

Presencia de la levadura *Kodamaea ohmeri* en escarabajos *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) colectados de colonias de abeja melífera africanizada en dos apiarios en Yucatán, México

Azucena Canto ^{a*}

Luis A. Medina-Medina ^b

Elisa Chan ^a

Rosalina Rodríguez ^a

^a Centro de Investigación Científica de Yucatán AC. Unidad de Recursos Naturales, Calle 43, Num. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, 97200, Yucatán, México.

^b Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Mérida, Yucatán, México.

* Autor de correspondencia: azucanto@cicy.mx

Resumen:

Aethina tumida (Coleoptera: Nitidulidae), comúnmente conocido como el Pequeño Escarabajo de la Colmena (PEC), se está posicionando como una plaga importante en la industria apícola fuera de su rango de distribución natural. En México, informes recientes indican que el PEC está distribuido en toda la península de Yucatán. La invasión de las colonias de abeja melífera por el PEC está químicamente mediada por compuestos volátiles producidos por la levadura *Kodamaea ohmeri*, considerada un simbiote secundario del PEC. Se analizó la presencia de esta levadura en colonias de abeja melífera en Yucatán con base en la premisa de que los simbiotes se encuentran frecuentemente distribuidos junto con su huésped, por lo que la presencia de *K. ohmeri* en colmenas estaría fuertemente asociada con la presencia del PEC. En colonias manejadas de abeja melífera africanizada (AMA), se aislaron e identificaron levaduras asociadas con escarabajos adultos y los

resultados muestran que el PEC junto con su levadura asociada, *K. ohmeri*, ha invadido colonias de AMA en Yucatán. También se reportó por primera vez la presencia de levaduras diferentes a *K. ohmeri* asociadas con el PEC en esta región geográfica.

Palabras clave: *Aethina tumida*, *Apis mellifera*, Asociación escarabajo-levadura, Simbionte secundario, *Kodamaea ohmeri*, PEC, ADN ribosómico, Apicultura tropical.

Recibido: 26/03/2019

Aceptado: 23/09/2019

Introducción

Aethina tumida Murray1867 (Coleoptera: Nitidulidae), comúnmente conocido como el Pequeño Escarabajo de la Colmena (PEC), es un parásito oportunista que invade los nidos de la abeja *Apis mellifera* y se está posicionando como una plaga importante en la industria apícola fuera de su rango de distribución natural. Las hembras del PEC proliferan dentro de las colonias de abeja melífera y sus larvas consumen el polen, la miel y las crías presentes en las colmenas, provocando la fermentación de la miel y el colapso de la colonia^(1,2). El PEC se reportó por primera vez en México en 2007 en el estado de Coahuila⁽³⁾, posteriormente se han reportado en otros estados, incluyendo Campeche, Michoacán, Jalisco, Quintana Roo, San Luis Potosí y Yucatán, que son los principales estados productores de miel⁽⁴⁾. Los PEC se reportaron por primera vez en 2012 en apiarios ubicados al noreste del estado de Yucatán⁽⁵⁾, y reportes recientes indican su presencia en toda la península de Yucatán⁽⁶⁾. La invasión de adultos del PEC en colonias de abeja melífera parece estar mediada químicamente por compuestos volátiles producidos por la fermentación microbiana de las reservas de alimentos. Uno de los factores que predisponen la invasión del PEC en colonias de abejas es la asociación con la levadura fermentativa *Kodamaea ohmeri*^(7,8). Esta levadura es un simbionte facultativo o secundario del PEC y se ha aislado del tubo digestivo de escarabajos adultos, huevos y larvas^(7,9-11); se considera el principal factor responsable de la fermentación del alimento almacenado en las colonias y de producir los compuestos que atraen a otros escarabajos adultos^(7,12,13).

En esta interacción, los simbiontes ayudan al huésped a colonizar nuevos hábitats y a expandirse a nuevas áreas geográficas, ya que juegan un papel importante en la nutrición del insecto hospedero⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. Las levaduras proporcionan nutrientes esenciales, como esteroides, y producen químicos que atraen a los insectos dispersores y favorecen la migración dirigida a un nuevo ambiente⁽¹⁷⁾. Es factible que los PEC adultos al colonizar nuevas colmenas y apiarios, transporten

a la levadura *K. ohmeri* con ellos. El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de levaduras, específicamente *K. ohmeri*, asociadas con el PEC adulto que invade colonias manejadas de abeja melífera africanizada en Yucatán. Con base en la premisa de que los simbioses se distribuyen junto con su huésped, se asume que, en esta región, *K. ohmeri* se encuentra a menudo asociada con PEC adultos^(15,16). Los resultados ayudarán a dilucidar la relación entre el PEC y sus levaduras asociadas y su impacto en colonias de abeja melífera, además de que, permitirán diseñar estrategias adecuadas para controlar esta plaga empleando levaduras simbióticas del PEC en ambientes de Neotrópico.

