

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**VIROSES E NOSEMOSE EM ABELHAS (HYMENOPTERA:  
APIDAE) NA REGIÃO DA BACIA DO JACUÍPE, BAHIA**

**Vanessa Santos Louzado das Neves**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
JANEIRO - 2023**

# **VIROSES E NOSEMOSE EM ABELHAS (HYMENOPTERA: APIDAE) NA REGIÃO DA BACIA DO JACUÍPE, BAHIA**

Vanessa Santos Louzado das Neves  
Bacharel em Engenharia Agrônômica, UFRB, 2020

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Agricultura Tropical).

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho  
**Coorientadora:** Dra. Carine Mascena Peixoto  
**Coorientadora:** Profa. Dra. Geni da Silva Sodré

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
JANEIRO - 2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

N518v	<p>Neves, Vanessa Santos Louzado das. Viroses e nosebose em abelhas (Hymenoptera: apidae) na Região da Bacia do Jacuípe, Bahia / Vanessa Santos Louzado das Neves._ Cruz das Almas, BA, 2023. 58f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho. Coorientadora: Dra. Carine Mascena Peixoto. Coorientadora: Prof. Dra. Geni da Silva Sodré.</p> <p>1.Abelha – Criação. 2.Abelha – Doença – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 638.1</p>
-------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB. Responsável pela Elaboração Antonio Marcos Samento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**VIROSES E NOSEMOSE EM ABELHAS (HYMENOPTERA:  
APIDAE) NA REGIÃO DA BACIA DO JACUIPE, BAHIA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de

Vanessa Santos Louzado das Neves

Aprovada em 19 de janeiro de 2023

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Orientador

Prof. Dr. Edilson Divino Araújo  
Universidade Federal de Sergipe - UFS  
Examinador externo

Dra. Flaviane Santos de Souza  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Examinador externo

## **DEDICATÓRIA**

Esta é mais uma vitória concretizada em minha vida, que não seria possível sem o direcionamento de Deus e sem a motivação e apoio do meu esposo Higor, que sempre esteve presente em todos os momentos de dificuldade e alegrias, me incentivando a seguir em frente, com toda dedicação, carinho e amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo fôlego de vida e por está sempre trazendo paz ao meu coração nos momentos de tempestade, por todo cuidado e amor de pai.

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, por todas as orientações, incentivos e correções ao longo do curso que serviram de degraus para chegar até ao final.

Agradeço às minhas coorientadoras Dra. Carine Mascena Peixoto e Prof. Dra. Geni da Silva Sodré por toda orientação e colaboração. Um agradecimento em especial a Dra. Carine Mascena Peixoto, que além de coorientadora é uma amiga que sempre esteve disposta a me ajudar sendo uma parte essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa INSECTA, por todo ensinamento, confiança e cuidado, meu muito obrigada por ter me acolhido desde o início da graduação.

A Dra. Maria Emilene Correia-Oliveira, que fez parte da minha jornada até aqui, contribuindo de maneira direta ou indiretamente.

Aos demais colegas de laboratório que contribuíram de alguma forma com esse trabalho, em especial ao colega Benedito por toda ajuda na aquisição das amostras e a Dra. Flaviane por toda ajuda.

Ao meu esposo Higor, que sempre me encoraja, me anima e me passa a confiança de que sou capaz mesmo quando penso em desistir, meu muito obrigada por todo cuidado e por ser além de companheiro um amigo em quem posso confiar.

A minha mãe Vanilda, mulher forte e guerreira que sempre me incentivou que a educação seja a porta para todas as oportunidades na vida.

Ao meu pai Belmiro, homem batalhador que nunca me deixou passar necessidade de nada, sempre dando o seu melhor para cuidar de toda a família.

Ao meu irmão Bruno, por toda ajuda e incentivo, sem você eu não teria chegado até aqui.

Ao meu irmão Vailson, que sempre foi um grande amigo, com um sorriso no rosto mesmo passando por momentos difíceis, a sua alegria nos contagiava, te amarei eternamente meu irmão.

A minha sogra Iracy e sogro Antônio e ao meu cunhado Iago que são minha segunda família.

Aos irmãos da Igreja Primitiva Remanescentes da Cruz e em especial aos pastores Maria Edite e Luiz Haroldo que sempre me aconselharam em momentos de angústia e me acolheram como uma família.

Ao Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, juntamente com o programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de finalizar mais esta etapa.

A todos os apicultores que contribuíram com o envio de amostras de abelhas para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código Financeiro 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processos: 406973/2021-0 e 305950/2021-5) pelo suporte financeiro.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

Enfim, meu muito obrigada a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste Curso de Mestrado.

## **EPIGRAFE**

“Deem graças em todas as circunstâncias, pois esta é a vontade de Deus para vocês em Cristo Jesus” 1 Tessalonicenses 5:18

# VIROSES E NOSEMOSE EM ABELHAS (HYMENOPTERA: APIDAE) NA REGIÃO DA BACIA DO JACUÍPE, BAHIA

## RESUMO GERAL

As abelhas africanizadas são organismos de importante relevância para o equilíbrio do meio ambiente e desenvolvimento da agricultura, tanto pelo serviço de polinização quanto pela possibilidade de exploração dos produtos da colmeia. No entanto, perdas de colônias de *Apis mellifera* são relatadas em todo o mundo com causas como a contaminação por fungos *Vairimorpha apis* e *V. ceranae* e os vírus patogênicos. O objetivo deste trabalho foi registrar a presença e o nível de infecção de *V. apis* e a *V. ceranae* em *A. mellifera*, além de detectar a presença de vírus patogênicos em amostras de *A. mellifera* e *V. destructor*. As amostras avaliadas foram provenientes de cinco apiários localizados na Região da Bacia do Jacuípe, Bahia. A determinação do índice de infecção de *Vairimorpha* spp. foi realizada mensalmente durante o período de um ano através de contagens em câmara de Neubauer em microscópio óptico, posteriormente, a identificação molecular da espécie presente na amostra foi feita por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando primers específicos para *V. apis* e *V. ceranae*. A presença de vírus foi avaliada em amostras de *A. mellifera* e de *V. destructor* coletadas durante o período de cinco meses no ano 2021, por meio de RT-PCR utilizando primers específicos para cinco espécies virais (DWV, ABPV, IAPV, CBPV e BQCV). Como resultado identificamos *V. ceranae* em 100% das colônias analisadas e em todos os meses de coleta, outubro representando o maior nível de infecção (49%) e dezembro o menor, com nível de infecção variando de nulo a semiforte, não foi constatada a presença de *V. apis*. A ocorrência de *V. ceranae* foi observada durante todos os meses do ano, sendo que as condições ambientais foram favoráveis à multiplicação do fungo. Neste trabalho foi detectada também a presença dos vírus DWV, ABPV e BQCV em amostras de *A. mellifera* e de *V. destructor*. Os vírus IAPV e CBPV não foram detectados. O vírus DWV estava presente em todas as amostras avaliadas. Foram observadas infecções simples apenas com o vírus DWV. Em 60% das amostras de *A. mellifera* avaliadas foram observadas infecção dupla do tipo DWV-ABPV e 40% do tipo DWV-BQCV. Todas as infecções duplas observadas nas amostras de *V. destructor* foram do tipo DWV-BQCV. Assim concluímos que, a detecção de *V. ceranae* e dos vírus DWV, ABPV e BQCV nas amostras avaliadas confirma a presença desses patógenos em apiários na Região da Bacia do Jacuípe demonstrando a necessidade de ações de monitoramento das abelhas dessa localidade. Além disso, concluímos que o ácaro *V. destructor* pode atuar como vetor dos vírus DWV, ABPV e BQCV em *A. mellifera* nesta região, contribuindo com a presença e disseminação desses patógenos nos apiários. Nesse sentido este trabalho deverá contribuir com o conhecimento científico da sanidade apícola de apiários da Bacia do Jacuípe - Bahia, além de fornecer subsídios para o melhor manejo das colônias evitando a proliferação e possíveis impactos causados pelo fungo *V. ceranae* e pelos vírus DWV, ABPV e BQCV.

**Palavras-chave:** Sanidade apícola, *Vairimorpha*, *Varroa destructor*, Vírus, *Nosema*.



# VIROSES AND NOSEMOSIS IN BEES (HYMENOPTERA: APIDAE) IN THE BACIA OF JACUÍPE REGION, BAHIA

## GENERAL ABSTRACT

Africanized bees are organisms of great importance for the balance of the environment and the development of agriculture, both for the pollination service and for the possibility of exploiting the hive products. However, losses of *Apis mellifera* colonies are reported all over the world due to causes such as contamination by *Vairimorpha apis* and *V. ceranae* fungi and pathogenic viruses. The objective of this work was to record the presence and level of infection of *V. apis* and *V. ceranae* in *A. mellifera*, in addition to detecting the presence of pathogenic viruses in samples of *A. mellifera* and *V. destructor*. The evaluated samples came from five apiaries located in the Bacia of Jacuípe Region, Bahia. Determination of the *Vairimorpha* spp. was carried out monthly during a period of one year through counts in a Neubauer chamber in an optical microscope, subsequently, the molecular identification of the species present in the sample was carried out using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using specific primers for *V. apis* and *V. ceranae*. The presence of viruses was evaluated in samples of *A. mellifera*, and *V. destructor* collected during the period of five months in the year 2021, through RT-PCR using specific primers for five viral species (DWV, ABPV, IAPV, CBPV and BQCV). As a result, we identified *V. ceranae* in 100% of the analyzed colonies and in all collection months, October representing the highest level of infection (49%) and December the lowest, with an infection level ranging from null to semi-strong, it was not the presence of *V. apis* was verified. The occurrence of *V. ceranae* was observed during all months of the year, and the environmental conditions were favorable to the multiplication of the fungus. In this work, the presence of DWV, ABPV and BQCV viruses was also detected in samples of *A. mellifera* and *V. destructor*. The IAPV and CBPV viruses were not detected. DWV virus was present in all evaluated samples. Simple infections with DWV virus only have been observed. In 60% of the *A. mellifera* samples evaluated, double infection of the DWV-ABPV type and 40% of the DWV-BQCV type were observed. All dual infections observed in *V. destructor* samples were of the DWV-BQCV type. Thus, we conclude that the detection of *V. ceranae* and the DWV, ABPV and BQCV viruses in the evaluated samples confirms the presence of these pathogens in apiaries in the Bacia of Jacuípe Region, demonstrating the need for actions to monitor the bees in that locality. In addition, we conclude that the mite *V. destructor* can act as a vector of DWV, ABPV and BQCV viruses in *A. mellifera* in this region, contributing to the presence and dissemination of these pathogens in apiaries. In this sense, this work should contribute to the scientific knowledge of the beekeeping health of apiaries in the Bacia of Jacuípe Region, Bahia, in addition to providing subsidies for better management of the colonies, avoiding the proliferation and possible impacts caused by the fungus *V. ceranae* and by the viruses DWV, ABPV and BQCV.

**Key words:** Bee health, *Vairimorpha*, *Varroa destructor*, Virus, *Nosema*.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1-** Intensidade da infecção de nosemose em abelhas proposta por Jaycox.....36

**Tabela 2** - Lista de primers específicos utilizados para a detecção e identificação de *Vairimorpha* spp. em *Apis mellifera* .....37

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1** - Temperaturas e ciclos usados para detectar vírus patogênicos em *Apis mellifera* e *Varroa destructor*.....50

**Tabela 2** - Primers usados na RT-PCR para detecção dos vírus patogênicos em *Apis mellifera* e *Varroa destructor*.....51

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1** - Fatores que influenciam a saúde das abelhas em diferentes escalas.....16

### CAPÍTULO 1

**Figura 1** - Apiários localizados na região da Bacia do Jacuípe, Bahia, onde foram realizadas as coletas de *A. mellifera*.....34

**Figura 2** - Procedimento para detecção e contagem de esporos de *Vairimorpha* spp.: (A) separação do pool de 30 abelhas, (B) Remoção dos abdomens, (C) maceração dos abdomens, (D) acréscimo 1 mL de água destilada por abelha, (E) remoção do macerado, (F) retirada de 10 µl do macerado para leitura, (G) câmara de Neubauer com lamínula, (H) leitura em Câmara de Neubauer com objetiva de 40x.....35

**Figura 3** - Câmara de Neubauer, com áreas de contagem em Vermelho.....36

**Figura 4** - Mediana do nível de infecção por *Vairimorpha* spp. em *Apis mellifera* em cada apiário analisado na Bacia do Jacuípe, Bahia.....39

**Figura 5** - Variação da quantidade de esporos de *Vairimorpha* spp. em *A. mellifera* para cada apiário dentro do período de um ano na região Bacia do Jacuípe, Bahia.....40

### CAPÍTULO 2

**Figura 1** - Apiários localizados na região da Bacia do Jacuípe, Bahia, onde foram realizadas as coletas de *A. mellifera*.....49

**Figura 2** - Ocorrência dos vírus DWV, ABPV e BQCV em *Apis mellifera* e *Varroa destructor* coletados em apiários localizados na Bacia do Jacuípe - Bahia.....53

**Figura 3** - Ocorrência dos vírus DWV, ABPV e BQCV em *Apis mellifera* e *Varroa destructor* durante os meses de coleta em apiários localizados na Bacia do Jacuípe-Bahia.....54

**Figura 4** - Ocorrência e caracterização das infecções simples, dupla e tripla nas amostras de *Apis mellifera* e *Varroa destructor* coletados em apiários localizados na Bacia do Jacuípe - Bahia.....55

## SUMÁRIO

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>2.0</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1	Importância das abelhas.....	14
2.2	Doença causada pelo fungo <i>Vairimorpha</i> spp.....	16
2.3	Doenças causadas por vírus.....	19
2.4	Estudos de sanidade apícola na Bacia do Jacuípe - Bahia.....	21
<b>3.0</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 1 – Identificação molecular e índice de infecção de <i>Vairimorpha</i> spp. em <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae).....</b>		<b>30</b>
<b>RESUMO.....</b>		<b>30</b>
<b>ABSTRACT.....</b>		<b>31</b>
<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>2.0</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
2.1	Amostragem.....	33
2.2	Deteção e nível de infestação do microsporídio <i>Vairimorpha</i> spp.....	34
2.3	Análise estatística.....	36
2.4	Maceração das amostras, extração do DNA e PCR.....	37
2.5	Sequenciamento.....	38
<b>3.0</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>4.0</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>5.0</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Detecção de vírus patogênicos em <i>Apis mellifera</i> e <i>Varroa destructor</i>.....</b>		<b>45</b>
<b>RESUMO.....</b>		<b>45</b>
<b>ABSTRACT.....</b>		<b>46</b>
<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>2.0</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
2.1	Amostragem.....	48
2.2	Maceração das amostras.....	49
2.3	Extração e purificação do RNA.....	50
2.4	Síntese de cDNA seguida de Reação de Cadeia de Polimerase (RT-PCR).....	50
2.5	Sequenciamento.....	52
<b>3.0</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>4.0</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>5.0</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os insetos são os principais polinizadores da maioria das culturas agrícolas, pois aproximadamente 70% das culturas dependem da polinização realizada por estes organismos (RICKETTS et al., 2008). Este serviço é essencial para a reprodução e manutenção de espécies vegetais, sendo as abelhas os principais agentes polinizadores que contribuem de forma direta com a diversidade genética da flora e de cultivos agrícolas (GARIBALDI et al., 2016).

