDQIAQWPTISVPRGELAFRLIRDGKQAAVGTQPWRTMVVWPSGHGYNI
GIPTYNAERARQLAQHLYGGGSLTDEKAKQLFVPANQQGPGKVSNGNPVWEVMR

>ARG_334ER_VP2

MDNPNPGPDGEGEVELEKDSNVVLTQTRDPSTSIPAPVSVKWSRWTSNDVVDDYATI
TSRWXQIAEFVWSKDDPFDKELARLILPRALLSSIEANSDAICDVPNTIPFKVHAYWRG
DMEVRVQINSNKFQVGQLQATWYYSDHENLNISKRSVYGFQMDHALISASASNEA
KLVIPYKHVYPFLPTRIVPDWTTGILDMGALNIRVIAPLRMSATGPTTCNVVFIKLNN
EFTGTSSGKFYASQIRAKP

>ARG_334ER_VP3

GEESRNTTVLDTTTTLQSSGFGRAFFGEAFNDLKTLMRRYQLYGQLLLSVTTDKDIDH
CMFTFPCLPQGLALDIGSAGSPHEIFNRCRDGIIPLIASGYRFYRGDLRYKIVFPSNVNS
NIWVQHRPDRRLEGWSAAKIVNCDVSTGQGVYNHGYASHIQITR

>ARG_334ER_VP4

EMDRILNLAEGLLNNTIGGNNMDN

PROTEINAS NO ESTRUCTURALES:

>ARG_334ER_HELICASA

APNAEAEASAWVSIYNGVCNMLNVAAQKPKQFKDWVKLATVDFSNNCRGSNQVF
VFFKNTFEVLKKMWGYVFCQSNPAARLLKAVNDEPEILKAWVKECLYLDDPKFRMR
AHDQEYIERVFAAHSYGQILLHDLTAEMNQSRNLSVFTRVYDQISKLKTDLMEMG
SNP YIRRECFTICMCGASGIGKSYLTDSLSELLRASRTPVTTGIKCVVNPLSDYWDQ
CDF QPVLVCVDDMWSVETSTTLDKQLNMLFQVHSPVLSPPKADLEGKKMRYNPEIFI
YNTN KPFPRFDRIAMEAIYRRRNVLIECKASEEKKRGCKHCENDIPIAECSPKMLK
DFHHIKF RYAHDCVNSETTWSEWMTYNEFLEWITPVYMANRRKANESFKMRVDEM
QMLRMDE PLEGDNILNKYVEVNQRLVEEMKAFKERTLWSDLHRVGAEISASVKKALPT
ISITEKLP HWTIQCGIAKPE

>ARG_334ER_3CPro

GSTQQVDAAVNKILQNMVYIGVVPKVPKSGKWRDINFRCLMLHNRQCLMLRH
YIEST AAFPEGTKYYFKYIHNQETRMMSGDISGIEIDLLNLPRLYYGGLAGEESFDS
NIVLVTMP NRIPECKSIKFIASHNEHIRAQNDGVLVTGDHTQLLAFENNNKTPISIN
ADGLYEVLQG VYTPYHGDGVCGSILLSRNLQRPIIGIHVAGTEGLHGFGVAEPLVHEMF

>ARG_334ER_VPg

GLKYSEAVTAKAPRIHRLPVTTKPQ

>ARG_334ER_RdRp

WNTSAGFPLSSLKPPGTSGKRWLFDIELQDSGCYLLRGMRPELEIQLSTTQLMRKKGI
KPHTIFTDCLKDTCPLVEKCRIPGKTRIFSISPVQFTIPFRQYYLDFMASYRAARLNAEH
GIGIDVNSLEWTNLATSLSKYGTHIVTGDYKNFGPGLSDVAASAFEIHDWVLHYTEED
NKDEMKRVMWTMAQEILAPSHLCRDLVYRVPCGIPSGSPITDILNTISNCLLIRLAWLGI
TDLPLSEFSQNVVLVCYGDDLIMNVSDNMIDKFNAVITIGKFFSQYKMEFTDQDKSGNT

VKWRTLQTATFLKHGFLRHPTRPVFLANLDKVSVEGTTNWITHARGLGRRRAATIENAK
QALELAFGWGPEYFNYVRSTIKMAFDKLGIEDLITWEEMDVRCYASA

ANEXO VI: ANÁLISIS DE LAS COLONIAS MIGRATORIAS Y ESTACIONARIAS EN LA PROVINCIA DE ENTRE RÍOS.

Variante DWV qPCR multiplex	Apiario colmena	Código	Manejo	Cuadros con abejas adulta	Cuadros con cría	Categoría de colonia	Nutrición	Suplemento dietario	% <i>V. destructor Foretica</i>	Nivel infestación de <i>V. destructor</i>	<i>Nosema spp</i> (esporas/ml)	Nivel de infección con <i>Nosema spp.</i>	Temporada	qpcr/PAN DWV copias /ul de reacción	[DWV copias génicas/ ul de muestra]	LOG
DWV A	V1-1	293	Migratorio norte	10	8	1	B	Si	0	ND	20000	DEBIL	Inicio	1,58E+03	1,18E+04	4,073443393
ND	V1-2	294	Migratorio norte	10	8	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
DWV A	V1-3	295	Migratorio norte	10	8	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	8,11E+01	6,08E+02	2,784189205
DWV A	V1-4	296	Migratorio norte	10	8	1	MB	Si	3,4	ALTO	0	ND	Inicio	4,51E+03	3,38E+04	4,528989291
ND	V1-5	297	Migratorio norte	10	8	1	B	Si	0	ND	50000	DEBIL	Inicio	0,00E+00		
DWV A	V1-6	298	Migratorio norte	10	8	1	B	Si	0	ND		ND	Inicio	1,27E+03	9,53E+03	3,979172643
DWV A	V2-1	299	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	2,47E+01	1,85E+02	2,26810973
DWV A	V2-2	300	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND	10000	DEBIL	Inicio	2,97E+02	2,23E+03	3,347554424
DWV A	V2-3	301	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,62E+02	1,21E+03	3,083636972
DWV A	V2-4	302	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	1,77	MEDIO	0	ND	Inicio	2,35E+01	1,76E+02	2,245759356
ND	V2-5	303	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	2,56	MEDIO	50000	DEBIL	Inicio	0,00E+00		
DWV A	V3-1	304	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,60E+09	1,20E+10	10,07861176
DWV A	V3-2	305	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,51E+03	1,13E+04	4,052690095
DWV A	V3-3	306	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,89E+05	1,42E+06	6,151714643
DWV A	V3-4	307	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	3,26E+08	2,45E+09	9,388579193
DWV A	V3-5	308	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND	50000	DEBIL	Inicio	3,14E+09	2,36E+10	10,37257253
DWV A	V3-6	309	Migratorio norte	4	4	3	R	Si	0	ND		ND	Inicio	2,62E+09	1,96E+10	10,29307111
DWV A	V4-1	310	Migratorio norte	10	7	1	B	Si	2,54	MEDIO	0	ND	Inicio	1,07E+04	8,06E+04	4,906193307
DWV A	V4-2	311	Migratorio norte	10	7	1	B	Si	0	ND	100000	DEBIL	Inicio	4,52E+04	3,39E+05	5,529972114
DWV A	V4-3	312	Migratorio norte	10	7	1	B	Si	0	ND	100000	DEBIL	Inicio	3,46E+02	2,60E+03	3,414187567
DWV A	V4-4	313	Migratorio norte	10	7	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,94E+08	1,46E+09	9,163128437
ND	V4-5	314	Migratorio norte	10	7	1	B	Si	0	ND	50000	DEBIL	Inicio	0,00E+00		