Material y métodos

Este estudio se realizó en el periodo de febrero a julio de 2016 en colonias de *A. mellifera* africanizadas ubicadas en dos sitios diferentes en el estado de Yucatán, México. Un grupo de colonias se ubicó en el apiario experimental del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán en el municipio de Mérida (20° 51' 51.62 "N; 89° 36' 45.35" O), el segundo grupo se ubicó en un apiario de propiedad privada en el municipio de Motul (21° 08' 03" N 89° 19' 03" O). Los apiarios contenían aproximadamente 30 colonias de abejas, de las cuales se seleccionaron aleatoriamente seis colonias para el muestreo. De cada colonia, fueron retirados todos los panales, la caja, tapa, fondo y alimentadores artificiales (alimentadores internos) de la colmena, y buscamos y se colectaron PEC adultos.

Los escarabajos adultos fueron colectados del fondo de la colmena, los panales con cría y los alimentadores artificiales. En todos los lugares se observó un gran número de PEC. Cada escarabajo se colectó con pinzas esterilizadas en alcohol al 99% para evitar la contaminación entre escarabajos. Posteriormente, cada escarabajo se colocó en un frasco estéril con una tapa de rosca y se etiquetó conforme a la colonia de origen, el lugar dentro de la colmena y el número de espécimen. Los escarabajos adultos se identificaron morfológicamente conforme a los métodos estándar para la identificación a nivel de especie⁽¹⁸⁾. En total, se colectaron 27 escarabajos adultos vivos (de 1 a 6 escarabajos por colonia).

Para obtener las levaduras, cada escarabajo se colocó individualmente dentro de cajas con agar YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) y se le permitió caminar libremente en toda la superficie de la caja con agar durante 40 min. No se esterilizó el exterior del escarabajo con alcohol, ni tampoco se enjuagó con agua estéril, esto con la finalidad de mantener al escarabajo vivo e imitar la forma natural de dispersión dentro de las colonias de la abeja melífera. A cada escarabajo se le permitió morder y moverse libremente sobre la superficie del agar, imitando la forma en que los escarabajos diseminan la levadura cuando se mueven a través de los panales de abeja melífera. Este método aumenta la probabilidad de obtener levaduras de las piezas bucales y el sistema

digestivo del escarabajo⁽¹⁵⁾. Después de los 40 min de inoculación del agar, los escarabajos se sacrificaron y se almacenaron en alcohol al 70 %. Las cajas con agar se incubaron a 25 °C y se revisaron cada 24 h para detectar el crecimiento de levaduras. Se monitoreó el crecimiento de las colonias microbianas mediante la observación de cada placa en un estereoscopio a una magnificación de 50x. Para aislar y purificar las levaduras de las placas con agar, seleccionamos colonias de cada morfotipo y se colocaron individualmente en tubos Eppendorf con 600 µl de agua destilada estéril. Las colonias se resuspendieron y sembraron en una nueva caja con agar. Estas cajas se incubaron a 25 °C durante 5 días o hasta la aparición de crecimiento microbiano. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada morfotipo observado en las cajas originales.