No mundo são registadas mais de 20 mil espécies de abelhas que exercem papel importante na biodiversidade vegetal e serviços ecossistêmicos por meio da polinização. O Brasil, devido sua riqueza de ecossistemas e expansão territorial, é privilegiado por abrigar abelhas solitárias e sociais, com mais de 300 espécies de abelhas nativas, além das abelhas *Apis mellifera* L. 1758 que, apesar de não serem nativas, estão em maior abundância no país (FOGEL, 2019).

A abelha *A. mellifera* no Brasil conhecida como abelhas africanizadas é um poli-híbrido devido ao cruzamento de subespécies europeias (*A. m. mellifera* e *A. m. ligustica*) com a subespécie africana (*A. m. scutellata*) (PEDROSO; FEITOSA, 2013). Essas abelhas além de contribuírem com a polinização são importantes por gerarem renda através dos produtos da colônias, que são extraídos e comercializados por apicultores.

A apicultura no Brasil é uma atividade bastante promissora para pequenos, médios e grandes produtores (BACAXIXI et al., 2011), sendo explorado, além do mel, a geleia real, pólen, própolis e apitoxina e dentre outros (TEIXEIRA; VERÍSSIMO, 2015). Assim, diante da importância econômica e social das abelhas africanizadas, estudos que monitoram e detectam fatores que contribuem no enfraquecimento e perda de colônias são necessários, uma vez que o declínio desse grupo polinizador na natureza acarreta em prejuízos socioeconômicos como também contribui com uma perda substancial da flora mundial (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011).

As abelhas estão em um processo gradativo de ameaça a extinção, sofrendo declínio populacional cada vez maior, devido a diversos fatores como o uso indiscriminado de produtos fitossanitários, manejo inadequado das colônias, desmatamento, doenças causadas por fungos, vírus e bactérias e dentre outros (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019). Esses fatores podem agir ou não de forma independente e a interação entre eles pode ocasionar no colapso das

colônias (LOPES; HENRIQUES; PINTO, 2021).

Dentre os parasitos e patógenos responsáveis por perdas de colônias, existem o fungo *Vairimorpha* spp., que é responsável por causar a doença nosebose, afetando o intestino das abelhas e comprometendo seu desempenho e sobrevivência (PAŞCA et al., 2019), o ácaro *Varroa destructor* que é apontado como uma das principais causas para o desaparecimento das abelhas em todo o mundo (LESTER et al., 2022), não só por enfraquecer as abelhas se alimentando da sua gordura corporal (RAMSEY et al., 2019), mas também por transmitir vírus patogênicos, podendo intensificar essa carga viral dentro e entre as colônias, ocasionando na morte das mesmas (NOËL; LE CONTE; MONDET, 2020, REAMS; RANGEL, 2022). No entanto, existem poucos estudos na Bahia descrevendo a incidência desses microrganismos em *A. mellifera*, ressaltando a importância do desenvolvimento deste trabalho.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi registrar a presença e o nível de infecção por *Vairimorpha apis* e *V. ceranae* em *A. mellifera*, além de detectar a presença de vírus patogênicos em amostras de *A. mellifera* e *V. destructor* da região da Bacia do Jacuípe, Bahia.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância das abelhas

As principais espécies vegetais de relevância econômica são dependentes da polinização realizada por diferentes agentes polinizadores (TOLEDO et al., 2003), incluindo os insetos que apresentam maior eficiência na polinização em função da sua diversidade, pois representam 70% das espécies de animais conhecidas na natureza (WIENS et al., 2015). Embora a polinização seja realizada por fatores bióticos e abióticos, as abelhas se destacam como os principais polinizadores, sendo que algumas espécies vegetais dependem diretamente delas para sua manutenção (SOUZA et al., 2007). De acordo com Klee et al. (2007), o nível de dependência de polinizadores pelas culturas agrícolas pode ser classificado como essencial, alto, moderado e pequeno, tendo em vista que 70% das plantas utilizadas no consumo humano dependem da polinização realizada pelas abelhas. No processo de polinização, as abelhas são beneficiadas por meio da oferta de recursos florais, fornecidos pelas plantas. Enquanto elas visitam as plantas para coletar recursos florais, os grãos de pólen se aderem aos seus corpos e assim são passados para uma próxima planta da mesma espécie ao frequentar suas flores, garantindo uma polinização cruzada eficiente (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010).

A maioria das abelhas sociais são manejadas e exploradas comercialmente, pois além da polinização de culturas agrícolas e espécies vegetais nativas, existem os produtos e subprodutos que são explorados e comercializados por meio da apicultura (SOUZA et al., 2007; IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010). No Brasil, a apicultura é considerada uma atividade rentável, sendo promissora devido à flora presente no país, que é considerada umas das maiores e mais ricas do mundo (BACAXIXI, 2011).

Historicamente, a apicultura brasileira tem apresentado crescimento e expansão saindo de uma produção incipiente e limitada ao consumo local para o *status* de importante produtor mundial e exportador de mel (EMBRAPA, 2022). Em 2021, por exemplo, foi registrada uma produção de 55,8 mil toneladas de mel pelo Brasil, tendo um aumento de 6,4% em comparação ao ano anterior (IBGE, 2021). Esse crescimento ocorreu como resultado de uma combinação de fatores, tais como, o embargo do mel chinês no mercado mundial em 2002 devido a

contaminação da produção de mel por antibióticos não permitidos para o consumo humano, até a crise que causou a perda de colônias americanas e europeias em 2006/2007, passando por um crescente investimento governamental, além do processo de africanização da abelha *Apis mellifera* ocorrido no país durante o final da década de 50, cuja espécie se tornou mais resistente às pragas quando comparadas às abelhas europeias e americanas (EMBRAPA, 2022).

A abelha *A. mellifera* presente no Brasil e usada na apicultura nacional é conhecida como abelha africanizada (ou *Africanized Honey Bee* - AHB), é caracterizada como um poli-híbrido resultante do cruzamento de subespécies europeias com subespécie africanas (PEDROSO; FEITOSA, 2013). As abelhas africanizadas estão presentes em todas as regiões do Brasil e são consideradas mais resistentes ao ácaro parasito *Varroa destructor* se comparadas com as abelhas europeias devido o seu comportamento higiênico ser mais eficiente (PINTO et al., 2012). No entanto, essa resistência não as torna imunes, e assim como diversos organismos presentes no meio ambiente, a saúde das abelhas pode ser influenciada por diversos fatores.

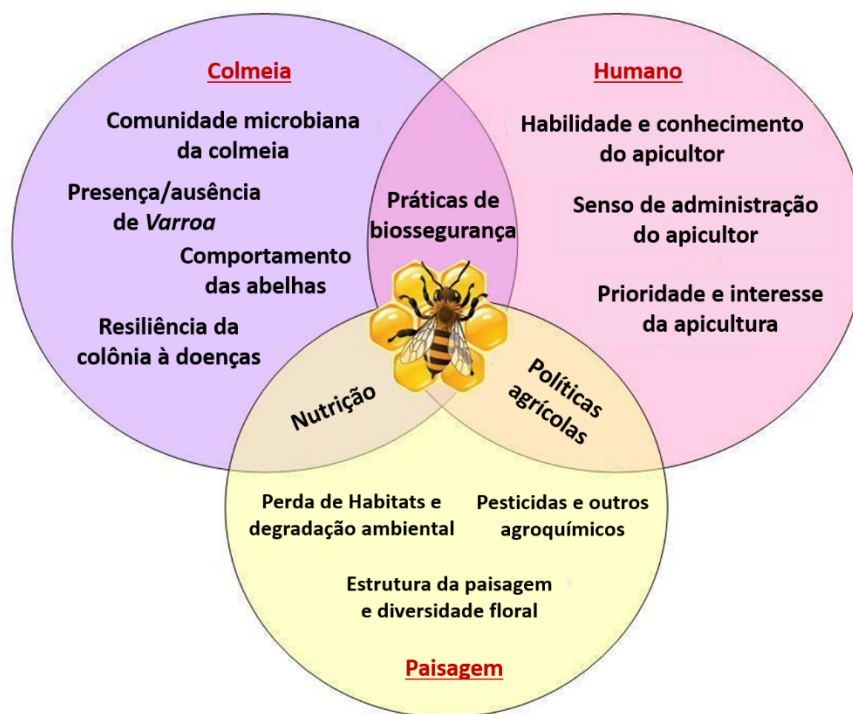
De acordo com Donkersley et al. (2020), os fatores que influenciam a saúde de *A. mellifera* podem ser divididos em três escalas: colmeia, humano e da paisagem/ambiente (Figura 1). Vários estudos corroboram com o que foi observado por esses autores, pois vários fatores são citados como responsáveis por afetar a saúde de *A. mellifera* e, conseqüentemente, causar a perda de colônias, incluindo o uso indiscriminado de produtos fitossanitários, manejo inadequado das colônias, patógenos, parasitos, dentre outros (BERINGER et al., 2019; DA ROSA et al., 2019).

Ao nível da colmeia, Donkersley et al. (2020) reportam que o comportamento das abelhas está relacionado com sua saúde. De fato, por serem altamente sociais, as abelhas africanizadas frequentam uma grande variedade de nichos ambientais e compartilham continuamente alimentos (ANDERSON et al., 2011), sendo essas condições propícias para a transmissão de parasitas e patógenos dentro e entre colônias e, portanto, estão sujeitas aos danos e/ou suscetíveis a desenvolver as doenças causadas por esses microrganismos (REYBROECK et al., 2012), que podem provocar a perda de indivíduos ou dizimar colônias inteiras (PIRES et al., 2016). Dentre esses patógenos, os vírus e os fungos são citados como os principais causadores de doenças em abelhas (TANTILLO et



al., 2015; SCHMID-HEMPEL; LOOSLI, 1998).

**Figura 1** - Fatores que influenciam a saúde das abelhas em diferentes escalas.



Fonte: Adaptado de Donkersley et al. (2020).

## 2.2 Doença causada pelo fungo *Vairimorpha* spp.

Entre os fungos citados como um dos fatores da perda de colônias de *A. mellifera* estão espécies do gênero *Nosema*. Recentemente esse gênero foi revisado e parte de suas espécies foram inseridas no gênero *Vairimorpha*. A separação entre esses dois gêneros era devido a presença de octósporos uninucleados (oito esporos uninucleados), mas por meio da filogenia foi possível identificar que espécies de ambos os gêneros podem apresentar ou não os octósporos uninucleados, os quais dependem de fatores ambientais para que sejam ativados. As duas espécies de *Nosema* associadas com abelhas sociais foram alocadas para *Vairimorpha* (TOKAREV et al., 2020).

O nome dado para as espécies desses microsporídios vinculadas com abelhas está relacionado à espécie de abelha em que foram primeiramente relatados, ou seja, o *Nosema apis* Zander, 1909, que foi relatado em *A. mellifera* na Europa e o *Nosema ceranae* Fries, Feng, Silva, Slemenda e Pieniaek, 1996, que foi detectado em *Apis cerana* na Ásia (FRIES et al., 1996). Ambas as espécies

foram inseridas no gênero *Vairimorpha* (TOKAREV et al., 2020) e seus correspondentes no gênero *Nosema* passaram a ser sinonímia.

*Vairimorpha apis* encontra-se distribuído mundialmente ocorrendo em colônias de *A. mellifera* na América do Norte, América Central, América do Sul, Europa e Ásia (GIERSCH et al., 2009). Essa espécie foi um dos primeiros microsporídios a ser descrito e a doença causada por ela foi reconhecida antes mesmo do seu agente etiológico ser descoberto (HIGES et al., 2010). Em 1909 na Alemanha, os “corpúsculos brilhantes” encontrados no trato digestivo de *A. mellifera* foram nominados como *N. apis*. Em 1975 sua presença foi confirmada em colônias de *A. mellifera* nos Estados Unidos (TRAVER; FELL, 2015) e em 1979 este microsporídio foi detectado no Brasil (TEIXEIRA et al., 2013). Relatos da ocorrência de *Vairimorpha apis* (Zander, 1909) em *A. mellifera* são mais escassos quando comparados aos de *V. ceranae*.

*Vairimorpha ceranae* (Fries, Feng, Silva, Slemenda e Pieniaek, 1996) foi primeiramente descrito na espécie *A. cerana* na Ásia em 1994. Nessa época acreditava-se que este microsporídio era restrito apenas a esta espécie de abelha no leste da Ásia (FRIES et al., 1996). Mais tarde foi também detectado em colônias de *A. mellifera* na Europa (HIGES et al., 2006) e novamente na Ásia (HUANG et al., 2007). Atualmente, *V. ceranae* encontra-se disseminado em todo o mundo.

Estudos indicam que *V. ceranae* foi transferido de seu hospedeiro original (*A. ceranae*) para abelhas *A. mellifera*. Porém, ainda não há relatos do exato momento em que ocorreu essa transmissão e qual rota metabólica facilitou a infecção de *V. ceranae* a essa nova população hospedeira (CHEN et al., 2008). A detecção mais antiga relatada dessa espécie em *A. mellifera* ocorreu no Uruguai em 1964 (INVERNIZZI et al., 2009), seguido de sua ocorrência no Brasil em 1979 (TEIXEIRA et al., 2013).

Apesar de muitos estudos citarem o início da disseminação de *V. ceranae* em colônias de *A. mellifera* na Europa, a data mais antiga de sua detecção neste continente foi em 1998 (PAXTON et al., 2007), ou seja, posterior às ocorrências do microsporídio na América do Sul e América do Norte (PAXTON et al., 2007; IVERNIZZI et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2013). De acordo com Higes et al (2010), a detecção simultânea de *V. ceranae*, tanto na Europa como na Ásia, pode não estar relacionada com a mudança de hospedeiro para *A. mellifera* e sim pelo desenvolvimento de novas ferramentas moleculares altamente sensíveis e

específicas na detecção do microsporídio.

Além de *A. mellifera*, há relatos da ocorrência de *V. ceranae* em outras espécies do gênero *Apis*: *A. cerana* (FRIES et al., 1996), *A. koschevnikovi* (BOTÍAS et al., 2012), *A. florea* e *A. dorsata* (CHAIMANEE et al., 2011). Esse microsporídio também tem sido descrito infectando espécies do gênero *Bombus* spp. (PLISCHUK et al., 2009; GRAYSTOCK et al., 2013), como *B. brasiliensis* na Argentina (PLISCHUK; LANGE, 2016), *B. atratus* e *B. bellicosus* no Uruguai (ARBULO et al., 2015).

A infecção do microsporídio *Vairimorpha* pode causar a doença conhecida por nosemose, sendo uma das doenças mais agravantes e prevalentes em abelhas em todo o mundo (MORITZ et al., 2010). *Vairimorpha* spp. pode causar diarreia, dilatação abdominal e, em casos, severos a morte das abelhas. A perda de líquido pela diarreia enfraquece as abelhas causando redução populacional e danos econômicos para o produtor (CARLETTO et al., 2013; FONTBONNE et al., 2013). As infecções por *Vairimorpha* spp. afetam o comportamento das abelhas bem como sua fisiologia e podem causar modificações na produção de feromônios fazendo com que as abelhas saiam para o forrageamento precocemente o que afeta a dinâmica da colônia (PARIS et al., 2018).