DWV A	V4-6	315	Migratorio norte	10	7	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	2,05E+02	1,54E+03	3,186942216
DWV A	V5-1	316	Migratorio Sur	10	7	1	R	Si	2,1	MEDIO	10000	DEBIL	Inicio	4,05E+03	3,04E+04	4,482643875
DWV A	V5-2	317	Migratorio Sur	10	7	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	3,85E+03	2,89E+04	4,461045087
DWV A	V5-3	318	Migratorio Sur	10	7	1	R	Si	2,9	MEDIO	0	ND	Inicio	3,96E+02	2,97E+03	3,472866106
DWV A	V5-4	319	Migratorio Sur	10	7	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,58E+04	1,18E+05	5,072426466
DWV A	V5-5	320	Migratorio Sur	10	7	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	2,17E+03	1,63E+04	4,211999058
DWV A	V5-6	321	Migratorio Sur	10	7	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	6,22E+05	4,67E+06	6,669183554
ND	M1-1	336	Estacionario	10	8	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M1-2	337	Estacionario	10	8	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
DWV A	M1-3	338	Estacionario	10	8	1	R	Si	0	ND	200000	DEBIL	Inicio	3,14E+01	2,36E+02	2,372405644
DWV A	M1-4	339	Estacionario	10	8	1	R	Si	0	ND	50000	DEBIL	Inicio	1,05E+03	7,89E+03	3,897262736
DWV A	M1-5	340	Estacionario	10	8	1	R	Si	0	ND	10000	DEBIL	Inicio	3,72E+02	2,79E+03	3,445172029
DWV A	M1-6	341	Estacionario	10	8	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	5,65E+01	4,24E+02	2,627263417
DWV A	M2-1	342	Estacionario	10	8	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	4,39E+02	3,30E+03	3,517960849
DWV A	M2-2	343	Estacionario	10	8	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
DWV A	M2-3	344	Estacionario	10	8	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	5,79E+02	4,34E+03	3,637769829
DWV A	M2-4	345	Estacionario	10	8	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,55E+03	1,16E+04	4,06582424
DWV A	M2-5	346	Estacionario	10	8	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	9,28E+02	6,96E+03	3,842571799
DWV A	M2-6	347	Estacionario	10	8	1	B	Si	2,22	MEDIO	0	ND	Inicio	4,10E+02	3,08E+03	3,488215701
ND	M3-1	348	Estacionario	10	8	1	B	Si	0,9	BAJO	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M3-2	349	Estacionario	10	8	1	B	Si	2,22	MEDIO	0	ND	Inicio	0,00E+00		
DWV A	M3-3	350	Estacionario	10	8	1	B	Si	2	MEDIO	0	ND	Inicio	1,97E+02	1,48E+03	3,169593621
DWV A	M3-4	351	Estacionario	10	8	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	5,17E+02	3,88E+03	3,588602205
ND	M3-5	352	Estacionario	10	8	1	B	Si	2,5	MEDIO	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M3-6	353	Estacionario	10	8	1	B	Si	2,6	MEDIO	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M4-1	354	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M4-2	355	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0,5	BAJO	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M4-3	356	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M4-4	357	Estacionario	10	10	1	MB	Si	1,5	MEDIO	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M4-5	358	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0,4	BAJO	0	ND	Inicio	0,00E+00		
DWV A	M4-6	359	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,08E+03	8,09E+03	3,907949864
ND	M5-1	360	Estacionario	10	10	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M5-2	361	Estacionario	10	10	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M5-3	362	Estacionario	10	10	1	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M5-4	363	Estacionario	7	7	2	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M5-5	364	Estacionario	7	7	2	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
ND	M5-6	365	Estacionario	7	7	2	R	Si	0	ND	0	ND	Inicio	0,00E+00		
DWV A	M6-1	366	Estacionario	10	10	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	3,23E+01	2,42E+02	2,384263786
DWV A	M6-2	367	Estacionario	10	10	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	9,99E+04	7,49E+05	5,874579885

DWV A	M6-3	368	Estacionario	10	10	1	B	Si	0	ND	0	ND	Inicio	1,63E+03	1,22E+04	4,086801021
ND	M6-4	369	Estacionario	10	10	1	B	Si	1,05	MEDIO	0	ND	Inicio	0,00E+00		
DWV A	M6-4	370	Estacionario	10	10	1	MB	Si	1,1	MEDIO	0	ND	Fin	2,20E+02	1,65E+03	3,216634265
DWV A	M6-5	371	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	2,97E+02	2,23E+03	3,348446034
DWV A	V1-1	396	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	5,70E+02	4,28E+03	3,631202709
DWV A	V1-2	397	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	3,87E+02	2,91E+03	3,463198458
DWV A	V1-3	398	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	3	MEDIO	0	ND	Fin	1,85E+03	1,39E+04	4,143145225
DWV A	V1-4	399	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	6,63E+03	4,97E+04	4,696426727
DWV A	V1-5	400	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	1,14E+03	8,51E+03	3,930122169
DWV A	V1-6	401	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	4,29E+07	3,22E+08	8,507340896
ND	V2-1	402	Migratorio norte	4	4	3	B	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	V2-2	403	Migratorio norte	4	4	3	B	Si	1,53	MEDIO	0	ND	Fin	9,22E+03	6,92E+04	4,839888265
DWV A	V2-3	404	Migratorio norte	4	4	3	B	Si	0	ND	50000	DEBIL	Fin	1,70E+03	1,28E+04	4,106474779
DWV A	V2-4	405	Migratorio norte	4	4	3	B	Si	0	ND	0	ND	Fin	2,35E+03	1,76E+04	4,246337906
DWV A	V2-5	406	Migratorio norte	4	4	3	B	Si		ND		ND	Fin	8,35E+02	6,26E+03	3,796591677
DWV A	V2-6	407	Migratorio norte	4	4	3	B	Si		ND	0	ND	Fin	2,29E+05	1,71E+06	6,233969515
DWV A	V3-1	408	Migratorio norte	6	4	2	B	Si	0	ND	100000	DEBIL	Fin	1,71E+08	1,28E+09	9,107543926
DWV A	V3-2	409	Migratorio norte	6	4	2	B	Si	2,8	MEDIO	100000	DEBIL	Fin	5,03E+05	3,77E+06	6,576435957
DWV A	V3-3	410	Migratorio norte	6	4	2	B	Si	2	MEDIO	100000	DEBIL	Fin	1,74E+03	1,31E+04	4,116169244
DWV A	V3-4	411	Migratorio norte	6	4	2	B	Si	0	ND	0	ND	Fin	8,81E+02	6,61E+03	3,820209672
DWV A	V3-5	412	Migratorio norte	6	4	2	B	Si	0	ND	0	ND	Fin	1,44E+03	1,08E+04	4,034246326
ND	V3-6	413	Migratorio norte	6	4	2	B	Si	0	ND	50000	DEBIL	Fin	0,00E+00		
ND	V4-1	414	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	V4-2	415	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	5,70E+02	4,27E+03	3,630798952
DWV A	V4-3	416	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	2,01E+02	1,51E+03	3,178214105
ND	V4-4	417	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	V4-5	418	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		