Todos los morfotipos de levadura se almacenaron en la colección de levaduras del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). La identificación de las especies se realizó por medio de la secuenciación simétrica del dominio D1/D2 (nucleótidos 63-642 de *Saccharomyces cerevisiae*) de la subunidad grande (LSU, por sus siglas en inglés) del ribosoma, siguiendo los protocolos estándar de extracción de ADN^(19,20). Para la extracción del ADN, las células se cultivaron durante aproximadamente 48 h en caldo YPD (3 g de extracto de levadura, 3 g de extracto de malta, 5 g de peptona y 10 g de glucosa por litro de agua destilada) en un agitador orbital a 100 rpm a 27 °C y se colectaron por centrifugación. La pastilla de células precipitadas se sumergió en nitrógeno líquido durante 10 min y se trituró en un mortero antes de colocarlo en un tubo estéril con 800 µl de solución amortiguadora (50 mM de Tris-HCl, 250 mM de NaCl, 50 mM de EDTA, 0.3 % de dodecilsulfato sódico). Se añadieron 20 µl de RNasa para limpiar las muestras, las cuales se calentaron en un termobloque a 65 °C durante 30 min y se agitaron suavemente cada 10 min. Posteriormente las muestras se enfriaron a 23 °C y se adicionaron 500 µl de cloroformo para extraer el ADN. Las muestras se centrifugaron a 1,300 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 700 µl de isopropanol. Las muestras se mezclaron suavemente y centrifugaron durante 5 min para precipitar el ADN. La pastilla de ADN se recuperó y enjuagó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se secó el ADN durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 70 µl del amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA [pH 7.4]). Las muestras de ADN se prepararon para la PCR empleando 5 µl (120-500 ng) de las muestras diluidas con 1 ml de TE 0.5X. Para verificar la extracción, se tomaron 5 µl (120-500 ng) del ADN y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % empleando TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5X y una corriente de 100 V durante 15 min. A continuación, el ADN se cuantificó por espectrofotometría con un NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) y diluyó a 20 ng/µl para la PCR.

La amplificación de la secuencia D1/D2 se realizó utilizando los iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')⁽²⁰⁾ y siguiendo el protocolo de PCR: 95 °C durante 12 min seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 s, alineación a 55 °C durante 10 s y extensión a 72 °C durante 20 s; con una

extensión final de 5 min a 72 °C. El ADN amplificado se preparó para secuenciación con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante con los iniciadores NL-1 y NL-4. Las muestras se inyectaron individualmente para electroforesis en un Analizador de DNA ABI 3730xl (Applied Biosystems). Las secuencias se alinearon y ensamblaron, se obtuvo una secuencia consenso para cada cepa aislada de levadura usando el software bioinformático Geneious Pro 8.1.7 (Biomatters Ltd, Auckland, Nueva Zelanda). Se consultó la base de datos de nucleótidos GenBank utilizando la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés)⁽²¹⁾ para buscar especies de levadura con secuencias de DNA que coincidieran con nuestras cepas aisladas. Todas las secuencias produjeron correlaciones significativas con las levaduras en GenBank, con 98.8-100 % de cobertura e identidad. El grado de divergencia en la porción D1/D2 entre las secuencias de las cepas aisladas y las secuencias concordantes encontradas en GenBank no excedieron el 1%; por lo tanto, se consideraron secuencias coespecíficas⁽²²⁾. Las secuencias obtenidas en este estudio se depositaron en GenBank bajo los números de acceso mostrados en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Levaduras aisladas de PEC adultos colectados en colonias de la abeja africanizada *Apis mellifera* en apiarios de Yucatán, México

Espécimen de escarabajo	Colonia de abejas	Especies de levadura	Sitio de colecta	DF*	Clave de cepa colección CICY	Número de GenBank
1	1	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Panal con cría	0	CICYRN1044	MF431846
1	1	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Panal con cría	0	CICYRN1045	MF431847
1	1	<i>Meira argovae</i>	Panal con cría	1	CICYRN1047	MF431848
2	2	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1048	MF431849
2	2	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1049	MF431850
2	2	<i>Citeromyces siamensis</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1050	MF431851
2	2	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1051	MF431852
2	2	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1052	MF431853
2	2	<i>Citeromyces siamensis</i>	Alimentador artificial	1	CICYRN1053	MF431854
3	2	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1054	MF431855
3	2	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1055	MF431856
3	2	<i>Citeromyces siamensis</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1056	MF431857

3	2	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1058	MF431858
4	2	<i>Citeromyces siamensis</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1059	MF431859
5	2	<i>Lachancea fermentati</i>	Alimentador artificial	0	CICYRN1060	MF431860
6	3	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1062	MF431861
7	3	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1063	MF431862
7	3	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1064	MF431863
8	3	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1066	MF431864
9	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1069	MF431865
9	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1070	MF431866
10	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	1	CICYRN1072	MF431867
10	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1073	MF431868
11	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1091	MF431869
12	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1074	MF431870
13	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1075	MF431871
13	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1076	MF431872
14	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1089	MF431873
14	4	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1090	MF431874
15	5	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1077	MF431875
16	5	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1078	MF431876
17	6	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1081	MF431877
18	6	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1082	MF431878
19	6	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1084	MF431879
20	6	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1086	MF431880
20	6	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1087	MF431881
20	6	<i>Kodamaea ohmeri</i>	Piso colmena	0	CICYRN1088	MF431882

* Diferencias de nucleótidos de ADNr entre el tipo de cepa de GenBank y el aislado conoespecífico de este estudio.