A transmissão por *V. ceranae* ocorre por via fecal-oral (CARLETTO et al., 2013; FONTBONNE et al., 2013), mas pode ocorrer também a transmissão via horizontal na qual os microsporídios são passados das abelhas operárias para a rainha, no momento da alimentação da rainha (HIGES et al., 2009). Relatos da infecção dos ovários e espermateca de rainhas de *A. mellifera* por *V. ceranae* sugerem também a possibilidade de transmissão vertical desse microsporídio (TRAVER; FELL, 2012).

Outra forma de dispersão de *V. ceranae* ocorre por meio do comércio mundial de produtos apícolas (KLEE et al., 2007), como o mel (GIERSCH et al., 2009) e a geleia real (COX-FOSTER et al., 2007) que foram relatados como fontes de esporos de *V. ceranae*. Materiais apícolas contaminados também facilitam a dispersão do microsporídio de apiário para apiário entre diferentes áreas geográficas (KLEE et al., 2007). Além disso, a comercialização de rainhas e de operárias pode ser mais uma via de infecção de *V. ceranae* para outras localidades (GIERSCH et al., 2009).

A infecção por *V. Ceranae* em zangões maduros e imaturos foi reportada,

sendo assim, um meio de propagação do fungo dentro e entre os apiários já que estes são conhecidos por derivarem de suas colmeias para outras colmeias com finalidade reprodutiva (TRAVER; FELL, 2011). Peng et al. (2016) descobriram que o fluido seminal de zangões de *A. mellifera* apresentam em seu conteúdo moléculas antimicrobianas eficientes capazes de matar os esporos de *V. apis* e assim reduzir o risco de transmissão da doença durante o acasalamento.

Além da nosemose, outras doenças afetam abelhas melíferas, com destaque para àquelas causadas por vírus patogênicos.

### 2.3 Doenças causadas por vírus

Existem pelo menos 30 vírus que estão relacionados a perdas de colônias e danos em abelhas (AMIRI et al., 2020). Grande parte das abelhas e/ou colônias contaminadas por vírus patogênicos não demonstram sinais clínicos, porém, quando esses indivíduos são submetidos a certas circunstâncias de estresse os vírus podem se multiplicar e espalhar entre os indivíduos, tendo sinais clínicos perceptíveis (BAILEY, 1968).

O vírus deformador de asas (em inglês, *Deformed Wing Virus - DWV*), tem como principal sintoma a deformação das asas de abelhas e é responsável pela morte de milhões de abelhas em todo o mundo (MARTIN et al., 2012; BARRIGA et al., 2012). Esse vírus é transmitido horizontalmente, tanto pelo ácaro *V. destructor* (GISDER et al., 2009), quanto pelos hábitos alimentares, comportamentos higiênicos, dentre outros (MOCKEL et al., 2011; MAZZEI et al., 2014).

O vírus da realeira negra (em inglês, *Black Queen Cell Virus - BQCV*) causa o escurecimento de células de crias de rainha e conseqüentemente a morte desses indivíduos (DE MIRANDA et al., 2013). Esse vírus pode ser transmitido por via horizontal quando as operárias alimentam a rainha (CHEN et al., 2006).

As abelhas infectadas com o vírus da paralisia crônica (em inglês, *Chronic Bee Paralysis Virus - CBPV*), apresentam uma deficiência de voo, e normalmente são encontradas na frente das colônias se rastejando e sem conseguir voar, sendo transmitido horizontalmente, por fezes das abelhas paralisadas (RIBIÈRE et al., 2007).

Existem ainda os vírus da paralisia aguda (em inglês, *Acute Bee Paralysis Virus - ABPV*) e vírus Israelense da paralisia aguda (em inglês, *Israeli Acute Paralysis Virus - IAPV*), que também são responsáveis por causar paralisia nas

abelhas, e podem ser transmitidos tanto verticalmente quanto horizontalmente (DE MIRANDA et al., 2013).

O entendimento das formas de transmissão de vírus em abelhas e os processos que a determinam se faz necessário na tentativa de entender como ocorre a persistência dos patógenos em uma população de abelhas, pois geralmente a transmissão de vírus se dá normalmente por duas vias: a transmissão horizontal e a transmissão vertical (TANTILLO et al., 2015).

A transmissão horizontal ocorre quando os vírus são transmitidos entre diferentes indivíduos da mesma geração, sendo classificada como transmissão horizontal por via direta e indireta. A transmissão via indireta (transmissão vetorial) é verificada quando um vetor adquire o vírus de um hospedeiro infectado e o transmite para um novo hospedeiro saudável. A ocorrência de vírus de abelhas no ácaro *V. destructor* é um indicativo do papel deste ácaro como vetor de vírus entre as abelhas através da via horizontal indireta (GISDER et al., 2009; BAKONYI et al., 2002; ONGUS et al., 2004; TENTCHEVA et al., 2004; CHEN et al., 2005).

O ácaro *V. destructor* funciona como um vetor mecânico do ABPV, pois até o momento não existem evidências de replicação deste vírus dentro do ácaro (D'ALVISE et al., 2019; DE MIRANDA et al., 2010). Já para o DWV funciona como um vetor biológico, pois o vírus se multiplica dentro do indivíduo (GISDER et al., 2009). Além disso, este ácaro tem sido citado como vetor de outros vírus patogênicos em abelhas (DE MIRANDA et al., 2013).

Os vírus DWV, BQCV, CBPV, ABPV e IAPV, foram constatados ocorrendo em colônias de *A. mellifera* na região nordeste, mais precisamente em quatro municípios no estado da Bahia, sendo que em todas as colônias avaliadas foi detectado a presença do ácaro *V. destructor* que pode ser um possível transmissor desses patógenos (PEIXOTO et al., 2021). No entanto, não há registro de estudos de detecção de vírus, nem da presença dos fungos *V. apis* e *V. ceranae*, em colônias de *A. mellifera* instaladas na Bacia do Jacuípe, e a presença desses patógenos nessa localidade pode afetar a saúde dessas abelhas e impactar a cadeia de produção de mel e, conseqüentemente, trazer prejuízos econômicos, além dos ecológicos.

## 2.4 Estudos de sanidade apícola na Bacia do Jacuípe - Bahia

A Bacia do Jacuípe está localizada no semiárido baiano e compreende 15 municípios com características bastante rurais, tendo 48,42% da população vivendo no campo (BAHIA, 2022), sendo a apicultura uma das atividades responsável pela geração de renda neste território (OLIVEIRA et al., 2021). Não há registros na literatura de análises, na Região da Bacia do Jacuípe, para a detecção de vírus e do fungo *Vairimorpha* spp. em *A. mellifera*, o que é necessário devido a importância da apicultura nesta área, bem como do ecossistema ali presente. Até o momento, estudos realizados na Bahia para a identificação de vírus em *A. mellifera* apresentavam como área amostral apenas três municípios (PEIXOTO et al., 2021), o que não demonstra a realidade da sanidade apícola da Bacia do Jacuípe, pois ainda não foram realizados estudos nessa localidade para a identificação de vírus; e além disso, para *Vairimorpha* spp. o número de amostras analisadas foram mínimas não sendo relatado o nível de infecção (LAGE et al., 2022).

Considerando os danos que os vírus e *Vairimorpha* spp. causam em abelhas, conforme explicitado anteriormente nesta revisão, estudos que identifiquem a ocorrência desses patógenos, bem como as rotas de transmissão de vírus, no intuito de diminuir os riscos apresentados por esses organismos são necessárias, principalmente porque a maioria das doenças associadas as abelhas só apresentam sinais clínicos em momentos de estresses ou deficiência nutricional.

O ácaro *V. destructor*, é um ectoparasito obrigatório responsável por causar a doença varroatose que age se alimentando do corpo gorduroso da abelha, causando o enfraquecimento, perda da longevidade e deficiência de voo (DE MIRANDA et al., 2013; RAMSEY et al., 2019). Além disso, esse ácaro é citado como vetor de vírus patogênicos em abelhas favorecendo o desenvolvimento de outras doenças (MARTIN et al., 2012).

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível identificar quais espécies de vírus patogênicos estão presentes em amostras de abelhas *A. mellifera* e de ácaros *V. destructor* coletados nesta área, bem como elucidar se *V. destructor* é responsável pela transmissão de vírus patogênicos em *A. mellifera* nessa localidade. Além disso, avaliar a ocorrência do *Vairimorpha* spp. na Bacia do Jacuípe durante o período de um ano, correlacionando esses resultados com os fatores ambientais.

Dessa forma, este trabalho foi dividido em duas etapas: no Capítulo 1 foi realizado a identificação molecular de *Vairimorpha* spp., bem como a determinação do índice de infecção em operárias de *A. mellifera* africanizada durante o período de um ano; e no Capítulo 2 foi realizada a detecção de vírus patogênicos em amostras de operárias *A. mellifera* africanizada e amostras do ácaro *V. destructor* provenientes de apiários localizados na região da Bacia do Jacuípe, Bahia.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIRI, E.; STRAND, M. K.; TARPY, D. R.; RUEPPELL, O. Honey bee queens and virus infections. **Viruses**, v. 12, n. 3, p. 322, 2020.
- ANDERSON, K. E.; SHEEHAN, T. H.; ECKHOLM, B. J.; MOTT, B. M.; De GRANDI-HOFFMAN, G. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, v. 58, n. 4, p. 431-444, 2011.
- ARBULO, N.; ANTÚNEZ, K.; SALVARREY, S.; SANTOS, E.; BRANCHICCELA, B.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; et al. High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 165-168, 2015.
- BACAXIXI, P.; BUENO, C. E.; RICARDO, H. A.; EPIPHANIO, P. D.; SILVA, D. P.; BARROS, B. M.; et al. A importância da apicultura no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 10, n. 20, 2011.
- BAILEY, L. Honey bee pathology. **Annual Review of Entomology**, v. 13, n. 1, p. 191-212, 1968.
- BAKONYI, T.; FARKAS, R.; SZENDRÖI, A.; DOBOS-KOVÁCS, M.; RUSVAI, M. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. **Apidologie**, v. 33, n. 1, p. 63-74, 2002.
- BARRIGA, G. P.; CIFUENTES-MUÑOZ, N.; RIVERA, P. A.; GUTIERREZ, M.; SHMARYAHU, A.; VALENZUELA, P. D.; et al. First detection and complete genome sequence of Deformed wing virus in Chilean honeybees. **Virus Genes**, v. 45, n. 3, p. 606-609, 2012.
- BERINGER, J.; MACIEL, F. L.; TRAMONTINA, F. F. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. **Revista Eletrônica Científica**, v. 5, n. 1, p. 18-27, 2019.
- BOTÍAS, C.; ANDERSON, D. L.; MEANA, A.; GARRIDO-BAILÓN, E.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; HIGES, M. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 1, p. 108-113, 2012.
- CARLETTO, J.; BLANCHARD, P.; GAUTHIER, A.; SCHURR, F.; CHAUZAT, M. P.; RIBIÈRE, M. Improving molecular discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, n. 1, p. 52-55, 2013.
- CHAIMANEE, V.; CHEN, Y.; PETTIS, J. S.; CORNMANN, R. S.; CHANTAWANNAKUL, P. Phylogenetic analysis of *Nosema ceranae* isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. 3, p. 229-233, 2011.
- CHEN, Y. P.; PETTIS, J. S.; COLLINS, A.; FELDLAUFER, M. F. Prevalence and transmission of honeybee viruses. **Applied and environmental microbiology**, v.



72, n. 1, p. 606-611, 2006.

CHEN, Y.; EVANS, J. D.; SMITH, I. B.; PETTIS, J. S. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United State. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 2, p. 186-188, 2008.

CHEN, Y.; PETTIS, J. S.; FELDLAUFER, M. F. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, n. 2, p. 118-121, 2005.

COX-FOXTER, D.L.; CONLAN, S.; HOLMES, E.C.; PALACIOS, G.; EVANS, J.D.; MORAN, N.A.; et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283–287, 2007.

DA ROSA, J. M.; ARIOLI, C. J.; NUNES-SILVA, P.; GARCIA, F. R. M. Desaparecimento de abelhas polinizadoras nos sistemas naturais e agrícolas: Existe uma explicação? **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 18, n. 1, p. 154-162, 2019.

D'ALVISE, P.; SEEBURGER, V.; GIHRING, K.; KIEBOOM, M.; HASSELMANN, M. Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 18, p. 10241-10252, 2019.

DE MIRANDA, J. R.; BAILEY, L.; BALL, B. V.; BLANCHARD, P.; BUDGE, G. E.; CHEJANOVSKY, N.; et al. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, p. 1-56, 2013.

DE MIRANDA, J. R.; DAINAT, B., LOCKE, B.; CORDONI, G.; BERTHOUD, H.; GAUTHIER, L.; et al. Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of General Virology**, v. 91, n. 10, p. 2524-2530, 2010.

DONKERSLEY, P.; ELSNER-ADAMS, E.; MADERSON, S. A One-Health model for reversing honeybee (*Apis mellifera* L.) decline. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 3, p. 119, 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA. Mel Brasileiro conquista o mercado externo. **Inovação em pauta**, n. 10, p. 1-6, 2022. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31892/1/REVFINEPAPICULTURAPI.pdf> Acessado em: 06/07/2022.

FOGUEL, I. **O mundo das abelhas**. São Paulo, Editora Yolbook, 2019.

FONTBONNE, R.; GARNERY, L.; VIDAU, C.; AUFAUVRE, J.; TEXIER, C.; TCHAMITCHIAN, S.; et al. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 188-194, 2013.

FRIES, I.; CHAUZAT, M. P.; CHEN, Y. P.; DOUBLET, V.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; et al. Standard methods for *Nosema* research. **Journal of Apicultural**

**Research**, v. 52, n. 1, p. 1-28, 2013.

FRIES, I.; FENG, F.; DA SILVA, A.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, v. 32, n. 3, p. 356-365, 1996.

GARIBALDI, L. A.; CARVALHEIRO, L. G.; VAISSIÈRE, B. E.; GEMMILL-HERREN, B.; HIPÓLITO, J.; FREITAS, B. M.; et al. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 388-391, 2016.

GIERSCH, T.; BERG, T.; GALEA, F.; HORNITZKY, M. *Nosema ceranae* honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. **Apidologie**, v. 40, n. 2, p. 117-123, 2009.

GISDER, S.; AUMEIER, P.; GENERSCH, E. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). **Journal of General Virology**, v. 90, n. 2, p. 463-467, 2009.

GRAYSTOCK, P.; YATES, K.; DARVILL, B.; GOULSON, D.; HUGHES, W. O. Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, n. 2, p. 114-119, 2013.

HIGES, M.; MARTIN, R.; MEANA, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, n. 2, p. 93-95, 2006.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARÍN, P.; MEANA, A. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 6, p. 495-498, 2009.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; GARRIDO-BAILÓN, E.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; MEANA, A.; et al. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 2, p. 243-250, 2010.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 375-392, 2010.

HIGHFIELD, A. C.; EL NAGAR, A.; MACKINDER, L. C.; NOËL, L. M.; HALL, M. J.; MARTIN, S. J.; et al. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7212-7220, 2009.

HUANG, W.; JIANG, J.; CHEN, Y.; WANG, C. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 38, n. 1, p. 30-37, 2007.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 59-62,

2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal. 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticasnovoportaleconomicas/agriculturaepecuaria/9107-producao-da-pecuariamunicipal.html?&t=resultados> Acesso em: 30 de julho de 2021.