DWV A	V4-6	419	Migratorio norte	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	3,61E+00	2,71E+01	1,432527177
ND	V5-1	421	Migratorio sur	4	3	3	B	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	V5-2	422	Migratorio sur	4	3	3	B	Si	0	ND	0	ND	Fin	5,53E+02	4,15E+03	3,617550728
DWV A	V5-3	423	Migratorio sur	4	3	3	B	Si	1,66	MEDIO	0	ND	Fin	2,96E+00	2,22E+01	1,345962696
ND	V5-4	424	Migratorio sur	4	3	3	B	Si	0,69	BAJO	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	V5-5	425	Migratorio sur	4	3	3	B	Si	0,87	BAJO	0	ND	Fin	8,42E+02	6,31E+03	3,800306297
DWV A	V5-6	426	Migratorio sur	4	3	3	B	Si	0	ND	0	ND	Fin	7,90E+02	5,93E+03	3,772891711
ND	V6-1	427	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0,95	BAJO	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	V6-2	428	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	2,77	MEDIO	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	V6-3	429	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0,97	BAJO	0	ND	Fin	2,16E+02	1,62E+03	3,209152952
DWV A	V6-4	430	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0,59	BAJO	0	ND	Fin	3,22E+02	2,41E+03	3,382296271
ND	V6-5	431	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	V6-6	432	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	1,09E+04	8,19E+04	4,913423076
DWV A	V7-1	433	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	1,07	MEDIO	0	ND	Fin	1,44E+04	1,08E+05	5,033081312
DWV A	V7-2	434	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	1,86E+01	1,40E+02	2,14516048
DWV A	V7-3	435	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	3,8	ALTO	0	ND	Fin	2,23E+03	1,67E+04	4,22304272
DWV A	V7-4	436	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	7,25E+02	5,44E+03	3,735243495
ND	V7-5	437	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	V7-6	438	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	V8-1	439	Migratorio sur	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	V8-2	440	Migratorio sur	6	4	2	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	V8-3	441	Migratorio sur	6	3	2	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	V8-4	442	Migratorio sur	4	4	3	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	1,89E+04	1,42E+05	5,15174085
ND	V9-1	443	Migratorio sur	6	5	2	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	V9-2	444	Migratorio sur	6	5	2	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	V9-3	445	Migratorio sur	6	5	2	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	1,72E+01	1,29E+02	2,111814778
DWV A	V9-4	446	Migratorio sur	6	5	2	MB	Si	2,5	MEDIO	300000	DEBIL	Fin	3,23E+01	2,42E+02	2,383686675
ND	M1-1	453	Estacionario	10	10	1	MB	No	2,6	MEDIO	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	M1-2	454	Estacionario	10	10	1	MB	No	3,78	ALTO	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	M1-3	455	Estacionario	10	10	1	MB	No	2	MEDIO	0	ND	Fin	5,04E+01	3,78E+02	2,577553869
DWV A	M1-4	456	Estacionario	10	10	1	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	8,66E+03	6,49E+04	4,812470317
DWV A	M1-5	457	Estacionario	10	10	1	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	7,55E+01	5,66E+02	2,752950689
DWV A	M1-6	458	Estacionario	10	10	1	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	2,62E+03	1,97E+04	4,294142589
ND	M2.1	459	Estacionario	4	3	3	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	M2.2	460	Estacionario	4	3	3	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	M2.3	461	Estacionario	10	10	1	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	M2.4	462	Estacionario	10	10	1	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	5,44E+02	4,08E+03	3,610779897
ND	M2.5	463	Estacionario	10	10	1	MB	No	0,77	BAJO	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	M2-6	464	Estacionario	10	10	1	MB	No	1,03	MEDIO	0	ND	Fin	2,21E+02	1,66E+03	3,219807117

ND	M3-1	465	Estacionario	4	4	3	R	No	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	M3-2	466	Estacionario	4	4	3	R	No	0	ND	0	ND	Fin	1,56E+08	1,17E+09	9,067622121
ND	M3-3	467	Estacionario	4	4	3	R	No	2,5	MEDIO	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	M3-4	468	Estacionario	4	4	3	R	No	0	ND	0	ND	Fin	8,79E+05	6,59E+06	6,818871161
ND	M3-5	469	Estacionario	4	4	3	R	No	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	M3-6	470	Estacionario	4	4	3	R	No	2,65	MEDIO	0	ND	Fin	1,64E+08	1,23E+09	9,09002014
ND	M4-1	471	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	M4-2	472	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	M4-3	473	Estacionario	10	10	1	MB	Si	3.48	ALTO	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	M4-4	474	Estacionario	10	10	1	MB	Si	1,66	MEDIO	0	ND	Fin	1,35E+02	1,01E+03	3,004332124
DWV A	M4-5	475	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	6,82E+02	5,12E+03	3,709036635
ND	M4-6	476	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
DWV A	M5-1	477	Estacionario	6	5	2	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	5,52E+02	4,14E+03	3,617031811
DWV A	M5-2	478	Estacionario	6	6	2	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	1,55E+03	1,16E+04	4,064206138
DWV A	M5-3	479	Estacionario	6	5	2	MB	No	0	ND	0	ND	Fin	1,25E+03	9,37E+03	3,971641087
ND	M6-1	480	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00		
ND	M6-2	481	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0	ND	0	ND	Fin	0,00E+00	0,00E+00	
DWV A	M6-3	482	Estacionario	10	10	1	MB	Si	0,5	BAJO	0	ND	Fin	7,28E+02	5,46E+03	3,737258259

MB: muy bueno; B: bien; R: regular; M: mal condición; ND: no detectado.

ANEXO VII: ANÁLISIS DE LA CRÍA.

Manejo	Temporada	Apiario	Colonia	Código	Muestra	Estado de parasitismo	N° de Varroa destructor	Signos de DWV	Categoría	Detección DWV
Migratorio	Inicio	V1	3	224	PUPA	SI	9	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V1	3	225	VARROA	NA	9	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V1	3	226	PUPA	SI	7	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V1	3	227	VARROA	NA	7	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V1	3	228	ABEJA	SI	2	SI	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V1	3	229	ABEJA	SI	2	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V1	3	230	VARROA	NA	4	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V1	3	231	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V2	2	232	LARVA	SI	7	NO	3	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V2	2	233	VARROA	NA	7	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V2	2	234	PUPA	NO	16	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V2	2	235	VARROA	NA	16	NA	3	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V2	2	236	PUPA	SI	13	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V2	2	237	VARROA	NA	0	NA	3	POSITIVO

Migratorio	Inicio	V2	2	238	PUPA	SI	10	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V2	2	239	VARROA	NA	0	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V2	2	240	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V2	5	241	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	3	242	PUPA	SI	14	NO	3	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V3	3	243	VARROA	NA	14	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	3	244	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	245	LARVA	SI	16	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	246	VARROA	NA	16	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	247	PUPA	SI	26	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	248	VARROA	NA	26	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	249	PUPA	SI	48	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	250	VARROA	NA	48	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	251	LARVA	SI	1	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	252	ABEJA	SI	1	SI	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	253	ABEJA	NO	0	NO	3	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V3	4	254	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	5	255	LARVA	SI	14	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	5	256	VARROA	NA	14	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	5	257	PUPA	SI	19	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	5	258	VARROA	NA	19	NA	3	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V3	5	259	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	260	PUPA	SI	9	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V4	1	261	VARROA	NA	9	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	262	PUPA	SI	42	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	263	VARROA	NA	42	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	264	PUPA	SI	9	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	265	VARROA	NA	9	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	266	PUPA	SI	9	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	267	VARROA	NA	9	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	268	PUPA	SI	8	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	269	VARROA	NA	8	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	270	PUPA	SI	10	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	271	VARROA	NA	10	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	1	272	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V4	5	273	PUPA	SI	9	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	5	274	VARROA	NA	9	NA	1	POSITIVO

Migratorio	Inicio	V4	5	275	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V4	2	276	LARVA	SI	19	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	2	277	VARROA	NA	19	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	2	278	PUPA	SI	10	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	2	279	VARROA	NA	10	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V4	2	280	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	3	281	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	4	282	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V5	5	283	ABEJA	SI	6	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	5	284	VARROA	NA	7	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V5	5	285	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	6	286	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	2	287	ABEJA	SI	5	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	2	288	VARROA	NA	5	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	2	289	PUPA	SI	44	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	2	290	VARROA	NA	44	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	2	291	PUPA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V5	2	292	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	322	ABEJA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	323	PUPA	SI	16	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	324	VARROA	NA	16	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	325	PUPA	SI	16	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	326	VARROA	NA	16	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	327	PUPA	SI	12	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	328	VARROA	NA	12	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	329	PUPA	SI	10	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	330	VARROA	NA	10	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	331	ABEJA	NO	0	SI	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	332	ABEJA	NO	0	SI	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	4	333	ABEJA	NO	0	SI	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	5	334	ABEJA	NO	0	SI	3	POSITIVO
Migratorio	Inicio	V3	5	335	ABEJA	NO	0	SI	3	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M1	4	372	PUPA	SI	5	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M1	4	373	VARROA	NA	5	NA	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M1	4	374	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M1	6	375	PUPA	SI	1	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Inicio	M1	6	376	VARROA	NA	1	NA	1	NO DETECTADO