Resultados

Los escarabajos adultos de *A. tumida* se encontraron en todas las colonias de AMA examinadas, se encontraron principalmente en las pequeñas grietas del piso de la colmena. La presencia de levaduras se detectó en las placas con agar (cada una representativa de un solo escarabajo) después de cinco días de incubación. Se obtuvieron 37 cepas de 20 de los 27 escarabajos colectados, de las cuales se identificaron cuatro especies diferentes de levadura; tres de las cuales se reportaron asociadas a *A. tumida* por primera vez. La levadura identificada con mayor frecuencia fue *K. ohmeri* con 31 colonias aisladas, seguida de *Citeromyces siamensis* con cuatro colonias, *Lachancea fermentati* y *Meira argovae* con una colonia, respectivamente (Cuadro 1). Con respecto al lugar dentro de la colmena en donde se colectaron los especímenes, los PEC adultos encontrados en el piso de la colmena estaban asociados únicamente con *K. ohmeri*, mientras que los escarabajos

colectados de los panales con cría estaban asociados con *K. ohmeri* y *M. argovae*. Los escarabajos colectados en los alimentadores artificiales estaban asociados con tres especies de levadura: *K. ohmeri*, *C. siamensis* y *L. fermentati*.

Discusión

De las cuatro especies de levadura identificadas, solo *K. ohmeri* se puede considerar estrechamente asociada con el PEC⁽¹¹⁾. Esta levadura se aisló de la mayoría de los escarabajos colectados en la colmena, y se considera un simbiote secundario de *A. tumida*⁽⁷⁾. Los resultados muestran que los simbioses se encuentran distribuidos junto con su hospedero^(15,16), y señalan que la invasión del PEC en apiarios de esta región mexicana ha generado la expansión y distribución de *K. ohmeri* a nuevas zonas en las que no se había detectado previamente.

En cambio, las otras levaduras aisladas del PEC no se pueden definir como simbioses y probablemente fueron adquiridas de forma externa por PEC adultos durante sus movimientos a través de los panales con cría, alimentadores y otras estructuras dentro de la colmena. *Citeromyces siamensis*, que pertenece al orden Saccharomycetales, es una levadura fermentativa asociada con alimentos altamente concentrados, como el calamar salado y la soya fermentada⁽²³⁾. En este estudio, se aisló a esta levadura de los escarabajos que se alimentaban del jarabe de sacarosa en los alimentadores artificiales y es probable que el escarabajo haya adquirido esta levadura de forma pasiva al alimentarse del jarabe. A diferencia de *C. siamensis*, *L. fermentati* (Saccharomycetales), otra levadura fermentativa, está asociada con el intestino de insectos como las moscas de la fruta y los neurópteros⁽²⁴⁾, y se ha aislado de una gran variedad de sustratos líquidos como jugo de fruta y fermentos de oliva y tequila⁽²⁵⁾. En este estudio, *L. fermentati* se aisló de un escarabajo que se encontraba en un alimentador artificial, lo que se considera una adquisición circunstancial. *Meira argovae* es un hongo basidiomiceto anamórfico tipo levadura de la clase Ustilaginomycetes que se ha reportado asociado con ácaros fitófagos⁽²⁶⁾ en vástagos de bambú⁽²⁷⁾. Es probable que *Meira argovae* tenga potencial para controlar estos ácaros en cultivos importantes ya que secreta sustancias antagonistas⁽²⁸⁾. *M. argovae* se aisló de un escarabajo colectado de un panal con cría de una colonia; por lo que, la adquisición de esta levadura por el PEC adulto pudo ocurrir cuando el escarabajo caminó a través de los panales con cría.

Kodamaea ohmeri (Saccharomycetales, familia Metschnikowiaceae) fue la especie aislada con mayor frecuencia en nuestro estudio y también es la única especie aislada de forma repetida del material fermentado encontrado en colonias de *A. mellifera* infestadas con el PEC, y del cuerpo de los escarabajos^(2,7,8,29). La importancia de la relación entre el PEC y *K. ohmeri* no es clara, aunque se ha demostrado que la presencia de *K. ohmeri* aumenta la capacidad de invasión y reproducción del escarabajo en colonias de *A. mellifera*^(7,30), ya que esta levadura es responsable de producir

componentes volátiles en el alimento, los cuales actúan como fuertes atrayentes para otros escarabajos⁽³¹⁾.