INVERNIZZI, C.; ABUD, C.; TOMASCO, I. H.; HARRIET, J.; RAMALLO, G.; CAMPÁ, J.; et al. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 2, p. 150-153, 2009.

KLEE, J.; BESANA, A. M.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; NANETTI, A.; TAM, D. Q.; et al. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 1, p. 1-10, 2007.

LAGE, V. M.; SANTANA, C. D.; PATROCÍNIO, E.; NORONHA, R. P.; MELO, R. L. D.; BARBOSA, C. D. J.; et al. Prevalence of *Nosema ceranae* in apiculture regions of Bahia State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 52, n. 9, p. e20210473, 2022.

LESTER, P. J.; FELDEN, A.; BATY, J. W.; BULGARELLA, M.; HAYWOOD, J.; MORTENSEN, A. N.; et al. Viral communities in the parasite *Varroa destructor* and in colonies of their honey bee host (*Apis mellifera*) in New Zealand. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2022.

LOPES, A. R.; HENRIQUES, D.; PINTO, M. A. Vírus: os inimigos invisíveis da abelha (*Apis mellifera* L.). **O Apicultor**, n. 114, p. 9-15, 2021.

MALERBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 4, p. 237-242, 2003.

MARTIN, S. J.; HIGHFIELD, A. C.; BRETTELL, L.; VILLALOBOS, E. M.; BUDGE, G. E.; POWELL, M.; et al. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1304-1306, 2012.

MAZZEI, M.; CARROZZA, M. L.; LUISI, E.; FORZAN, M.; GIUSTI, M.; SAGONA, S.; et al. Infectivity of DWV associated to flower pollen: experimental evidence of a horizontal transmission route. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113448, 2014.

MOECKEL, N.; GISDER, S.; GENERSCH, E. Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 2, p. 370-377, 2011.

MORITZ, R. F.; DE MIRANDA, J.; FRIES, I.; LE CONTE, Y.; NEUMANN, P.; PAXTON, R. J. Research strategies to improve honeybee health in Europe. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 227-242, 2010.

NOËL, A.; LE CONTE, Y.; MONDET, F. *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 1, p. 45-57, 2020.

NOGUEIRA-COUTO, R. H.; PEREIRA, J. M.; COUTO, L. A. Estudo da polinização entomófila em *Cucurbita pepo* (abóbora italiana). **Científica**, v.18, n.1, p.21-27, 1990.

OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, P. M.; SANTOS, D. M.; SILVA, F. L.; CARVALHO, C. A. Produção e comercialização de mel no território da Bacia do Jacuípe, Bahia. Em: **A face interdisciplinar das ciências agrárias**, Ponta Grossa, ATENA cap. 25, v. 2, 2021. p. 216-229.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals?. **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

ONGUS, J. R.; PETERS, D.; BONMATIN, J. M.; BENGSCHE, E.; VLAK, J. M.; VAN OERS, M. M. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 12, p. 3747-3755, 2004.

PARIS, L.; EL ALAOU, H.; DELBAC, F.; DIOGON, M. Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. **Current Opinion in Insect Science**, v. 26, p. 149-154, 2018.

PAȘCA, C.; MĂRGHITAȘ, L. A.; ȘONEA, C.; BOBIȘ, O.; BUZURA-MATEI, I. A.; DEZMIREAN, D. S. A Review of *Nosema ceranae* and *Nosema apis*: Characterization and Impact for Beekeeping. **Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies**, v. 76, n. 2, p. 77- 87, 2019.

PAXTON, R. J.; KLEE, J.; KORPELA, S.; FRIES, I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. **Apidologie**, v. 38, n. 6, p. 558-565, 2007.

PEDROSO, L. G.; FEITOSA, C. O. Contrastes da produção de mel de abelhas na região Sul e Nordeste do Brasil: possibilidade de expansão da atividade no Nordeste. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural - Sober Nordeste**, v. 8, p. 20, 2013.

PEIXOTO, C. M.; FRANCA, S. O.; MERCES, C. C. ; CORREIA-OLIVEIRA, M. E. ; CARVALHO, C. A. Occurrence of pathogenic viruses in Africanized honey bees in Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, p. 1-8, 2021.

PENG, Y.; GRASSL, J.; MILLAR, A. H.; BAER, B. Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. **Proceedings of the Royal Society**, v. 283, n. 1823, p. 20151785, 2016.

PINTO, F. D.; PUKER, A.; BARRETO, L. M. The ectoparasite mite *Varroa destructor* Anderson and Trueman in southeastern Brazil apiaries: effects of the hygienic behavior of Africanized honey bees on infestation rates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1194-1199, 2012.

PIRES, C. S.; PEREIRA, F. D.; LOPES, M. T.; NOCELLI, R. C.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há

casos de CCD?. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 422-442, 2016.

PLISCHUK, S.; LANGE, C. E. *Bombus brasiliensis* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) infected with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p. 347-351, 2016.

PLISCHUK, S.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; PRIETO, L.; LUCÍA, M.; BOTÍAS, C.; MEANA, A.; et al. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 2, p. 131-135, 2009.

RAMSEY, S. D.; OCHOA, R.; BAUCHAN, G.; GULBRONSON, C.; MOWERY, J. D.; COHEN, A.; et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 5, p. 1792-1801, 2019.

REAMS, T.; RANGEL, J. 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**, v. 22, n. 1, p. 18-28, 2022.

REYBROECK, W.; DAESELEIRE, E.; DE BRABANDER, H. F.; HERMAN, L. Antimicrobials in beekeeping. **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 1-2, p. 1-11, 2012.

RIBIÈRE, M.; LALLEMAND, P.; ISCACHE, A. L.; SCHURR, F.; CELLE, O.; BLANCHARD, P.; et al. Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7711-7716, 2007.

RICKETTS, T. H.; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; BOGDANSKI, A.; et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, v. 11, n. 5, p. 499-515, 2008.

SCHMID-HEMPEL, P.; LOOSLI, R. Uma contribuição para o conhecimento das infecções por *Nosema* em abelhas, *Bombus* spp. **Apidologie**, v. 29, n. 6, p. 525-535, 1998.

SGUAZZA, G. H.; REYNALDI, F. J.; GALOSI, C. M.; PECORARO, M. R. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 194, n. 1-2, p. 102-106, 2013.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; DE CALDAS PINTO, M. S. As abelhas como agentes polinizadores. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2007.

TANTILLO, G.; BOTTARO, M.; DI PINTO, A.; MARTELLA, V.; DI PINTO, P.; TERIO, V. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. **Italian Journal of Food Safety**, v. 4, n. 3, 2015.

TEIXEIRA, E. W.; DOS SANTOS, L. G.; SATTTLER, A.; MESSAGE, D.; ALVES, M. L.; MARTINS, M. F.; et al. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. **Journal of Invertebrate**

**Pathology**, v. 114, n. 3, p. 250-254, 2013.

TEIXEIRA, L. V.; VERÍSSIMO, S. A. Mel e derivados: a inspeção dos produtos apícolas é responsabilidade do médico veterinário. **Cadernos Técnicos Veterinária Zootecnia**, n. 77, p. 115-129, 2015.

TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; JOUVE, S.; CANABADY-ROCHELLE, L.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; et al. Polymerase Chain Reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. **Apidologie**, v. 35, n. 4, p. 431-439, 2004.

TOKAREV, Y. S.; HUANG, W. F.; SOLTER, L. F.; MALYSH, J. M.; BECNEL, J. J.; VOSSBRINCK, C. R. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 169, p. 107279, 2020.

TOLEDO, V. D.; FRITZEN, A. E.; NEVES, C. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C.; SOFIA, S. H.; TERADA, Y. Plants and pollinating bees in Maringá, State of Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 705-710, 2003.

TRAVER, B. E.; FELL, R. D. A scientific note: survey for *Nosema* spp. in preserved. **Apidologie**, v. 46, n. 2, 194-196, 2015.

WIENS, J. J.; LAPOINT, R. T.; WHITEMAN, N. K. Herbivory increases diversification across insect clades. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.

## Capítulo 1: Identificação molecular e índice de infecção de *Vairimorpha* spp. em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

### Resumo

No gênero *Vairimorpha* até o momento, existem duas espécies de que pode acometer a *Apis mellifera*, a *V. apis* e a *V. ceranae*, ambas responsáveis por causar a doença nosemose, que é considerada uma das doenças mais prevalentes e economicamente devastadoras na área de apicultura. Diante disso, este trabalho teve como objetivo registrar a presença e o nível de infecção de *Vairimorpha* spp. em operárias de *A. mellifera* da Região da Bacia do Jacuípe, Bahia. Para isso, foram realizadas coletas de abelhas em cinco apiários mensalmente durante um ano, sob autorização (número 80448) do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade. No laboratório foram feitas análises por meio de microscopia óptica para detecção de esporos fúngicos e determinação do nível de infecção por meio de contagem dos esporos utilizando câmara de Neubauer. Posteriormente, as amostras nas quais foram observadas a presença de esporos foram submetidas a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para identificação a nível de espécie, utilizando primers específicos para *V. apis* (forward: 5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTA-3'/reverse:5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACA-3') e *V. ceranae* (forward: 5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'/reverse:5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG-3'), com ciclo de temperatura de 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos de amplificação de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 61.8 °C, 50 segundos a 72°C, e ciclo final de 7 minutos a 72°C. O resultado da reação foi visualizado em eletroforese de gel de agarose. Os resultados moleculares revelaram a presença apenas da espécie *V. ceranae* em todas as colônias, não sendo encontrada *V. Apis* em nenhuma das amostras analisadas. O nível de infecção variou de nulo a semiforte, embora não seja uma infecção forte a espécie *V. ceranae* foi detectada durante todos os meses do ano e quando as condições ambientais são favoráveis tendem a multiplicar-se rapidamente.

**Palavras-Chave:** Nosemose, fungo, parasito, PCR, esporos.

**Chapter 1: Molecular identification and infection rate of *Vairimorpha* spp. in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**

**Abstract**

In the genus *Vairimorpha* so far, there are two species that can affect *Apis mellifera*, *V. apis* and *V. ceranae*, both responsible for causing the disease we are being considered, which is considered one of the most prevalent and economically devastating diseases in beekeeping. Given this, this work aimed to register the presence and level of infection of the *Vairimorpha* spp. In *A. mellifera* workers of the Bacia of Jacuípe Region, Bahia. To this end, bee collections were performed in five apiaries monthly for one year, under authorization (80448) of the Biodiversity Authorization and Information System. In the laboratory analyzes were made by optical microscopy for detection of fungal spores and determination of the level of infection by counting the spores using Neubauer chamber. Subsequently, the samples in which the presence of spores were observed the Polymerase Chain Reaction technique (PCR), for species identification, using *V. apis* specific primer (forward: 5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'/reverse:5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG-3') and *V. ceranae* (forward: 5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA-3'/reverse:5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG-3'), with temperature cycle from 2 minutes to 94 ° C, 30 amplification cycles of 15 seconds to 94 ° C, 30 seconds to 61.8 ° C, 50 seconds to 72 ° C, and final cycle of 7 minutes to 72 ° C. The result of the reaction was viewed in agarose gel electrophoresis. The molecular results revealed the presence only of the species *V. ceranae* in all colonies, not being found *V. apis* in any of the analyzed samples. The level of infection ranged from null to semi-strong, although it is not a strong infection to species *V. ceranae* was detected throughout the month of the year and when environmental conditions are favorable tend to multiply rapidly.

**Keywords:** Nosemosis, fungus, parasite, PCR, spores.



## 1. INTRODUÇÃO

A polinização é um serviço ecossistêmico essencial para o desenvolvimento das espécies vegetativas, a manutenção da diversidade genética e reprodução da flora (GARIBALDI et al., 2016). Embora existam muitos insetos que realizam a polinização, as abelhas são os principais polinizadores, sendo que algumas espécies de vegetais dependem diretamente delas para sua manutenção (SOUZA et al., 2007).

O declínio desses polinizadores pode causar um impacto na economia mundial, diante disso, muitos pesquisadores buscam entender o que pode estar associado a perdas de colônias de abelhas, uma vez que, existem diversos fatores que podem influenciar nesse fenômeno, como o uso indiscriminado de produtos fitossanitários, patógenos, parasitos, manejo inadequado de colônias, poluição, dentre outros (BERINGER et al., 2019; DA ROSA et al., 2019).

O fungo do gênero *Vairimorpha*, revisado por Tokarev et al. (2020), é responsável por causar a doença nosemose, que é considerada uma das mais prevalentes e economicamente devastadoras na apicultura mundial (FRIES et al., 2013).

A infecção por este fungo pode prejudicar o intestino médio e aumentar o consumo de energia pelas abelhas, além de afetar a fisiologia e o comportamento da colônia, caso essa infecção ocorra combinada com fatores abióticos ou com a presença de parasitos, esse índice pode aumentar e levar a morte dessas abelhas (PARIS et al., 2018).

Existem duas espécies de *Vairimorpha* que pode acometer *A. mellifera*, a *V. apis* e *V. ceranae*, sendo ambas responsáveis por causar a doença nosemose. Porém, *V. ceranae* tem se demonstrado mais prevalente (CHEN et al., 2009), tanto a nível individual quanto da colônia (HIGES et al., 2013).