Estacionario	Inicio	M1	6	377	CRÍA	NA	0	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M3	1	378	LARVA	SI	5	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Inicio	M3	1	379	VARROA	NA	5	NA	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M3	1	380	PUPA	SI	5	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M3	1	381	VARROA	NA	5	NA	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M3	1	382	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Inicio	M3	4	383	CRÍA	SI	9	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Inicio	M3	4	384	VARROA	NA	9	NA	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M3	4	385	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Inicio	M4	1	386	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M4	1	387	LARVA	SI	8	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Inicio	M4	1	388	VARROA	NA	8	NA	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M4	1	389	LARVA	SI	4	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Inicio	M4	1	390	VARROA	NA	4	NA	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M4	3	391	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M5	4	392	CRÍA	NO	0	NO	2	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M5	5	393	CRÍA	NO	0	NO	2	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	1	2	586	PUPA	SI	10	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	1	2	587	VARROA	NA	10	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	2	588	PUPA	SI	5	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	2	589	VARROA	NA	5	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	2	590	PUPA	SI	12	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	2	591	VARROA	NA	12	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	2	592	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	1	3	593	ABEJA	SI	6	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	3	594	VARROA	NA	6	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	3	595	ABEJA	SI	5	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	3	596	VARROA	NA	5	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	2	2	597	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Fin	2	4	598	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Fin	2	4	599	PUPA	SI	13	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Fin	2	4	600	VARROA	NA	13	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Fin	2	4	601	PUPA	SI	6	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Fin	2	4	602	VARROA	NA	6	NA	3	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	3	2	603	CRÍA	NO	0	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	2	604	PUPA	SI	2	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	3	605	CRÍA	NO	0	NO	2	POSITIVO

Migratorio	Fin	3	3	606	CRÍA	SI	4	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	3	607	VARROA	NA	4	NA	2	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	3	6	608	CRÍA	NO	0	NO	2	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	3	1	609	PUPA	SI	1	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	1	610	ABEJA	NO	0	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	1	611	LARVA	NO	0	NO	2	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	3	4	612	PUPA	NO	0	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	5	613	PUPA	NO	0	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	5	614	PUPA	SI	9	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	5	615	VARROA	NA	9	NA	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	5	616	PUPA	SI	44	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	5	617	VARROA	NA	44	NA	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	4	1	618	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	4	1	619	LARVA	SI	3	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	4	1	620	VARROA	NA	3	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	5	3	621	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Fin	6	2	622	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	6	3	623	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	624	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	625	PUPA	SI	16	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	626	VARROA	NA	16	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	627	PUPA	SI	14	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	628	VARROA	NA	14	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	629	PUPA	SI	27	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	630	VARROA	NA	33	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	631	PUPA	SI	33	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	632	VARROA	NA	27	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	6	633	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	7	6	634	PUPA	SI	5	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	6	635	VARROA	NA	5	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	6	636	PUPA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	8	1	637	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	8	1	638	PUPA	SI	6	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	8	1	639	VARROA	NA	6	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	8	4	640	CRÍA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Fin	8	4	641	PUPA	SI	19	NO	3	POSITIVO
Migratorio	Fin	8	4	642	VARROA	NA	19	NA	3	POSITIVO

Migratorio	Fin	9	3	643	CRÍA	NO	0	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	9	3	644	LARVA	SI	3	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	9	3	645	VARROA	NA	3	NA	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	9	4	646	CRÍA	NO	0	NO	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	3	2	647	VARROA	NA	3	NA	2	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	648	ABEJA	SI	6	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	7	1	649	VARROA	NA	6	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	4	1	650	CRÍA	SI	3	NO	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	4	1	651	VARROA	NA	3	NA	1	POSITIVO
Migratorio	Fin	1	3	652	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Fin	M1	3	653	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	1	654	CRÍA	NO	0	NO	3	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M4	4	655	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Fin	M4	2	656	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M5	1	657	CRÍA	NO	0	NO	2	POSITIVO
Estacionario	Fin	M5	2	658	CRÍA	NO	0	NO	2	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M6	2	659	CRÍA	NO	0	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M6	4	660	CRÍA	NO	0	NO	1	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	1	661	ABEJA	SI	30	NO	3	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M3	1	662	VARROA	NA	30	NA	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	1	663	ABEJA	SI	6	NO	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	1	664	VARROA	NA	6	NA	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	665	LARVA	SI	16	NO	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	666	VARROA	NA	16	NA	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	667	LARVA	SI	25	NO	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	668	VARROA	NA	25	NA	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	669	LARVA	SI	15	NO	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	670	VARROA	NA	15	NA	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	671	LARVA	SI	19	NO	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	672	VARROA	NA	19	NA	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	673	LARVA	NO	0	NO	3	POSITIVO
Estacionario	Fin	M3	5	674	LARVA	NO	0	NO	3	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M4	4	675	PUPA	SI	4	NO	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M4	4	676	VARROA	NA	4	NA	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M5	1	677	PUPA	SI	9	NO	2	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M5	1	678	VARROA	NA	9	NA	2	POSITIVO
Estacionario	Fin	M6	4	679	PUPA	SI	14	NO	1	NO DETECTADO

Estacionario	Fin	M6	4	680	VARROA	NA	14	NA	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M3	1	P1	POLEN	NO	NA	NA	3	POSITIVO
Migratorio	Invierno	V2	3	P10	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Migratorio	Invierno	V1	2	P11	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Migratorio	Invierno	V1	1	P12	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Migratorio	Invierno	M2	1	P13	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Migratorio	Invierno	V8	2	P14	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Migratorio	Invierno	V8	1	P15	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Estacionario	Invierno	M2	2	P16	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Estacionario	Invierno	M4	1	P17	POLEN	NO	NA	NA	NA	NO DETECTADO
Estacionario	Invierno	M4	2	P18	POLEN	NO	NA	NA	NA	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V1	1	P19	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M5	1	P2	POLEN	NO	NA	NA	2	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V2	1	P20	POLEN	NO	NA	NA	2	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V4	1	P21	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Inicio	V8	1	P22	POLEN	NO	NA	NA	2	POSITIVO
Estacionario	Inicio	M2	2	P23	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Estacionario	Inicio	M4	3	P24	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	V1	3	P25	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	V4	2	P26	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	V2	2	P27	POLEN	NO	NA	NA	3	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	V9	1	P28	POLEN	NO	NA	NA	2	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M1	1	P29	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M6	2	P3	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M2	3	P30	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Estacionario	Fin	M4	2	P31	POLEN	NO	NA	NA	1	POSITIVO
Estacionario	Fin	M4	3	P32	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Invierno	V5	1	P4	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Migratorio	Invierno	V5	2	P5	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Migratorio	Invierno	V3	2	P6	POLEN	NO	NA	NA	NA	POSITIVO
Migratorio	Invierno	V4	1	P7	POLEN	NO	NA	NA	NA	NO DETECTADO
Migratorio	Fin	V6	1	P8	POLEN	NO	NA	NA	1	NO DETECTADO
Migratorio	Invierno	V2	1	P9	POLEN	NO	NA	NA	NA	NO DETECTADO

NA: no aplica.

ANEXO VIII: IDENTIFICACIÓN FLORAL.