Los resultados muestran que el PEC asociado con la levadura *K. ohmeri* ha invadido colonias de *A. mellifera* en Yucatán, lo que sugiere que el impacto del escarabajo en colonias de *A. mellifera* en esta región puede aumentar debido a la presencia de *K. ohmeri*. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para comprobar la hipótesis de que la presencia de *K. ohmeri* en este estudio aumenta la capacidad del PEC de infestar apiarios. En Yucatán, *A. mellifera* africanizada tiene un comportamiento similar al de sus ancestros africanos, los cuales atrapan, encapsulan y confinan PEC adultos dentro de las grietas y hendiduras de la colmena, también retiran los huevos y larvas del escarabajo, evitando la fermentación del panal, la producción de químicos y la atracción de más escarabajos dentro de las colonias.

Se ha propuesto utilizar a *K. ohmeri* para fermentar sustitutos de polen o polen como atrayente en trampas de escarabajo y así poder controlar al PEC en las colonias de abeja melífera. Además del uso de *K. ohmeri* como atrayente, también se requieren datos experimentales con *C. siamensis*, *L. fermentati* y *M. argovae* para explorar el papel de estas levaduras en la atracción de escarabajos. Aunque *K. ohmeri* no es exclusiva del PEC, ya que se ha asilado de nidos de abejorros como *Bombus impatiens* y *Bombus pensylvanicus* que no tienen PEC en sus colonias⁽¹²⁾, es admisible asumir que el PEC es un dispersor activo de *K. ohmeri* y otras levaduras a nuevos recursos y hospederos^(8,16).

Conclusiones e implicaciones

Los resultados indican que el PEC se encuentra en apiarios africanizados en la región de Yucatán y que esta colonización también ha generado la dispersión de su simbiote facultativo *K. ohmeri* y de otras levaduras asociadas a alimentos e invertebrados (*C. siamensis*, *L. fermentati* y *M. argovae*) en sustratos no registrados previamente para estas levaduras, y por primera vez, en una región donde no se habían observado.

Agradecimientos

A Matilde Margarita Ortiz García por su ayuda con los métodos de PCR.

Financiamiento

Esta investigación recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto número 219922.

Declaración de divulgación

Los autores no reportan un potencial conflicto de interés.

Literatura citada:

1. Neumann P, Ellis JD. The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae): distribution, biology and control of an invasive species. *J Apicult Res* 2008;47(3):181-183.
2. Neumann P, Pettis JS, Schäfer MO. Quo vadis *Aethina tumida*? Biology and control of small hive beetles. *Apidologie* 2016;47(3):427-466.
3. Del Valle-Molina J. Informe de notificación inmediata. Small hive beetle infestation (*Aethina tumida*) in Mexico: Immediate notification report (Report No. OIE: 6397) OIE World Organization for Animal Health. 2007.
4. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Avance de la producción pecuaria por producto, México. <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>. Consultado 1 Dic, 2016.
5. Galván-Hernández G. Nota informativa: Hallazgo de presencia de *Aethina tumida* (Pequeño Escarabajo de la Colmena: PEC) en flora silvestre en el estado de Yucatán en la periferia de un apiario negativo a PEC. Servicio de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Mexico. 2013.
6. Reyes-Escobar O, Dosal-Alonso E, Lara-Álvarez C, Lara-Álvarez LG, Dorantes-Ugalde JA, Saldaña-Loza LM. Lethal effect of boric acid and attractants against the small hive beetle, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae). *J Apicult Res* 2016;(54):1-7.
7. Benda ND, Boucias D, Torto B, Teal P. Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *Aethina tumida* infesting honey bee hives. *J Apicult Res* 2008;47(3):194-201.