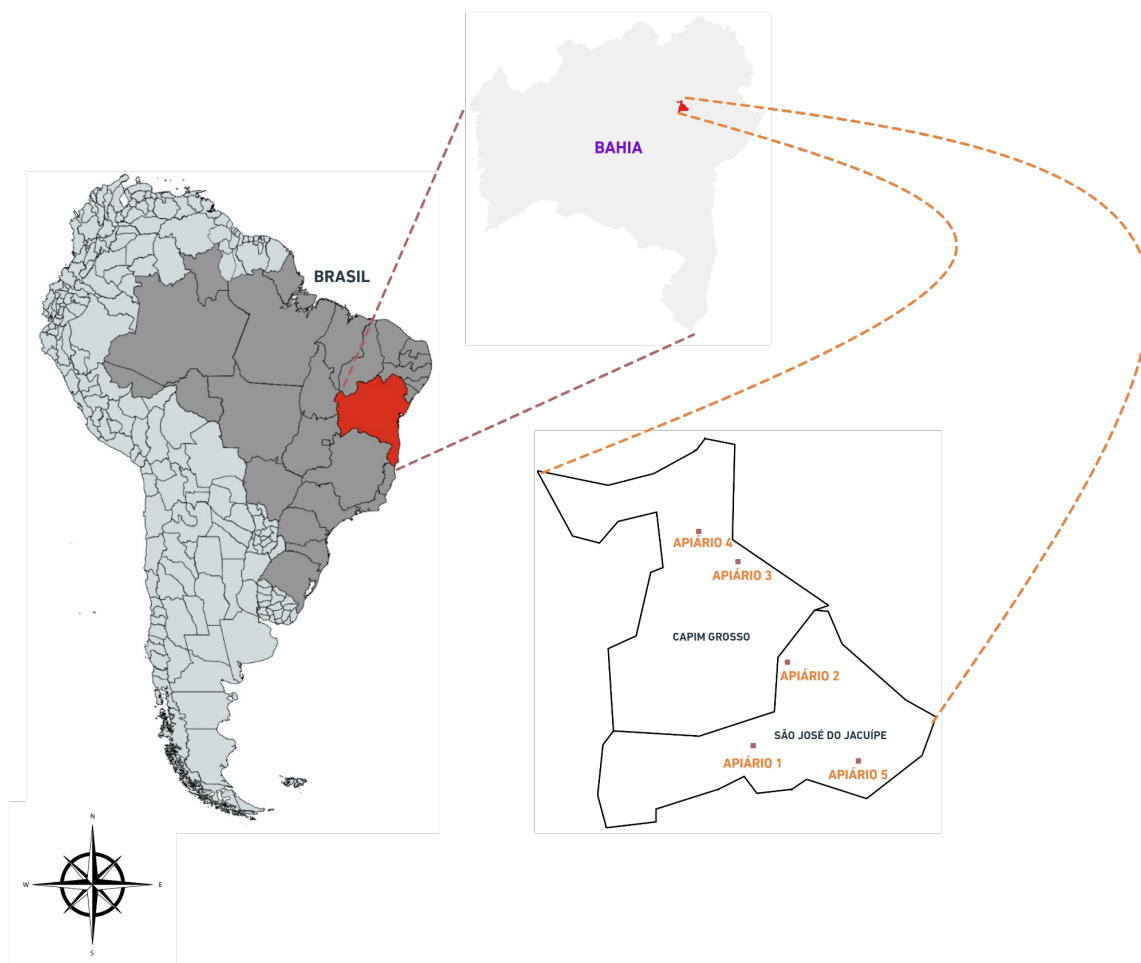
Diante disso, esse trabalho teve como objetivo registrar a presença e determinar o nível de infecção de *Vairimorpha* em operárias de *Apis mellifera* provenientes de colônias instaladas em apiários comerciais na Região da Bacia do Jacuípe, Bahia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

As amostras foram provenientes de cinco apiários situados em dois municípios pertencente a Bacia do Jacuípe: São José do Jacuípe-BA localizado (coordenadas 11° 25' 17" S e 39° 52' 15" O) e Capim Grosso-BA localizado pelas coordenadas 11° 22' 54" S e 40° 0' 46" O (Figura 1). As coletas foram realizadas sob autorização do SISBIO (número 80448), durante o período de um ano (janeiro a dezembro/2021) em apiários com condições populacionais semelhantes. Em cada apiário foram avaliadas 20 colônias, sendo analisadas 150 abelhas por apiário mensalmente para o nível de infecção do microsporídeo. Para a análise molecular foram avaliadas 90 abelhas por apiário nos meses com maior infecção. As abelhas coletadas foram acondicionadas em recipientes contendo álcool 70% e transportadas em caixas térmicas contendo gelo, para o laboratório de pesquisa (INSECTA) na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em laboratório essas abelhas ficaram conservadas em ultra-freezer a - 80°C.

**Figura 1** - Apiários localizados na região da Bacia do Jacuípe, Bahia, onde foram realizadas as coletas de *A. mellifera*.

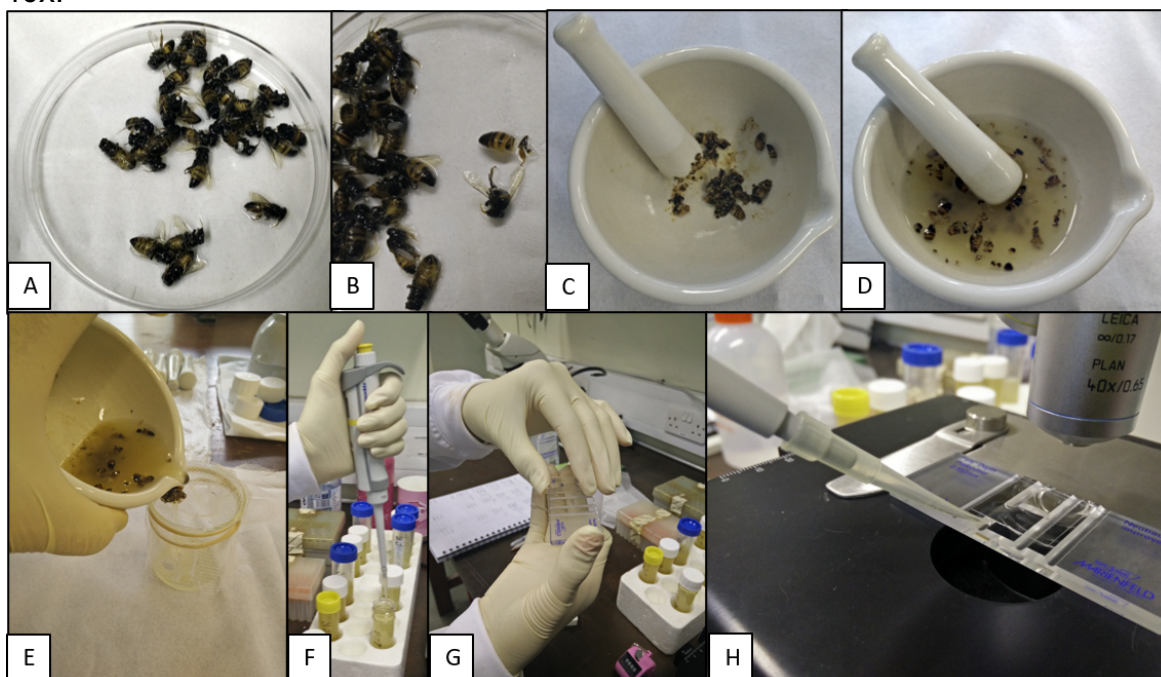


## 2.2 Detecção e nível de infestação do microsporídio *Vairimorpha* spp.

A detecção do microsporídio *Vairimorpha* spp. foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo Manual de Testes, Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE) 2013. Por apiário foram separadas 150 abelhas mensalmente, das quais foram analisadas em *pool* de 30 abelhas (Figura 2A), que foram dissecadas individualmente separando a cabeça e tórax do abdômen (Figura 2B). Este último foi macerado em cadinho de porcelana com o auxílio de pistilo (Figura 2C). Após a maceração, foi acrescentado 1 mL de água destilada, por abelha, diluindo o macerado, que em seguida foi homogeneizado e separado a parte grosseira da líquida (Figura 2D e 2E) em seguida, foi retirado 10  $\mu$ L da mistura e colocado sobre Câmara de Neubauer coberto por lamínula deixando descansar por dois minutos até iniciar a leitura (Figura 2F e 2G). Para a contagem dos esporos foi utilizado microscópio óptico na objetiva de 40x utilizando câmara de Neubauer

(Figura 2H).

**Figura 2** - Procedimento para detecção e contagem de esporos de *Vairimorpha* spp.: (A) separação do pool de 30 abelhas, (B) Remoção dos abdômenes, (C) maceração dos abdômenes, (D) acréscimo 1 mL de água destilada por abelha, (E) remoção do macerado, (F) retirada de 10 µl do macerado para leitura, (G) câmara de Neubauer com lamínula, (H) leitura em Câmara de Neubauer com objetiva de 40x.



Fonte: Acervo Insecta, 2022

A contagem na câmara de Neubauer foi realizada em cinco áreas da câmara, conforme mostrado na figura 3, com objetivo de evitar a recontagem dos mesmos esporos. Por amostra, a contagem foi feita em triplicatas. Nos casos em que possam ser encontrados mais de 50 esporos por área quadrada, foi realizada a diluição da amostra com água destilada. O resultado obtido foi submetido à equação:  $Z = \frac{\alpha}{\beta} \times \delta \times 250.000$

Onde:

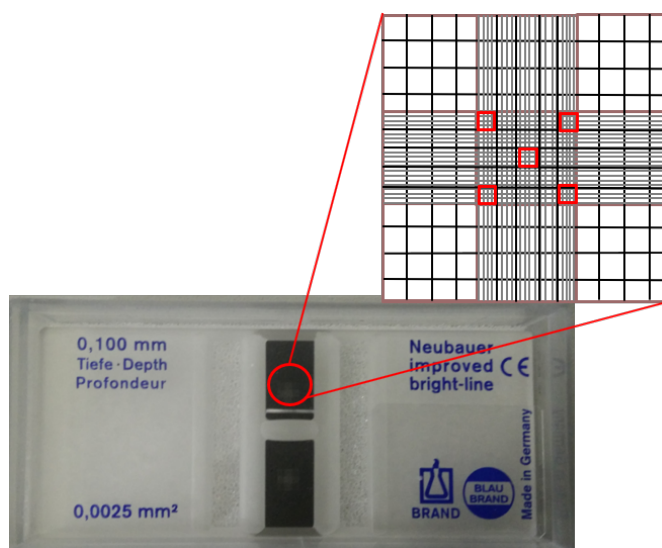
Z = Número de esporos por abelha;

$\alpha$  = Número de esporos contados;

$\beta$  = Número de quadrados contados;

$\delta$  = Fator de diluição (se houver);

**Figura 3** - Câmara de Neubauer, com áreas de contagem em vermelho.



Fonte: Acervo Insecta, 2022

Após o cálculo, o nível de infecção foi utilizada a classificação da intensidade de infecção de nosemose em abelhas proposta por Jaycox (Tabela 1) (CALDERÓN-FALLAS; MORENO-MORALES, 2022).

**Tabela 1** - Intensidade da infecção de nosemose em abelhas proposta por Jaycox.

Nível de infecção	Intensidade	Quantidade de esporos (mL)
Nulo	0	Menos de 10.000
Muito leve	1	10.000 – 1.000.000
Leve	2	1.000.001 – 5.000.000
Moderado	3	5.000.001 – 10.000.000
Semi-forte	4	10.000.001 – 20.000.000
Forte	5	Acima de 20.000.000

Fonte: Adaptado de Calderón-Fallas; Moreno-Morales, 2022.

### 2.3 Análise estatística

Em todos os conjuntos de dados possíveis foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com médias comparadas pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade, quando necessário. No entanto, devido aos níveis de normalidade e homogeneidade, testes não paramétricos como *Kruskal-Wallis* foram aplicados em determinados grupos de dados, além da correlação de

*Spearman* para o nível de infestação, precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura. Todas as análises foram realizadas no software estatístico *RStudio* (2015).

#### **2.4 Maceração das amostras, extração do DNA e PCR**

O processo de maceração para extração do DNA foi realizado utilizando 90 abdômens de abelhas por apiário, nos meses com maior índice de infestação, estes foram macerados com o auxílio de pistilo e cadinho de porcelana previamente esterilizados e nitrogênio líquido, até a formação de uma pasta uniforme. O macerado foi transferido para criotubos de 2 mL, e armazenado em ultra-freezer - 80°C até o momento da extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada utilizando o DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, California, US), sendo pesado 100 mg do macerado e, em seguida adicionado 1000µL do DNAzol e 10µL da proteinase K solution (Invitrogen, Carlsbad, California, US). A amostra foi mantida em repouso a 37°C em BOD por 18h para que ocorresse a lise celular. Após isso, foi adicionado 2,5 µL de RNase (Invitrogen, Carlsbad, California, US) para redução de contaminação por RNA, e feitas quatro lavagens prévias com clorofórmio para a precipitação do DNA. Posteriormente, o DNA foi eluído com 50 µL de água ultrapura, com repouso por 12 horas a 37 °C em BOD. Após extração, foi feita a quantificação e avaliação da qualidade do DNA via Biophotometer®30D (Eppendorf), e posterior a diluição do DNA para a concentração de 100ng/µL.

As análises de PCR foram realizadas utilizando o kit PCR Supermix Brasil (Invitrogen®), de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando primers específicos para cada microrganismo estudado (Tabela 1), sendo a reação realizada em termociclador modelo Veriti 96-Well ThermalCycler, 0.2mL, AppliedBiosystems®. O ciclo de temperatura utilizado no termociclador foi de 94°C por 2 minutos no processo de desnaturação inicial (1x), 94°C por 30 segundos na desnaturação (35x), 61°C por 30 segundos no anelamento (35x) e 72°C por 30 segundos no processo de extensão (35x).

**Tabela 2** - Lista de primers específicos utilizados para a detecção e identificação de *Vairimorpha* spp. em *Apis mellifera*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>PB</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
218MITOC-F	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218-219	<i>V. ceranae</i>	Fries <i>et al.</i> , 2013
218MITOC-R	5'-CCC GGTCATTCTCAAACAAAAAACCG-3'			
321APIS-F	5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'	321	<i>V. apis</i>	Fries <i>et al.</i> , 2013
321APIS-R	5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACACTATG-3'			

*Primer*: iniciadores; *PB*: pares de base; *Espec.*: especificidade do *primer*; *Ref.*: referência do *primer*.

Após a realização da PCR, foi feita eletroforese em gel de agarose a 2% e foi visualizado em transiluminador UV para gel (LTB HE) e fotodocumentador para gel de eletroforese – L-PIX da marca Loccus®.

## 2.5 Sequenciamento

Os resultados positivos foram sequenciados através do Sanger (*Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA*) pela empresa ACTgene Analises Moleculares Ltda. Os eletroferogramas foram lidos usando o software Chromas 2.6.6 (*Technelysium, South Brisbane, QLD, AU*). E a similaridade da sequência de DNA foi realizada usando a ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (SAYERS *et al.*, 2022).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

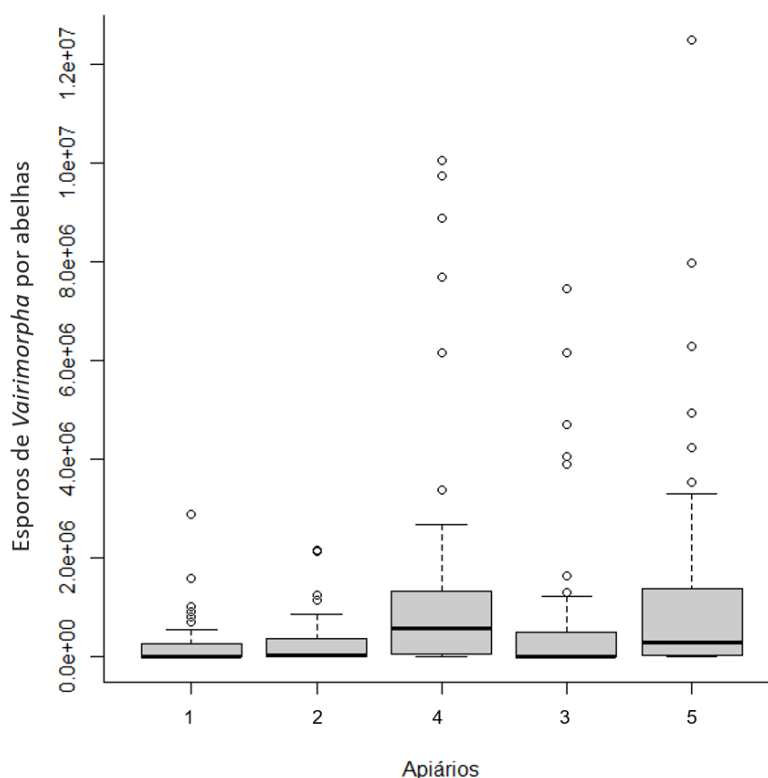
Foi constatada a presença de esporos de *V. ceranae* em todos os apiários analisados ( $n = 5$ ) (Figura 4) e em todos os meses de coleta (Figura 5), sendo observado uma variação de infecção de nulo a semiforte, segundo a intensidade de infecção determinada por Jaycox (1980). Sendo observado uma quantidade maior de esporos na primavera, se comparado com as outras estações do ano, com uma média de esporos de 63% e no verão com uma média de apenas 6%.