Familia Botánica	Tipo de polen/muestra	1*(J)	2**(J)	3**(J)	4*(J)	5**(S)	6**(S)	7*(S)	8*(S)	9*(M)	10**(M)	11*(M)	12*(M)
<i>Alismataceae</i>	<i>Sagittariamontevicensis</i>	x			7,2								
<i>Alismataceae</i>	<i>Hydrocleysnymphoides</i>				x								
<i>Amaranthaceae</i>	TypeAmaranthus	0,5			3,2								
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Schinussp.</i>							30,7	83,5				
<i>Apiaceae</i>	<i>Ammimajus</i>	x			x								
<i>Apiaceae</i>	<i>Eryngiumsp.</i>											0,2	0,1
<i>Arecaceae</i>	<i>Syagrusromanzoffiana</i>											x	
<i>Arecaceae</i>	<i>Trithrinaxcampestris</i>		2,4									87,1	89,2
<i>Asteraceae</i>	<i>Cichoriumintybus</i>						0,4						
<i>Asteraceae</i>	<i>Heliantheae</i>				25								
<i>Asteraceae</i>	<i>Seneciosp.</i>				24,7	18,2	1,2					0,1	
<i>Asteraceae</i>	Type Ambrosia			x	1,6								0,8
<i>Asteraceae</i>	TypeBaccharis	56,3	4,2	3,9	37,6						0,1	7,6	6,5
<i>Asteraceae</i>	TypeGrindelia	39,9									0,2	0,2	
<i>Asteraceae</i>	TypeBidens	3,3			0,5								
<i>Boraginaceae</i>	<i>Echiumplantagineum</i>					0,8							
<i>Brassicaceae</i>	<i>Brassicaceae</i>	x	x		x		0,1	17,5	5,9		x		
<i>Calyceraceae</i>	<i>Acicarphatribuloides</i>					1,2							
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Caryophyllaceae</i>					x							
<i>Casuarinaceae</i>	<i>Casuarina cunninghamiana</i>				x								
<i>Celtidaceae</i>	<i>Celtissp.</i>			x				1,1	2,1				
<i>Cyperaceae</i>	TypeCyperus					15,4	0,7						
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Sebastianiasp.</i>						x						
<i>Fabaceae</i>	<i>Desmodiumsp.</i>				x								
<i>Fabaceae</i>	<i>Gleditsiasp.</i>								3,6				
<i>Fabaceae</i>	<i>Glycinemax</i>				x						x		
<i>Fabaceae</i>	<i>Lotus sp.</i>	x									0,03		
<i>Fabaceae</i>	<i>Medicago sativa</i>										x	3,69	3,3
<i>Fabaceae</i>	<i>Trifolium pratense</i>							x			x	x	
<i>Fabaceae</i>	<i>Trifoliumrepens</i>	x						25,8	1			0,2	0,1
<i>Lamiaceae</i>	<i>Hyptissp.</i>			x	x								
<i>Lythraceae</i>	<i>Heimiasalicifolia</i>												x
<i>Fabaceae</i>	<i>Vachellia caven</i>					0,6	x						
<i>Fabaceae</i>	<i>Vicia sp.</i>							8,5	1,9				
<i>Meliaceae</i>	<i>Meliaazedarach</i>							15,4					
<i>Moraceae</i>	TypeMorus					0,01	0,01	x	1,9		0,04	0,02	

<i>Myrtaceae</i>	<i>TypeEucalyptus</i>		93,4	96,1						100	99,7		
<i>Myrtaceae</i>	<i>TypeMyrcianthesplatensis</i>		x			0,5	10,7						
<i>Oleaceae</i>	<i>Fraxinus</i> sp.					1,1	0,04						
<i>Orobanchaceae</i>	<i>Agaliniscommunis</i>		x	x								x	x
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago</i> sp.					1,5							
<i>Poaceae</i>	<i>Poaceae</i>	x		x	x		0,2				x	0,2	
<i>Polygonaceae</i>	<i>TypePolygonumhydropiperoides</i>	x			x							0,6	
<i>Ranunculaceae</i>	<i>Clematis</i> sp.							1					
<i>Rutaceae</i>	<i>Citrus</i> sp.		x			61,3	85,8						
<i>Polygonaceae</i>	<i>TypeRumex</i>						0,2						
<i>Rubiaceae</i>	<i>TypeRichardia</i>		x										
<i>Sapindaceae</i>	<i>TypeSerjania</i>					x							
<i>Verbenaceae</i>	<i>TypeAloysiagratisissima</i>	x		x									x

Apiario: * Estacionario; ** Migratorio. Recolección de la muestra: Julio (J), Septiembre (S), Marzo (M). (x): Especies presentes en las muestras, pero no cuantificada debido a estar en baja frecuencia.

Muestras N.º 2,3,5,6,9,10 provenientes de apiarios ubicados en Villa del Rosario (MIGRATORIO).

Muestras N.º 1,4,7,8,11,12 recolectadas en Maciá (ESTACIONARIO).

BIBLIOGRAFÍA

- Abban, S., Smith, B., Corona, M., Cook, S. C., Evans, J. D., Chen, Y., & Alburaki, M. (2024). Prevalence and distribution of *Varroa destructor* and *Nosema* spp. in symptomatic honey bee colonies across the USA from 2015 to 2022. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51514-9>
- 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. <https://doi.org/10.1111/eea.12719>
- Ahn, K., Xie, X., Riddle, J., Pettis, J., & Huang, Z. Y. (2012). Effects of long distance transportation on honey bee physiology. *Psyche (London)*. <https://doi.org/10.1155/2012/193029>
- Aignasse. (2021). *Evaluación de métodos alternativos de manejo nutricional energético y control de Varroosis con acaricidas orgánicos en colonias de Apis mellífera, en clima subtropical*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562–565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Alger, S. A., Alexander Burnham, P., Lamas, Z. S., Brody, A. K., & Richardson, L. L. (2018). Home sick: Impacts of migratory beekeeping on honey bee (*Apis mellifera*) pests, pathogens, and colony size. *PeerJ*, 2018(11). <https://doi.org/10.7717/peerj.5812>
- Alger, S. A., Burnham, P. A., & Brody, A. K. (2019). Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLoS ONE*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221800>
- Antipov, D., Raiko, M., Lapidus, A., & Pevzner, P. A. (2020). <sc>Metaviral</sc> <sc>SPAdes</sc>: assembly of viruses from metagenomic data. *Bioinformatics*, 36(14), 4126–4129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa490>
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Santos, E., Higes, M., Martín-Hernández, R., & Zunino, P. (2015). Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*, 70(2), 522–533. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0594-7>
- Barroso-Arévalo, S., Vicente-Rubiano, M., Molero, F., Puerta, F., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2019). Nucleotide sequence variations may be associated with virulence of deformed wing virus. *Apidologie*, 50(4), 482–496. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00660-5>
- Basavappa, R., Syed, R., Icenogle, J., Filman, D., & Hogle, J. (1994). Role and mechanism of the maturation cleavage of VPO in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. In *Protein Science* (Vol. 3). Cambridge University Press.
- Bateman, A., Martin, M. J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T. G., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis,

- E., Hussein, A., Ignatchenko, A., ... Zhang, J. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., de Miranda, J. R., & Dalmon, A. (2020a). Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 11(4), 239. <https://doi.org/10.3390/insects11040239>
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., de Miranda, J. R., & Dalmon, A. (2020b). Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 11(4), 239. <https://doi.org/10.3390/insects11040239>
- Bianchi, E., Agra, M. N., García, C., Gennari, G., Maldonado, L., Rodríguez, G. A., Palacio, M. A., Scannapieco, A. C., & Lanzavecchia, S. B. (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*, 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.590225>
- Bradford, E. L., Christie, C. R., Campbell, E. M., & Bowman, A. S. (2017). A real-time PCR method for quantification of the total and major variant strains of the deformed wing virus. *PLoS ONE*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190017>
- Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Díaz-Cetti, S., Invernizzi, C., Martínez de la Escalera, G., Mendoza, Y., Santos, E., Silva, C., Zunino, P., & Antúnez, K. (2019). Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46453-9>
- Brasero, C., Quintana, S., Di Gerónimo, V., Genchi García, M. L., Sguazza, G., Bravi, M. E., Fagnoli, L., Reynaldi, F. J., Eguaras, M., & Maggi, M. (2021). Deformed wing virus type a and b in managed honeybee colonies of Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, 111(1), 100–110. <https://doi.org/10.1017/S000748532000036X>
- Brettell, L. E., Mordecai, G. J., Schroeder, D. C., Jones, I. M., Da Silva, J. R., Vicente-Rubiano, M., & Martin, S. J. (2017). A comparison of deformed wing virus in deformed and asymptomatic honey bees. *Insects*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/insects8010028>
- Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. In *Apidologie* (Vol. 41, Issue 3, pp. 278–294). <https://doi.org/10.1051/apido/2010012>
- Bushmanova, E., Antipov, D., Lapidus, A., & Pribelski, A. D. (2019). rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*, 8(9). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz100>
- CANTWELL, G. E. (1970). Standard methods for counting nosema spores. *American Bee Journal* 110(6), 222–223.
- Carlos, C. :, Cabrera, G., Rodríguez, G., María, :, Palacio, A., Tomás, :, Vera, A., Elsa, :, & Chagra, P. (2022). *Producto #2-Protocolos de la Cadena de Valor Apícola y Ganadera*. www.fontagro.org
- Cavigli, I., Daughenbaugh, K. F., Martin, M., Lerch, M., Banner, K., Garcia, E., Brutscher, L. M., & Flenniken, M. L. (2016). Pathogen prevalence and abundance in honey bee colonies involved in almond pollination. *Apidologie*, 47(2), 251–266. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0395-5>
- Chen, Y., Zhao, Y., Hammond, J., Hsu, H., Evans, J., & Feldlaufer, M. (2004). Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87(2–3), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.07.005>
- Colwell, M. J., Williams, G. R., Evans, R. C., & Shutler, D. (2017). Honey bee-collected pollen in agro-ecosystems reveals diet diversity, diet quality, and