8. Conklin TM. Investigations of small hive beetle-yeast associations [Doctoral dissertation]. Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University; 2012.
9. Torto B, Boucias DG, Arbogast RT, Tumlinson JH, Tea PEA. Multitrophic interaction facilitates parasite–host relationship between an invasive beetle and the honey bee. PNAS 2007;(104):8374-8378.
10. Leemon D. In-hive fungal biocontrol of small hive beetle. Brisbane Queensland, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation; 2012.
11. Amos BA, Leemon D, Hayes RA, Cribb BW, Furlong MJ. Associations between the small hive beetle and the yeast *Kodamaea ohmeri* throughout the host life cycle. J Econom Entomol 2018;111(4):1501-1508.
12. Graham JR, Ellis JD, Carroll MJ, Teal P. *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) attraction to volatiles produced by *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) colonies. Apidologie 2011;(42):326-336.
13. Neumann P, Hoffmann D, Duncan M, Spooner-Hart R, Pettis JS. Long-range dispersal of small hive beetles. J Apicult Res 2012;(51):214-215.
14. Ishikawa H. Insect Symbiosis: An Introduction. In: Bourtzis K, Miller TA, editors. Insect Symbiosis. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2003:1-22.
15. Vega FE, Dowd PF. The role of yeasts as insect endosymbionts. In: Vega FE, Blackwell M, editors, Insect-fungal associations: ecology and evolution. Oxford, USA: Oxford University Press; 2005:211-243.
16. Henry LM, Peccoud J, Simon JC, Hadfield JD, Maiden MJC, Ferrari J, *et al.* Horizontally transmitted symbionts and host colonization of ecological niches. Curr Biol 2013;23(17):1713-1717.
17. Blackwell M. Made for each other: Ascomycete yeasts and insects. Microbiol Spectr 2017;5(3): FUNK-0081-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0081-2016.
18. Neumann P, Evans JD, Pettis JS, Pirk C, Schäfer MO, Tanner G, Ellis JD. Standard methods for small hive beetle research. J Apicult Res 2013;(52):1-32.
19. Tapia-Tussell R, Lappe P, Ulloa M, Quijano-Ramayo A, Cáceres-Farfán M, Larqué-Saavedra A, Perez-Brito D. A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. Mol Biotechnol 2006;(33):67-70.

20. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998;(73):331-371.
21. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25(17):3389-3402.
22. Peterson SW, Kurtzman CP. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Syst Appl Microbiol* 1991;(14):124-129.
23. Nagatsuka Y, Kawasaki H, Limtong S, Mikata K, Seki T. *Citeromyces siamensis* sp. nov., a novel halotolerant yeast isolated in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;(52):2315-2319.
24. Nguyen NN, Suh S, Blackwell M. Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia* 2007;(99):842-858.
25. Lachance MA, Kurtzman CP. *Lachancea Kurtzman* (2003). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. editors. *The yeasts, a taxonomic study*. London: Elsevier; 2011:511-520.
26. Boekhout T, Theelen B, Houbraken J, Robert V, Scorzetti G, Gafni A, *et al.* Novel anamorphic mite-associated fungi belonging to the Ustilaginomycetes: *Meira geulakonigii* gen. nov., sp. nov., *Meira argovae* sp. nov. and *Acaromyces ingoldii* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;(53):1655-1664.
27. Tanaka E, Shimizu K, Imanishi Y, Yasuda F, Tanaka C. Isolation of basidiomycetous anamorphic yeast-like fungus *Meira argovae* found on Japanese bamboo. *Mycoscience* 2008;(49):329-333.
28. Paz Z, Bilkis I, Gerson U, Kerem Z, Szejnberg A. Argovin, a novel natural product secreted by the fungus *Meira argovae*, is antagonistic to mites. *Entomol Exp Appl* 2011;(140):247-253.
29. Torto B, Fonbong A, Mutyabai DM, Muli E, Arbogast RT, Teal P. *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) and *Oplostomus haroldi* (Coleoptera: Scarabaeidae): occurrence in Kenya, distribution within honey bee colonies, and responses to host odors. *Ann Entomol Soc Am* 2010;(103):389-396.
30. Arbogast RT, Torto B, Willms S, Fombong AT, Duehl A, Teal P. Estimating reproductive success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in honey bee colonies by trapping emigrating larvae. *Environ Entomol* 2012;41(1):152-158.

31. Torto B, Arbogast RT, Alborn H, Suazo A, Engelsdorp D, Boucias D, *et al.* Composition of volatiles from fermenting pollen dough and attractiveness to the small hive beetle *Aethina tumida*, a parasite of the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 2007;(38):380-389.
32. Torto B, Arbogast RT, Engelsdorp DV, Willms S, Purcell D, Boucias D, *et al.* Trapping of *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae) from *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies with an in-hive baited trap. *Environ Entomol* 2007;(36):1018-1024.