Apesar da quantidade de esporos não ser considerada como uma infecção forte, estes podem ser encontrados durante todo o ano e quando as condições ambientais são favoráveis, como na estação da primavera que as abelhas têm maior contato externo, pois é o período que tem mais flores para visitar, esses esporos tendem a multiplicar-se rapidamente entre as colônias. A infecção por *V.*

*ceranae* é altamente patogênica e causa diminuição na produtividade da colônia e na taxa de sobrevivência das abelhas (BOTÍAS et al., 2013).

A diferença do nível de infecção por *Vairimorpha* spp. entre os meses estudados para cada apiário, é altamente significativa (valor  $p = 8.107e-09$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, para todos os apiários estudados. Diante disso, as médias dos apiários foram comparadas par a par pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), sendo encontrada uma diferença significativa entre os apiários 4 e 1 (valor  $p = 0,0010528$ ), apiários 5 e 1 (valor  $p = 0,0095258$ ), apiários 4 e 2 (valor  $p = 0,0021470$ ) e apiários 5 e 2 (valor  $p = 0,0173637$ ). Em nenhum desses apiários foi observado sintomas da doença, redução de produtividade das colônias, diminuição da expectativa de vida das campeiras ou mesmo a morte da colônia. Contudo, é necessária atenção, uma vez que no início da infecção por *Vairimorpha* spp. os sinais podem não ser evidentes, mas podem causar colapso súbito da colônia (HIGES et al., 2008).

**Figura 4** - Mediana do nível de infecção por *Vairimorpha* spp. em *Apis mellifera* em cada apiário analisado na Bacia do Jacuípe, Bahia.



A média de infecção por mês variou de 69.333 esporos por mL (dezembro) a 4.346.667 (outubro) esporos por mL. Para três dos cinco apiários analisados, o mês de maior infecção foi outubro (Figura 5), mês de maior florada, em que as



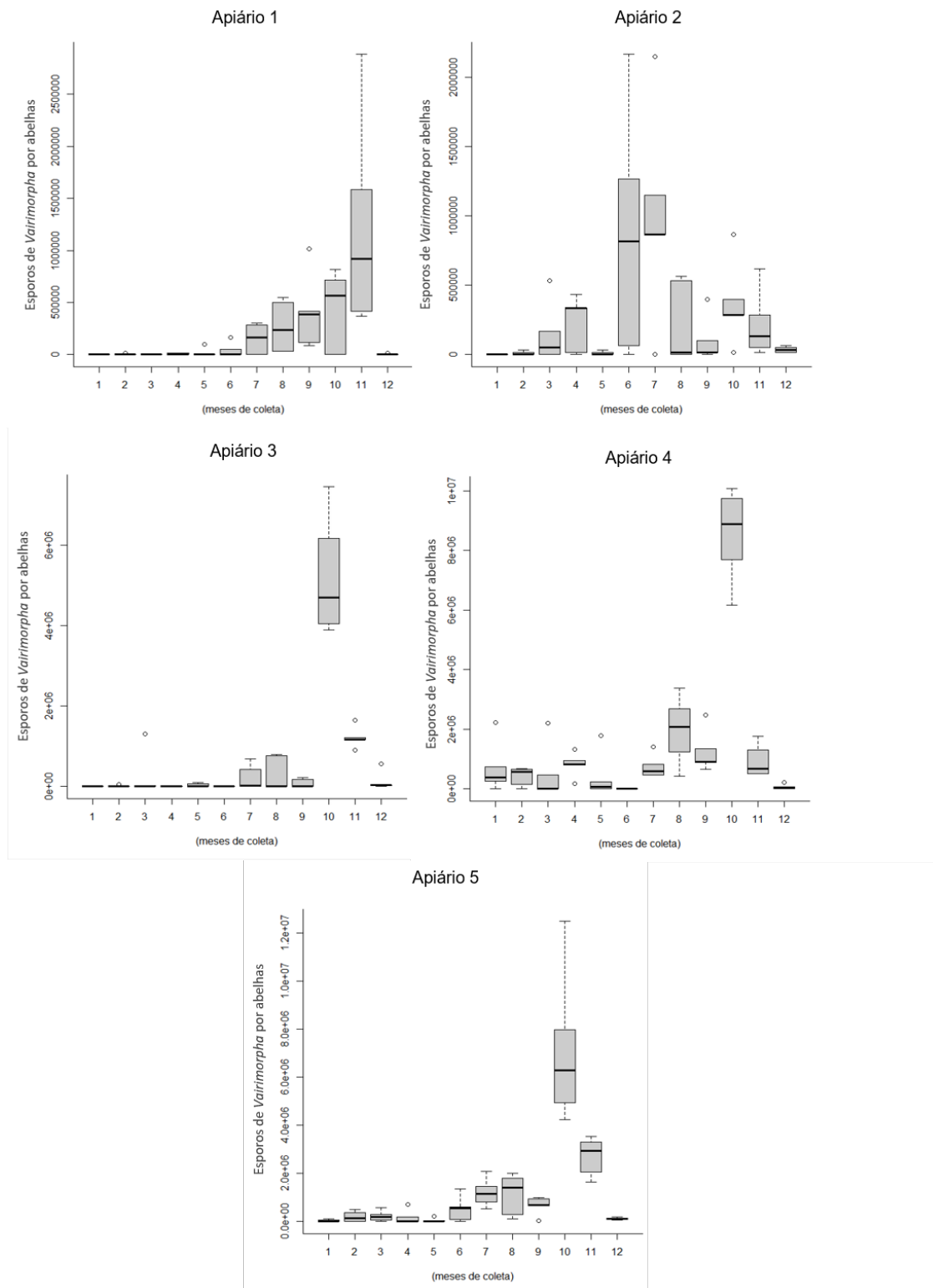
abelhas têm maior contato com outras colônias. De acordo com HIGES et al. (2008), pode ocorrer a contaminação quando se tem uma colônia saudável próximo a uma infectada.

Fatores ambientais como a precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura podem influenciar no desenvolvimento de doenças ou diminuir a resistência das abelhas (DE ALMEIDA, 2013). Com base nisso, foram avaliadas as correlações entre esses parâmetros e o nível de infecção por *Vairimorpha* spp.

A partir da correlação de Spearman dos níveis de infecção com a precipitação pluviométrica para cada apiário, foi possível observar que o nível de infecção do apiário 1 ( $r = 0,27$ ;  $P < 0,035$ ), apiário 2 ( $r = 0,35$ ;  $P < 0,012$ ), apiário 3 ( $r = 0,38$ ;  $P < 0,002$ ) e apiário 5 ( $r = 0,35$ ;  $P < 0,005$ ), correlacionou-se positivamente com a precipitação pluviométrica. Já para o apiário 4 ( $r = 0,19$ ;  $P < 0,15$ ) não houve correlação.

Ao analisar a correlação entre a temperatura e o nível de infecção é possível verificar que para todos os apiários houve uma correlação negativa significativa ( $P < 0,05$ ), com valores para o apiário 1 ( $r = -0,5$ ;  $P < 5.8e-05$ ), apiário 2 ( $r = -0,3$ ;  $P < 0,019$ ), apiário 3 ( $r = -0,26$ ;  $P < 0,048$ ) apiário 4 ( $r = -0,35$ ;  $P < 0,0057$ ) e apiário 5 ( $r = -0,48$ ;  $P < 0,00011$ ), ou seja, conforme a temperatura aumenta, o nível de infecção diminui, sendo que para quatro dos apiários estudados obteve-se uma correlação negativa altamente significativa ( $P < 0,01$ ). O nível de infecção é mais elevado em temperaturas mais baixas, pois as abelhas permanecem mais tempo dentro da colônia, sendo obrigadas a defecar no interior da colônia, resultando em fonte de inóculo (HIGES et al., 2009). Esses resultados cooperam com os resultados de Chen et al. (2012) que encontraram níveis de infecção maiores em períodos em que a temperatura foi menor. No estudo desenvolvido foram encontrados níveis de infecção maiores na estação da primavera e com temperaturas mais baixas, então ambos fatores podem ter contribuído para elevar o nível de infecção dentro da colônia.

**Figura 5** - Variação da quantidade de esporos de *Vairimorpha* spp. em *A. mellifera* para cada apiário dentro do período de um ano na região Bacia do Jacuípe, Bahia.



Quando observada a correlação entre a umidade relativa do ar (%) e os níveis de infecção dos apiários estudados, é possível concluir que o apiário 2 ( $r = 0,25$ ;  $P < 0,05$ ), apiário 3 ( $r = 0,24$ ;  $P < 0,07$ ) e apiário 4 ( $r = 0,19$ ;  $P < 0,15$ ) não apresentaram uma correlação para os índices avaliados. Já o apiário 1 ( $r = 0,4$ ;  $P < 0,0015$ ) e apiário 5 ( $r = 0,39$ ;  $P < 0,002$ ) apresentam uma correlação positiva significativa ( $P < 0,01$ ). A umidade dentro da colônia é de suma importância, pois influencia na sanidade, podendo afetar a sobrevivência e desenvolvimento da colônia (DOULL, 1976).

Todas as amostras analisadas por meio da PCR apresentaram resultados positivos para a espécie *V. ceranae*. Não houve registro de *V. apis*. Embora não existam estudos anteriores sobre a detecção dessas espécies na Região Bacia do Jacuípe – BA, existe a possibilidade de sobreposição da espécie *V. ceranae* com *V. apis*, pois essa espécie está amplamente distribuída no Brasil (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

*Vairimorpha ceranae* é a espécie presente na região Bacia do Jacuípe, Bahia. Embora os níveis de infecção variem de nulo a semiforte, é necessária atenção por parte dos apicultores, uma vez que, havendo condições favoráveis, o microsporídio poderá rapidamente se multiplicar e causar sérios danos às colônias na região.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BARBOSA, D. B.; CRUPINSKI, E. F.; SILVEIRA, R. N.; LIMBERGER, D. C. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 694-703, 2017.

BERINGER, J.; MACIEL, F. L.; TRAMONTINA, F. F. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. **Revista Eletrônica Científica**, v. 5, n. 1, p. 18-27, 2019.

BOTÍAS, C.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; BARRIOS, L.; MEANA, A.; HIGES, M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1-15, 2013.

- CALDERON-FALLAS, R. A.; MORENO-MORALES, E. Nivel de infección del microsporidio *Nosema* spp. en colmenas de abejas africanizadas y su relación con la precipitación y humedad relativa. **Agronomía Costarricense**, v. 46, n. 1, p. 65-75, 2022.
- CARLETTO, J.; BLANCHARD, P.; GAUTHIER, A.; SCHURR, F.; CHAUZAT, M. P.; RIBIÈRE, M. Improving molecular discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 113, n. 1, p. 52-55, 2013.
- CHEN, Y. W.; CHUNG, W. P.; WANG, C. H.; SOLTER, L. F.; HUANG, W. F. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. **Journal of invertebrate pathology**, v. 111, n. 3, p. 264-267, 2012.
- CHEN, Y.; EVANS, J. D.; ZHOU, L.; BONCRISTIANI, H.; KIMURA, K.; XIAO, T.; et al. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 3, p. 204-209, 2009.
- DA ROSA, J. M.; ARIOLI, C. J.; NUNES-SILVA, P.; GARCIA, F. R. Desaparecimento de abelhas polinizadoras nos sistemas naturais e agrícolas: Existe uma explicação?. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 18, n. 1, p. 154-162, 2019.
- DE ALMEIDA, C. T.; LORENZON, M. C.; DE SOUZA TASSINARI, W. Identificação de fatores associados à ocorrência de doenças de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em apiários do estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2013.
- DOULL, K. M. The effects of different humidities on the hatching of the eggs of honeybees. **Apidologie**, v. 7, n. 1, p. 61-66, 1976.
- EQUIPE DO RSTUDIO. *RStudio: Ambiente de Desenvolvimento Integrado para R*. Boston, MA, 2015. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. Acesso em: 06/07/2022.
- FRIES, I.; CHAUZAT, M. P.; CHEN, Y. P.; DOUBLET, V.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; et al. Standard methods for *Nosema* research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-28, 2013.
- GARIBALDI, L. A.; CARVALHEIRO, L. G.; VAISSIÈRE, B. E.; GEMMILL-HERREN, B.; HIPÓLITO, J.; FREITAS, B. M.; et al. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 388-391, 2016.
- HGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 375-392, 2010.
- HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; BOTÍAS, C.; BAILÓN, E. G.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; BARRIOS, L.; et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2659-2669, 2008.
- HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; GARRIDO-BAILÓN, E.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MEANA, A.; et al. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. **Environmental**

**Microbiology Reports**, v. 1, n. 2, p. 110-113, 2009.

HIGES, M.; MEANA, A.; BARTOLOMÉ, C.; BOTÍAS, C.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 17-29, 2013.

MACINNIS, C. I.; KEDDIE, B. A.; PERNAL, S. F. Honey bees with a drinking problem: potential routes of *Nosema ceranae* spore transmission. **Parasitology**, v. 149, n. 5, p. 573-580, 2022.

PARIS, L.; EL ALAOUI, H.; DELBAC, F.; DIOGON, M. Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. **Current Opinion in Insect Science**, v. 26, p. 149-154, 2018.

PERUZZOLO, M. C.; DA CRUZ, B. C.; RONQUI, L. Polinização e produtividade do café no Brasil. **Pubvet**, v. 13, n. 4, p. 1-6, 2019.

SAYERS, E. W.; BOLTON, E. E.; BRISTER, J. R.; CANESE, K.; CHAN, J.; COMEAU, D. C.; et al. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids**, v. 50, n. D1, p. D20-D26, 2022.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; DE CALDAS PINTO, M. do S. As abelhas como agentes polinizadores. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2007.

TEIXEIRA, E. W.; DOS SANTOS, L. G.; SATTTLER, A.; MESSAGE, D.; ALVES, M.L.; MARTINS, M. F.; et al. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, n. 3, p. 250-254, 2013.

TOKAREV, Y. S.; HUANG, W. F.; SOLTER, L. F.; MALYSH, J. M.; BECNEL, J. J.; VOSSBRINCK, C. R. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 169, p. 107279, 2020.

TOLEDO, V. D.; FRITZEN, A. E.; NEVES, C. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C.; SOFIA, S. H.; TERADA, Y. Plants and pollinating bees in Maringá, State of Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 705-710, 2003.