- pesticide exposure. *Ecology and Evolution*, 7(18), 7243–7253. <https://doi.org/10.1002/ece3.3178>
- Corona, M., Branchiccela, B., Alburaki, M., Palmer-Young, E. C., Madella, S., Chen, Y., & Evans, J. D. (2023). Decoupling the effects of nutrition, age, and behavioral caste on honey bee physiology, immunity, and colony health. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1149840>
- Curry, S., Fry, † Elizabeth, Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., & Stuart, D. (1997). Dissecting the Roles of VP0 Cleavage and RNA Packaging in Picornavirus Capsid Stabilization: the Structure of Empty Capsids of Foot-and-Mouth Disease Virus. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 71, Issue 12).
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., & Neumann, P. (2012). Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>
- Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., Vallon, J., & Moury, B. (2017a). Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep41045>
- Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., Vallon, J., & Moury, B. (2017b). Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep41045>
- De La Sota, M. B. M. (2020). *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*. <http://www.senasa.gov.ar>
- De Miranda, J. R., Bailey, L., Ball, B. V., Blanchard, P., Budge, G. E., Chejanovsky, N., Chen, Y. P., Gauthier, L., Genersch, E., De Graaf, D. C., Ribière, M., Ryabov, E., De Smet, L., & Van Der Steen, J. J. M. (2013). Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 52, Issue 4). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>
- de Miranda, J. R., Brettell, L. E., Chejanovsky, N., Childers, A. K., Dalmon, A., Deboutte, W., de Graaf, D. C., Doublet, V., Gebremedhn, H., Genersch, E., Gisder, S., Granberg, F., Haddad, N. J., Kaden, R., Manley, R., Matthijnsens, J., Meeus, I., Migdadi, H., Milbrath, M. O., ... Ball, B. V. (2022). Cold case: The disappearance of Egypt bee virus, a fourth distinct master strain of deformed wing virus linked to honeybee mortality in 1970's Egypt. *Virology Journal*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01740-2>
- de Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S48–S61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>
- DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 10, pp. 170–176). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E., & Huang, M. H. (2010). The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 56(9), 1184–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.017>
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.-L., & Alaux, C. (2013). Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE*, 8(8), e72016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>
- Ding, G., Fondevila, N., Palacio, M. A., Merke, J., Martinez, A., Camacho, B., Aignasse, A., Figini, E., Rodriguez, G., Lv, L., Liu, Z., & Shi, W. (2016). Prevalence of honeybee viruses in different regions of China and Argentina. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 35(3), 825–833. <https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2572>

- Dolezal, A. G., Carrillo-Tripp, J., Allen Miller, W., Bonning, B. C., & Toth, A. L. (2016). Intensively cultivated landscape and varroa mite infestation are associated with reduced honey bee nutritional state. *PLoS ONE*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153531>
- Dolezal, AG., & and Toth, AL. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 26, pp. 114–119). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.006>
- Fagúndez, G. (2011). *Estudio de los recursos nectaríferos y poliníferos utilizados por Apis mellifera L. en diferentes ecosistemas del departamento Diamante (Entre Ríos). Tesis Doctoral. UNS. Bahía Blanca.* [Tesis Doctoral.]. UNS. Bahía Blanca.
- Fagúndez, G. A., & Caccavari, M. A. (2006). Pollen analysis of honeys from the central zone of the Argentine province of Entre Ríos. *Grana*, 45(4), 305–320. <https://doi.org/10.1080/00173130601086636>
- Faurot-Daniels, C., Glenny, W., Daughenbaugh, K. F., McMenamin, A. J., Burkle, L. A., & Flenniken, M. L. (2020). Longitudinal monitoring of honey bee colonies reveals dynamic nature of virus abundance and indicates a negative impact of Lake Sinai virus 2 on colony health. *PLoS ONE*, 15(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237544>
- Ferrari; Carlos Alberto; Otero, R. coord.; C. J. A. coord. (2011). *La Apicultura Argentina y sus regiones. Una visión panorámica.* www.cfired.org.ar
- Fries, I., Ekbohm, G., & Villumstad, E. (1984). *Nosema Apis* , Sampling Techniques and Honey Yield. *Journal of Apicultural Research*, 23(2), 102–105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1984.11100617>
- Giacobino, A., Cagnolo, N. B., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Salto, C., & Signorini, M. (2014). Risk factors associated with the presence of Varroa destructor in honey bee colonies from east-central Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(3–4), 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.04.002>
- Giacobino, A., Molineri, A., Bulacio Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Pacini, A., Salto, C., & Signorini, M. (2016). Key management practices to prevent high infestation levels of Varroa destructor in honey bee colonies at the beginning of the honey yield season. *Preventive Veterinary Medicine*, 131, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.07.013>
- Glenny, W., Cavigli, I., Daughenbaugh, K. F., Radford, R., Kegley, S. E., & Flenniken, M. L. (2017). Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182814>
- Gray, A., Adjlane, N., Arab, A., Ballis, A., Brusbardis, V., Bugeja Douglas, A., Cadahía, L., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Cornelissen, B., Costa, C. A. da, Danneels, E., Danihlík, J., Dobrescu, C., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., ... Brodschneider, R. (2023). Honey bee colony loss rates in 37 countries using the COLOSS survey for winter 2019–2020: the combined effects of operation size, migration and queen replacement. *Journal of Apicultural Research*, 62(2), 204–210. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2113329>
- Gromeier, M., Wimmer, E., & Gorbalenya, A. E. (1999). Genetics, Pathogenesis and Evolution of Picornaviruses. In *Origin and Evolution of Viruses* (pp. 287–343). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012220360-2/50013-1>
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P. G., & Correa-Benítez, A. (2010). *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, 41(4), 443–450. <https://doi.org/10.1051/apido/2009076>
- Hall, H. G., & Smith, D. R. (1991). Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA (polymerase chain

- reaction/restriction fragment length polymorphism/maternal gene flow). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Hartmann, U., Forsgren, E., Charrière, J.-D., Neumann, P., & Gauthier, L. (2015). Dynamics of *Apis mellifera* Filamentous Virus (AmFV) Infections in Honey Bees and Relationships with Other Parasites. *Viruses*, 7(5), 2654–2667. <https://doi.org/10.3390/v7052654>
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., & Martín-Hernández, R. (2013). *<scp>N</scp> osema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 17–29. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12024>
- Hou, C., Li, B., Deng, S., Chu, Y., & Diao, Q. (2017). Diagnosis and distribution of the *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) in honey bees (*Apis mellifera*) in China. *Insectes Sociaux*, 64(4), 597–603. <https://doi.org/10.1007/s00040-017-0569-4>
- Huson, D. H. (1997). *SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data*.
- Jara, L., Martínez-López, D., Muñoz, I., & De La Rúa, P. (2018). Epidemiological survey of *Ascosphaera apis* in small-scale migratory *apis mellifera iberiensis* colonies. *Sociobiology*, 65(2), 285–290. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i2.2685>
- Jara, L., Ruiz, C., Martín-Hernández, R., Muñoz, I., Higes, M., Serrano, J., & De la Rúa, P. (2021). The effect of migratory beekeeping on the infestation rate of parasites in honey bee (*Apis mellifera*) colonies and on their genetic variability. *Microorganisms*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010022>
- Kang, Y. B. , K. D. S. , & J. D. H. (1976). Experimental Studies on Pathogenicities and Developmental Stages of *Nosema apis*(Zander, 1909). . *Korean Journal of Veterinary Research.*, 16(1), 11–25.
- Kay O', M., Andstephen, R., & Buchmann', L. (1991). *Standardized Analytical Techniques for Bee-Collected Pollen*. <http://ee.oxfordjournals.org/>
- Kevill, J. L., de Souza, F. S., Sharples, C., Oliver, R., Schroeder, D. C., & Martin, S. J. (2019a). DWV-A lethal to honey bees (*apis mellifera*): A colony level survey of DWV Variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 States across the US. *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050426>
- Kevill, J. L., de Souza, F. S., Sharples, C., Oliver, R., Schroeder, D. C., & Martin, S. J. (2019b). DWV-A lethal to honey bees (*apis mellifera*): A colony level survey of DWV Variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 States across the US. *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/v11050426>
- Kevill, J. L., Highfield, A., Mordecai, G. J., Martin, S. J., & Schroeder, D. C. (2017). ABC assay: Method development and application to quantify the role of three DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees. *Viruses*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/v9110314>
- Kevill, J. L., Stainton, K. C., Schroeder, D. C., & Martin, S. J. (2021). Deformed wing virus variant shift from 2010 to 2016 in managed and feral UK honey bee colonies. *Archives of Virology*, 166(10), 2693–2702. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05162-3>
- Kim, H., Frunze, O., Maigoro, A. Y., Lee, M.-L., Lee, J.-H., & Kwon, H.-W. (2024). Comparative Study of the Effect of Pollen Substitute Diets on Honey Bees during Early Spring. *Insects*, 15(2), 101. <https://doi.org/10.3390/insects15020101>
- Kim, J. M., Lim, S. J., Kim, S. M., Kim, M. J., Kim, B. H., Tai, T. A., Kim, S., & Yoon, B. S. (2020). Rapid detection of deformed wing virus in honeybee using ultra-rapid qPCR and a DNA-chip. *Journal of Veterinary Science*, 21(1). <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e4>
- Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., Jackson, C. A., Lance, R. F., Mangan, A. M., Monroe, E. M., Piaggio, A. J., Stokdyk, J. P., Wilson, C. C., & Richter, C. A. (2020). Reporting the limits of

- detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2(3), 271–282. <https://doi.org/10.1002/edn3.29>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumsa, T., Bareke, T., & Addi, A. (2020). Migratory Beekeeping as Strategy to Harvest Multiseason Honey in Ethiopia. *Bee World*, 97(4), 105–108. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2020.1812896>
- Lannutti, L., Gonzales, F. N., Dus Santos, M. J., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2022). Molecular Detection and Differentiation of Arthropod, Fungal, Protozoan, Bacterial and Viral Pathogens of Honeybees. *Veterinary Sciences*, 9(5), 221. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050221>
- Lanzi, G., de Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M., & Rossi, C. (2006). Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.) . *Journal of Virology*, 80(10), 4998–5009. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.10.4998-5009.2006>
- Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Le Conte, Y., Ellis, M., & Ritter, W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41(3), 353–363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>
- Li, J., Heerman, M. C., Evans, J. D., Rose, R., Li, W., Rodríguez-García, C., DeGrandi-Hoffman, G., Zhao, Y., Huang, S., Li, Z., Hamilton, M., & Chen, Y. (2019). Pollen reverses decreased lifespan, altered nutritional metabolism and suppressed immunity in honey bees (*Apis mellifera*) treated with antibiotics. *Journal of Experimental Biology*, 222(7). <https://doi.org/10.1242/jeb.202077>
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., & de Miranda, J. R. (2012). Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa* destructor-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 227–235. <https://doi.org/10.1128/AEM.06094-11>
- Manning, R. (2001). Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82(2), 60–75. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099504>
- Martin, S. J., & Brettell, L. E. (2019). *VI06CH12_Martin ARjats.cls Annual Review of Virology Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects*. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818>
- Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., Nikaido, S., & Schroeder, D. C. (2012). Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science*, 336(6086), 1304–1306. <https://doi.org/10.1126/science.1220941>
- McMahon, D. P., Natsopoulou, M. E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M. J. F., Gogol-Döring, A., & Paxton, R. J. (2016). Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1833). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0811>
- Meeus, I., Smagghe, G., Siede, R., Jans, K., & de Graaf, D. C. (2010). Multiplex RT-PCR with broad-range primers and an exogenous internal amplification control for the detection of honeybee viruses in bumblebees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(2), 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.06.012>
- Melicher, D., Wilson, E. S., Bowsher, J. H., Peterson, S. S., Yocum, G. D., & Rinehart, J. P. (2019). Long-distance transportation causes temperature stress in the Honey Bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Entomology*, 48(3), 691–701. <https://doi.org/10.1093/ee/nvz027>

- Molineri, A., Giacobino, A., Pacini, A., Bulacio Cagnolo, N., Fondevila, N., Ferrufino, C., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciángelo, G., Pietronave, H., & Signorini, M. (2017). Risk factors for the presence of Deformed wing virus and Acute bee paralysis virus under temperate and subtropical climate in Argentinian bee colonies. *Preventive Veterinary Medicine*, 140, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.019>
- Mondet, F., de Miranda, J. R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., & Mercer, A. R. (2014). On the Front Line: Quantitative Virus Dynamics in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies along a New Expansion Front of the Parasite *Varroa destructor*. *PLoS Pathogens*, 10(8), e1004323. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004323>
- Moore, J., Jironkin, A., Chandler, D., Burroughs, N., Evans, D. J., & Ryabov, E. V. (2011). Recombinants between Deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. *Journal of General Virology*, 92(1), 156–161. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025965-0>
- Mordecai, G. J., Wilfert, L., Martin, S. J., Jones, I. M., & Schroeder, D. C. (2016). Diversity in a honey bee pathogen: First report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *ISME Journal*, 10(5), 1264–1273. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.178>
- Nazzi, F., & Le Conte, Y. (2016). Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, 61(1), 417–432. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023731>
- Nelson, D. L., & Jay, S. C. (1989). *The effect of colony relocation on loss and disorientation of honeybees*.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Oberreiter, H., & Brodschneider, R. (2020). Austrian COLOSS survey of honey bee colony winter losses 2018/19 and analysis of hive management practices. *Diversity*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/d12030099>
- 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. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80470-0>
- Pacini, A., Molineri, A., Antúnez, K., Cagnolo, N. B., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Zago, L., Aignasse, A., Pietronave, H., Rodríguez, G., Palacio, M. A., Signorini, M., & Giacobino, A. (2021). Environmental conditions and beekeeping practices associated with *Nosema ceranae* presence in Argentina. *Apidologie*, 52(2), 400–417. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00831-9>
- Palacio, M. A., Figini, E. E., Ruffinengo, S. R., Rodríguez, E. M., del Hoyo, M. L., & Bedascarrasbure, E. L. (2000). Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie*, 31(4), 471–478. <https://doi.org/10.1051/apido:2000139>
- Pega, J., Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Schammas, J. M., Malacari, D., Capozzo, A. V., Arzt, J., Pérez-Beascochea, C., Maradei, E., Rodríguez, L. L., Borca, M. V., & Pérez-Filgueira, M. (2013). Early Adaptive Immune Responses in the Respiratory Tract of Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected Cattle. *Journal of Virology*, 87(5), 2489–2495. <https://doi.org/10.1128/JVI.02879-12>
- Pruitt, K. D. (2004). NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research*, 33(Database issue), D501–D504. <https://doi.org/10.1093/nar/gki025>
- Quintana, S., Brasesco, C., Porrini, L. P., Di Gerónimo, V., Eguaras, M. J., & Maggi, M. (2021). First molecular detection of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) in honey bees (*Apis mellifera*) in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 60(1), 111–114. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1690100>

- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & vanEngelsdorp, D. (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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- 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). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab101>
- Requier, F., Leyton, M. S., Morales, C. L., Garibaldi, L. A., Giacobino, A., Porrini, M. P., Rosso-Londoño, J. M., Velarde, R. A., Aignasse, A., Aldea-Sánchez, P., Allasino, M. L., Arredondo, D., Audisio, C., Cagnolo, N. B., Basualdo, M., Branchiccela, B., Calderón, R. A., Castelli, L., Castilhos, D., ... Antúnez, K. (2024). First large-scale study reveals important losses of managed honey bee and stingless bee colonies in Latin America. *Scientific Reports*, 14(1), 10079. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59513-6>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00173.x>
- Riveros, G., Arismendi, N., Zapata, N., Evans, D., Pérez, I., Aldea, P., & Vargas, M. (2020). Occurrence, prevalence and viral load of deformed wing virus variants in *Apis mellifera* colonies in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 63–68. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1670993>
- Roberts, J. M. K., 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). <https://doi.org/10.3390/v12050575>
- Robi, D. T., Temteme, S., Aleme, M., Bogale, A., Getachew, A., & Mendesil, E. (2023). Epidemiology, factors influencing prevalence and level of varroosis infestation (*Varroa destructor*) in honeybee (*Apis mellifera*) colonies in different agroecologies of Southwest Ethiopia. *Parasite Epidemiology and Control*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2023.e00325>
- Rodríguez and Crisanti. (2019). *guia apicultura*.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>
- Ryabov, E. V., Childers, A. K., Chen, Y., Madella, S., Nessa, A., VanEngelsdorp, D., & Evans, J. D. (2017). Recent spread of *Varroa destructor* virus-1, a honey bee pathogen, in the United States. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17802-3>
- Ryabov, E. V., Childers, A. K., Lopez, D., Grubbs, K., Posada-Florez, F., Weaver, D., Girtten, W., vanEngelsdorp, D., Chen, Y., & Evans, J. D. (2019). Dynamic evolution in the key honey bee pathogen deformed wing virus: Novel insights into virulence and competition using reverse genetics. *PLoS Biology*, 17(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000502>
- Ryabov, E. V., Wood, G. R., Fannon, J. M., Moore, J. D., Bull, J. C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., & Evans, D. J. (2014). A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-Mediated, or In Vitro, Transmission. *PLoS Pathogens*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004230>

- Saitou2, N., & Nei, M. (n.d.). *The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*.
<https://academic.oup.com/mbe/article/4/4/406/1029664>
- Salina, M. D., Garcia, M. L. G., Bais, B., Bravi, M. E., Brasesco, C., Maggi, M., Pecoraro, M., Larsen, A., Squazza, H. G., & Reynaldi, F. J. (2021). Viruses that affect Argentinian honey bees (*Apis mellifera*). In *Archives of Virology* (Vol. 166, Issue 6, pp. 1533–1545). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05000-6>
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.519>
- Samson, S., Lord, É., & Makarencov, V. (2022). Simplot, Application Note). In *Bioinformatics*. https://github.com/Stephane-S/Simplot_PlusPlus,
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Squazza, 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. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.003>
- Sharma, D., Abrol, D. P., Ahmad, H., Srivastva, K., & Vir, V. (2013). Migratory Beekeeping in Jammu and Kashmir, India. *Bee World*, 90(2), 44–47. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2013.11417535>
- Simone-Finstrom, M., Li-Byarlay, H., Huang, M. H., Strand, M. K., Rueppell, O., & Tarpy, D. R. (2016). Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep32023>
- Simone-Finstrom, M., Strand, M. K., Tarpy, D. R., & Rueppell, O. (2022). Impact of Honey Bee Migratory Management on Pathogen Loads and Immune Gene Expression is Affected by Complex Interactions with Environment, Worker Life History, and Season. *Journal of Insect Science*, 22(1). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab096>
- Smart, M., Pettis, J., Rice, N., Browning, Z., & Spivak, M. (2016). Linking measures of colony and individual honey bee health to survival among apiaries exposed to varying agricultural land use. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152685>
- Somerville, D. C., & Nicol, H. I. (2006). Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1), 141. <https://doi.org/10.1071/EA03188>
- Stephen J. Martin, 1* Andrea C. Highfield,2 Laura Brettell,1 Ethel M. Villalobos,3 Giles E. Budge,4 Michelle Powell,4 Scott Nikaido,3 Declan C. Schroeder2*. (2012). *Downloaded from*. <https://doi.org/10.5061/dryad.d54cc>
- Tehel, A., Vu, Q., Bigot, D., Gogol-Döring, A., Koch, P., Jenkins, C., Doublet, V., Theodorou, P., & Paxton, R. (2019). The two prevalent genotypes of an emerging infectious disease, deformed wing virus, cause equally low pupal mortality and equally high wing deformities in host honey bees. *Viruses*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/v11020114>
- Tibatá, V. M., Sanchez, A., Palmer-Young, E., Junca, H., Solarte, V. M., Madella, S., Ariza, F., Figueroa, J., & Corona, M. (2021). Africanized honey bees in Colombia exhibit high prevalence but low level of infestation of Varroa mites and low prevalence of pathogenic viruses. *PLoS ONE*, 16(5 May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244906>
- Traynor, K. S., Pettis, J. S., Tarpy, D. R., Mullin, C. A., Frazier, J. L., Frazier, M., & VanEngelsdorp, D. (2016). In-hive Pesticide Exposome: Assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep33207>
- Traynor, K. S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G., Madella, S., Evans, J., Lopez, D., & vanEngelsdorp, D. (2016). Multiyear survey

- targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie*, 47(3), 325–347. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0431-0>
- Van Der Zee, R., Brodschneider, R., Brusbardis, V., Charrière, J. D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Dahle, B., Drazic, M. M., Kauko, L., Kretavicius, J., Kristiansen, P., Mutinelli, F., Otten, C., Peterson, M., Raudmets, A., Santrac, V., Seppälä, A., Soroker, V., Topolska, G., ... Gray, A. (2014). Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012-2013: Analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 19–34. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.02>
- Vanbergen, A. J., Garratt, M. P., Vanbergen, A. J., Baude, M., Biesmeijer, J. C., Britton, N. F., Brown, M. J. F., Brown, M., Bryden, J., Budge, G. E., Bull, J. C., Carvell, C., Challinor, A. J., Connolly, C. N., Evans, D. J., Feil, E. J., Garratt, M. P., Greco, M. K., Heard, M. S., ... Wright, G. A. (2013). Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. In *Frontiers in Ecology and the Environment* (Vol. 11, Issue 5, pp. 251–259). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1890/120126>
- Vandame R. and Palacio MA. (2010). Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? *Apidologie*, 41(3), 243–255. <https://doi.org/10.1051/apido/2010025>
- vanEngelsdorp, D., Tarry, D. R., Lengerich, E. J., & Pettis, J. S. (2013). Idiopathic brood disease syndrome and queen events as precursors of colony mortality in migratory beekeeping operations in the eastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 108(2–3), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.08.004>
- Welch, A., Drummond, F., Tewari, S., Averill, A., & Burand, J. P. (2009). Presence and prevalence of viruses in local and migratory honeybees (*Apis mellifera*) in Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7862–7865. <https://doi.org/10.1128/AEM.01319-09>
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H. C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S. J. M., & Boots, M. (2016). Honeybee disease: Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by Varroa mites. *Science*, 351(6273), 594–597. <https://doi.org/10.1126/science.aac9976>
- Wood, E. (1983). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Biochemical Education*, 11(2), 82. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(83\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90068-7)
- Zander, E. (1909). *En Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene*, *Münchener Bienenzeitung* (Vol. 31, pp. 196-204).
- Zhu, X., Zhou, S., & Huang, Z. Y. (2014). Transportation and pollination service increase abundance and prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 53, Issue 4, pp. 469–471). International Bee Research Association. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.4.06>
- Zioni, N., Soroker, V., & Chejanovsky, N. (2011). Replication of varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a varroa destructor virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. *Virology*, 417(1), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.009>