## Capítulo 2: Detecção de vírus patogênicos em *Apis mellifera* e *Varroa destructor*

### Resumo

Vírus patogênicos têm sido reportados como causa de perdas de abelhas em todo o mundo, sendo estes transmitidos de forma vertical ou horizontal, principalmente através do parasitismo pelo ácaro *Varroa destructor*. Estudos que avaliam a presença destes agentes infecciosos em abelhas e ácaros parasitos são importantes na tentativa de monitorar a ocorrência e transmissão de vírus e, conseqüentemente, evitar danos nas abelhas e o enfraquecimento de colônias, em especial, as utilizadas para apicultura. Assim, diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi detectar a presença de vírus patogênicos em *Apis mellifera* e em *Varroa destructor* na Bacia do Jacuípe, Bahia. Para isso, foram realizadas coletas de abelhas em cinco apiários, considerando os meses de maior e menor precipitação pluviométrica e os meses de maior e menor índice de infestação por *Varroa destructor*, totalizando seis meses de coleta na Região da Bacia do Jacuípe, Bahia. As amostras foram devidamente transportadas para o laboratório de pesquisa Insecta na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, onde foram realizadas análises moleculares (RT-PCR), para detectar cinco espécies de vírus (deformador de asas - DWV, realeira negra - BQCV, Israelense da paralisia aguda - IAPV, paralisia aguda - ABPV, paralisia crônica - CBPV) em *A. mellifera* e em *V. destructor*. Foram encontradas três espécies de vírus DWV, ABPV e BQCV em *A. mellifera* e em *V. destructor*, confirmando que o ácaro pode atuar como vetor desses vírus para as abelhas, sendo que em 60% das amostras de *A. mellifera* avaliadas foram observadas infecção dupla do tipo DWV-ABPV e 40% do tipo DWV-BQCV. Todas as infecções duplas observadas nas amostras de *V. destructor* foram do tipo DWV-BQCV, sendo novembro o mês de maior frequência dos vírus encontrados, mês com maior precipitação pluviométrica na região e maior nível de infecção por *Vairimorpha ceranae*, confirmando que quando se tem a interseção de outros fatores ocorrendo de maneira simultânea, a sanidade dessas abelhas fica mais comprometida. Considerando todos esses fatores, são necessários mais estudo para monitorar esses apiários e detectar a presença de outros vírus patogênicos.

**Palavras-Chave:** vírus patogênicos, saúde de abelhas, DWV.

## Chapter 2: Detection of pathogenic viruses in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*

### Abstract

Pathogenic viruses have been reported as the cause of bee losses worldwide, which are transmitted vertically or horizontally, mainly through parasitism by the mite *Varroa destructor*. Studies that evaluate the presence of these infectious agents in bees and parasitic mites are important to monitor the occurrence and transmission of viruses and, consequently, prevent damage to bees and the weakening of colonies, especially those used for beekeeping. Thus, given the above, the objective of this work to detect the presence of pathogenic viruses in *Apis mellifera* and *Varroa destructor* in the Bacia of Jacuípe Region, Bahia. To this end, bee collections were performed in five apiaries, considering the months of highest and lower rainfall and the months of highest and lower infestation rate by *Varroa destructor*, totaling six months of collection in the Bacia of Jacuípe Region, Bahia. The samples were duly transported to the Insecta research laboratory at the Federal University of Recôncavo from the Bahia, in the city of Cruz das Almas, Bahia, where molecular analyzes (RT-PCR) were performed to detect five species of virus (wing deformer - DWV, black king - BQCV, Israeli acute paralysis - IAPV, acute paralysis - ABPV, chronic paralysis - CBPV) in *A. mellifera* and *V. destructor*. Three species of DWV, ABPV and BQCV viruses were found in *A. mellifera* and *V. destructor*, confirming that the mite can act as a vector of these viruses to the bees, and in 60% of *A. mellifera* samples evaluated were observed infection DWV-ABPV double and 40% DWV-BQCV type. All double infections observed in the *V. destructor* samples were of the DWV-BQCV type, with November being the month with the highest frequency of viruses found, the month with the highest rainfall in the region and the highest level of infection by *Vairimorpha ceranae*, confirming that when there is the intersection of other factors occurring simultaneously, the sanity of these bees is more compromised. Considering all these factors, more studies are needed to monitor these apiaries and detect the presence of other pathogenic viruses.

**Keywords:** Pathogenic viruses, Health of bees, DWV.

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas apresentam importância tanto ambiental quanto econômica pois são responsáveis pelo serviço de polinização em diversas culturas vegetais, principalmente as envolvidas na alimentação humana (KHALIFA *et al.*, 2021), e também são criadas racionalmente visando a extração de produtos da colmeia o que contribui na geração de renda e estabilização das populações rurais (KHANRA; MUKHERJEE, 2018). No Brasil a abelha *Apis mellifera* é utilizada na apicultura, sendo esta atividade responsável pela maior quantidade de exportação de mel, cujo produto é considerado mais orgânico em comparação aos provenientes de outros países devido a não aplicação de antibióticos e/ou acaricidas nas colônias de abelhas para controle de patógenos e parasitos (EMBRAPA, 2022).

Patógenos e parasitos têm sido relatados como causas de perdas de colônias ocorridas na Europa e nos Estados Unidos (HRISTOV *et al.*, 2020). Entre esses organismos, destaca-se o ácaro *Varroa destructor* que além de causar danos às abelhas também é vetor de vírus patogênicos, cuja transmissão ocorre de forma horizontal (DE MIRANDA *et al.*, 2013). Atualmente, são descritos 30 vírus capazes de infectar colônias de *A. mellifera* (AMIRI *et al.*, 2020) estando cinco espécies deles envolvidos com o enfraquecimento e perdas de colônias: vírus deformador de asas (*Deformed Wing Virus* - DWV), vírus da paralisia aguda (*Acute Bee Paralysis Virus* - ABPV), vírus Israelense da paralisia aguda (*Israeli Acute Paralysis Virus* - IAPV), vírus da paralisia crônica (*Chronic Bee Paralysis Virus* - CBPV) e vírus da realeira negra (*Black Queen Cell Virus* - BQCV) (GENERSCH *et al.*, 2010; MCMENAMIN; GENERSCH, 2015).

No Brasil esses vírus foram detectados ocorrendo em todas as regiões, inclusive no estado da Bahia, onde, foram avaliados a presença de vírus em *A. mellifera* em apenas três municípios (PEIXOTO *et al.*, 2021), o que não retrata a realidade de apiários de outras localidades baianas, principalmente de apiários localizados em municípios onde a apicultura é uma atividade importante, como na Bacia do Jacuípe. O monitoramento de tais colônias se faz necessário a fim de se evitar perdas de colônias como as observadas no exterior que trazem prejuízos econômicos, bem como evitar o aumento de ácaros *V. destructor* e a disseminação desses vírus dentre e entre apiários de outras localidades. Assim, o objetivo deste trabalho foi detectar a presença dos vírus patogênicos DWV, IAPV, ABPV, BQCV e CBPV em *A. mellifera* e em *V. destructor* na Bacia do Jacuípe, Bahia.

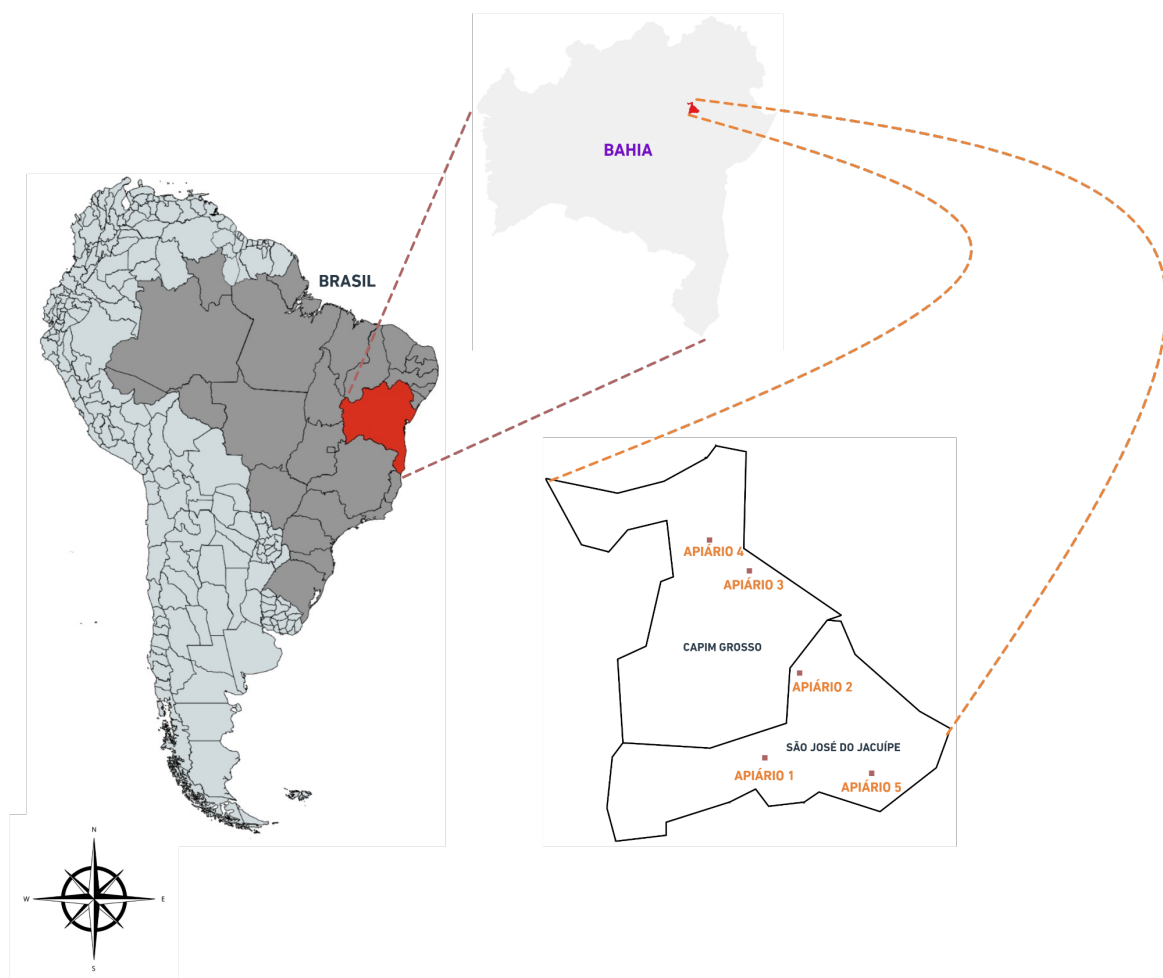


## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

As amostras de abelhas e ácaros foram provenientes de apiários situados em dois municípios pertencente a Bacia do Jacuípe: São José do Jacuípe - BA localizado pelas coordenadas 11° 25' 17" S e 39° 52' 15" O e Capim Grosso - BA localizado pelas coordenadas 11° 22' 54" S e 40° 0' 46" O. A Bacia do Jacuípe é caracterizada por apresentar clima tropical com estação seca (AW, segundo classificação de Köppen-Geiger), altitude de 387 m, precipitação pluviométrica anual média de 500 mm e temperatura média anual entre 25°C e 28°C. As coletas foram realizadas em cinco apiários com condições populacionais semelhantes. Para cada apiário foram avaliadas amostras de abelhas e ácaros nos meses de maior (janeiro, abril de 2021) e menor infestação de *V. destructor* (fevereiro de 2021) e nos meses de menor (janeiro, novembro de 2021) e maior precipitação pluviométrica (dezembro de 2021). Em cada amostra foi realizada triagem mecânica para separação de ácaros *V. destructor* das abelhas, de acordo com o protocolo do BeeBook (DIETEMANN et al., 2013). As análises foram realizadas no Núcleo de Estudos de Insetos (INSECTA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

**Figura 1** - Apiários localizados na região Bacia do Jacuípe, Bahia, onde foram realizadas as coletas de *A. mellifera* e *V. destructor*.



## 2.2 Maceração das amostras

Foram realizados dois tipos de macerações para este estudo: maceração contendo abelhas adultas e maceração contendo ácaros *V. destructor* encontrados nestas abelhas. A maceração para extração do RNA foi realizada utilizando um pool de 30 abelhas em cadinho de porcelana estéril adicionando nitrogênio líquido até a formação de uma pasta uniforme. Esse mesmo procedimento de maceração foi realizado utilizando 100 ácaros *V. destructor*. Posteriormente, o macerado foi transferido para criotubos de 2 ml, homogeneizados e armazenados em ultra-freezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do RNA.

### 2.3 Extração e purificação do RNA

A extração de RNA foi realizada com 100 mg do macerado de abelhas ou ácaros utilizando RNazol RT (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente, o RNA foi eluído em 50 µL de água ultrapura e quantificado por meio do biofotometro D30 (Eppendorf, Hamburg, DE). A purificação do RNA foi realizada usando o Kit DNA-free (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) de acordo com o protocolo do fabricante.

### 2.4 Síntese de cDNA seguida de Reação de Cadeia de Polimerase (RT-PCR)

Foram avaliadas a presença de cinco espécies de vírus (DWV, ABPV, BQCV, IAPV e CBPV) por meio de RT-PCR em cada amostra macerada de abelhas e ácaros *V. destructor*. A RT-PCR foi realizada usando o Kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) usando 4 µL do RNA extraído (correspondendo a 30 ng de RNA) em termociclador Veriti 96-Well Thermal-Cycler (Applied Biosystems, MA, US) de acordo com as configurações descritas na Tabela 1. Os primers utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 2.

A amplificação do produto da RT-PCR foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen, CA, US) (Figura 2G) usando o corante SYBR Safe Dye (Jena Bioscience, GER) e posterior visualização em transiluminador L-Pix com luz ultravioleta (Loccus, SP, BR). Cada amostra foi submetida três vezes a RT-PCR para cada espécie de vírus testada. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura e como controle positivo foram usadas amostras positivas provenientes de estudos anteriores realizados pelo Grupo de Pesquisa INSECTA e confirmado por meio de sequenciamento (PEIXOTO *et al.*, 2020).

**Tabela 1** - Temperaturas e ciclos usados para detectar vírus patogênicos em *Apis mellifera* e *Varroa destructor*.

Processos (ciclos)	Temperaturas e tempos da RT-PCR por microrganismo	
	DWV	IAPV, ABPV, CBPV, BQCV
Síntese de cDNA (1x)	49 °C 30 min	46 °C 30 min
Desnaturação inicial (1x)	94 °C 02 min	94 °C 02 min
Desnaturação (35x)	94 °C 15 seg	94 °C 15 seg
Anelamento (35x)	55 °C 30 min	58 °C 30 min
Extensão (35x)	68 °C 01 min	68 °C 01 min

Vírus: deformador de asas (DWV); Israelense da paralisia aguda (IAPV); da paralisia aguda (ABPV); da paralisia crônica (CBPV) e da realeira negra (BQCV).

**Tabela 2** - Primers usados na RT-PCR para detecção dos vírus patogênicos em *Apis mellifera* e *Varroa destructor*.

PRIMER	SEQUÊNCIA	PB	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
AIV-F IAPV-R	5'-GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA-3' 5'-GGGAGTATTGCTTTCTTGTGTG-3'	158	IAPV	Sguazza <i>et al.</i> , 2013
DWV2-F DWV2-R	5'-TAGTGCTGGTTTTTCCTTTGTC-3' 5'-CTGTGTCGTTGATAATTGAATCTC-3'	150	DWV	Highfield <i>et al.</i> , 2009
CBPV-F CBPV-R	5'-AACCTGCCTCAACACAGGCAAC-3' 5'- ACATCTCTTCTTCGGTGTGAGCC-3'	774	CBPV	Sguazza <i>et al.</i> , 2013
BQCV-F BQCV-R	5'- CTTTATCGAGGAGGAGTTCGAGT-3' 5'-GCAATAGATAAAGTGAGCCCTCC-3'	536	BQCV	Sguazza <i>et al.</i> , 2013
AIV-F ABPV-R	5'-GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA-3' 5'- ACTACAGAAGGCAATGTCCAAGA-3'	460	ABPV	Sguazza <i>et al.</i> , 2013

Primer: iniciadores; PB: pares de base; Espec.: especificidade do *primer*; Ref.: referência do *primer*. Vírus: Israelense da paralisia aguda (IAPV); Deformador de asas (DWV); da paralisia aguda (ABPV); da realeira negra (BQCV) e da paralisia crônica (CBPV).

## 2.5 Sequenciamento

Os resultados positivos para cada vírus foram confirmados por meio de sequenciamento de DNA realizados por meio da empresa ACTgene Análises Moleculares Ltda. A purificação do DNA foi realizada utilizando o reagente ExoSAP seguindo o protocolo do produto. Depois que as amostras foram sequenciadas usando o sequenciamento Sanger (*Applied Biosystems*, Waltham, MA, EUA), os cromatogramas foram lidos usando o software Chromas 2.6.6 (*Technelysium*, South Brisbane, QLD, AU) e a similaridade da sequência de DNA com cada vírus foi realizada usando a ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1997), do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (SAYERS et al., 2022).

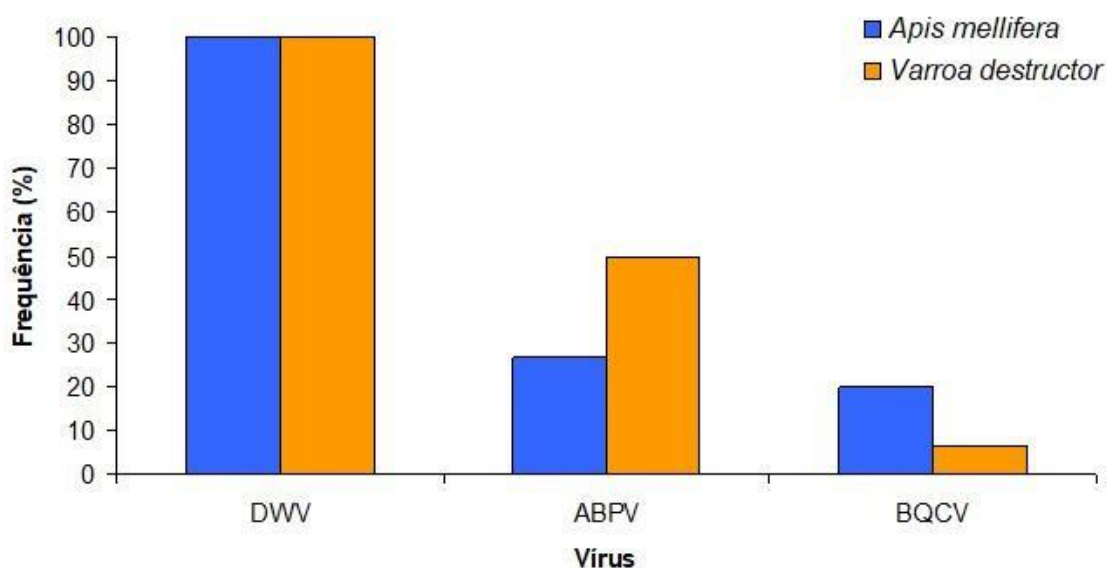
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectadas três espécies de vírus nas amostras avaliadas: DWV, ABPV e BQCV. Os vírus IAPV e CBPV não foram detectados nas amostras de abelhas e ácaros. Este é o primeiro registro dos vírus DWV, ABPV e BQCV na região da Bacia do Jacuípe na Bahia. Um estudo realizado por Peixoto et al. (2021) demonstra a presença de vírus em abelhas africanizadas em outros três municípios na Bahia. Os resultados do presente trabalho, possibilita a ampliação de detecção de vírus patogênicos em abelhas na Bahia.

Os vírus foram detectados tanto em amostras de *A. mellifera* quanto nas amostras de *V. destructor* avaliadas, com maior ocorrência para o vírus DWV, seguido do ABPV e do BQCV (Figura 2). A presença de vírus tanto em amostras de *A. mellifera* quanto nas amostras de *V. destructor* avaliadas demonstra que *V. destructor* pode atuar como vetor de vírus em *A. mellifera* nesta região. Ácaros *Varroa* podem ser dispersos dentro e entre colônias (NOËL; LE CONTE; MONDET, 2020), e isso pode ser considerado um problema pois essa dinâmica ácaro-abelha durante a fase forética do *V. destructor* pode contribuir com a disseminação de vírus para abelhas de apiários vizinhos. Por isso, o monitoramento frequente e o manejo apropriado são consideradas ações importantes para a manutenção da saúde dessas colônias. A maior ocorrência do vírus DWV nas amostras pode estar associada ao fato de que esse vírus está presente em outras espécies de insetos, além das abelhas (SHELOMI et al., 2021). Além disso, de acordo com Beaurepaire

et al. (2021) DWV é o vírus mais disseminado em *A. mellifera* no mundo, cuja dispersão está relacionada ao ácaro *V. destructor*, sendo que este parasita esteve presente em todas as colônias avaliadas neste trabalho. Não obstante, nossos resultados estão de acordo com De Miranda et al. (2013) que associa a presença dos vírus DWV, ABPV e BQCV ao ácaro *V. destructor*.

**Figura 2** - Ocorrência dos vírus DWV, ABPV e BQCV em *Apis mellifera* e *Varroa destructor* coletados em apiários localizados na Bacia do Jacuípe - Bahia.



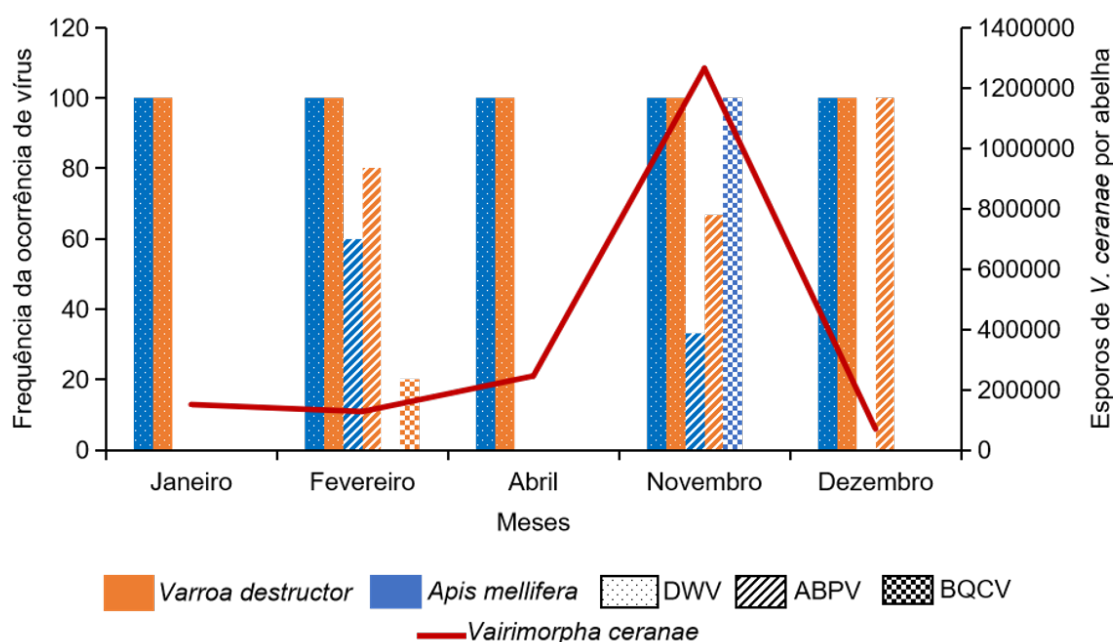
Os vírus DWV e ABPV apresentaram ocorrência em todos os cinco apiários avaliados, enquanto o vírus BQCV foi observado apenas em três apiários (Apiários 1, 2 e 3) localizados no município de São José do Jacuípe, não sendo assim detectado no município de Capim Grosso. Apesar do resultado para o vírus BQCV ser negativo em apiários localizados em Capim Grosso, existe registro do vírus BQCV em *A. mellifera* na Bahia, além de seu registro em outros estados da região nordeste (PEIXOTO et al., 2021).

A presença do vírus DWV foi observada em todos os meses avaliados (Figura 3). O vírus ABPV foi observado em novembro, dezembro e fevereiro em amostras de *V. destructor* e em novembro em amostras de *A. mellifera* (Figura 3). Já o vírus BQCV apresentou ocorrência apenas no mês de fevereiro em amostras do ácaro e no mês de dezembro em amostras de *A. mellifera* (Figura 3).

É possível observar na figura 3 que em novembro teve ocorrência do ABPV em abelhas e no mês seguinte (dezembro), esse vírus já não foi detectado, isso

pode ocorrer devido o vírus ABPV ser altamente virulento, sendo difícil sua estabilidade dentro da colônia, pois ele causa a morte rápida do hospedeiro (MARTIN, 2001).

**Figura 3** - Ocorrência dos vírus DWV, ABPV e BQCV em *Apis mellifera* e *Varroa destructor* e sua relação com *V. ceranae* durante os meses de coleta em apiários localizados na Bacia do Jacuípe - Bahia.

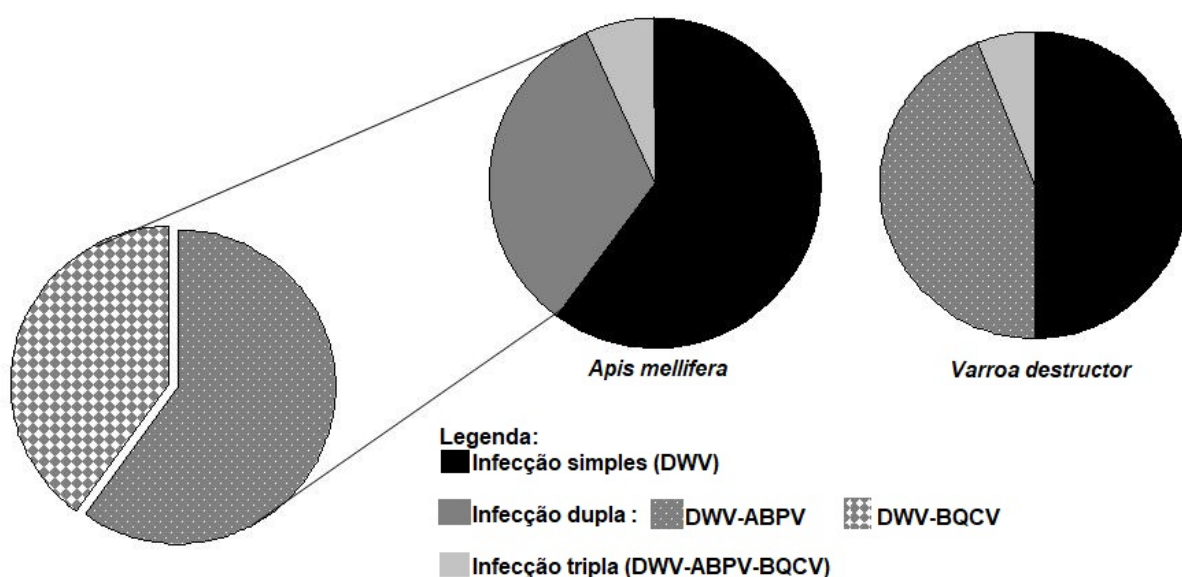


Os resultados obtidos também podem ser comparados com o nível de infecção por *V. ceranae* (Figura 3), pois para as mesmas amostras de abelhas analisadas o mês de novembro foi o mês que apresentou uma maior infecção, sendo este o mês com maior frequência de vírus em abelhas, pois foi encontrado o DWV, ABPV e BQCV, todos ocorrendo de maneira simultânea juntamente com o fungo *V. ceranae* e com o ácaro *V. destructor*. Segundo Gajda et al. (2021), *V. ceranae* quando está presente juntamente com BQCV torna-se muito mais perigoso para as abelhas.

Apenas o vírus DWV ocorreu de forma isolada, cuja ocorrência foi de 60% nas amostras de *A. mellifera* e de 50% nas amostras de *V. destructor* (Figura 4). A ocorrência dos demais vírus foi como infecção dupla e tripla. Em 33,3% e em 6,7% das amostras de *A. mellifera* avaliadas foram observadas infecção dupla e tripla, respectivamente (Figura 4). Já nas amostras de *V. destructor* avaliadas, em 43,75% foi detectado infecção dupla, enquanto que apenas 6,25% foi detectado infecção tripla (Figura 4). Nas amostras de *A. mellifera* avaliadas foram observados os

seguintes tipos de infecção dupla: DWV-ABPV representando 60% das amostras positivas para dois vírus e DWV-BQCV representando 40% das amostras positivas para dois vírus (Figura 4). Todas as infecções duplas observadas nas amostras de *V. destructor* foram do tipo DWV-BQCV (Figura 4).

**Figura 4** - Ocorrência e caracterização das infecções simples, dupla e tripla nas amostras de *Apis mellifera* e *Varroa destructor* coletados em apiários localizados na Bacia do Jacuípe - Bahia.



#### 4. CONCLUSÕES

Os vírus DWV, ABPV e BQCV estão presentes em *A. mellifera* e *V. destructor* na Região da Bacia do Jacuípe - Bahia. O ácaro *V. destructor* pode atuar como vetor de vírus em *A. mellifera* nesta região, contribuindo com a presença desses patógenos nos apiários. Devido a presença de vírus nas colmeias e a relevância da apicultura nessa região, o monitoramento frequente e manejo apropriado nas colônias de *A. mellifera* são ações importantes que devem ser adotadas pelos apicultores, a fim de se evitar o enfraquecimento e a perda de colônias.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

AMIRI, E.; STRAND, M. K.; TARPY, D. R.; RUEPPELL, O. Honey bee queens and virus infections. **Viruses**, v. 12, n. 3, p. 322, 2020.

BEAUREPAIRE, A.; PIOT, N.; DOUBLET, V.; ANTUNEZ, K.; CAMPBELL, E.; CHANTAWANNAKUL, P.; et al. Diversity and global distribution of viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. **Insects**, v. 11, n. 4, p. 239, 2020.

DE MIRANDA, J.; BAILEY, L.; BALL, B. V.; BLANCHARD, P.; BUDGE, G. E.; CHEJANOVSKY, N.; et al. The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-51, 2013.

DIETEMANN, V.; NAZZI, F.; MARTIN, S. J.; ANDERSON, D. L.; LOCKE, B.; DELAPLANE, K. S.; et al. Standard methods for varroa research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-54, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. Mel Brasileiro conquista o mercado externo. Inovação em pauta, n. 10, p. 1-6, 2022. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31892/1/REVFINEPAPICULTURAPI.pdf> Acessado em: 06/07/2022.

GAJDA, A. M.; MAZUR, E. D.; BOBER, A. M.; CZOPOWICZ, M. *Nosema Ceranae* Interactions with *Nosema apis* and Black Queen Cell Virus. **Agriculture**, v. 11, n. 10, p. 963, 2021.

GENERSCH, E.; VON DER OHE, W.; KAATZ, H.; SCHROEDER, A.; OTTEN, C.; BÜCHLER, R.; et al. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 332-352, 2010.

HIGHFIELD, A. C.; EL NAGAR, A.; MACKINDER, L. C.; NOËL, L. M-L.; HALL, M. J.; MARTIN, S. J.; et al. Deformed wing virus implicated in overwintering honey bee colony losses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7212–7220, 2009.

HRISTOV, P.; SHUMKOVA, R.; PALOVA, N.; NEOV, B. Factors associated with honey bee colony losses: A mini-review. **Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, p. 166, 2020.

KHALIFA, S. A.; ELSHAFIEY, E. H.; SHETAIA, A. A.; EL-WAHED, A. A.; ALGETHAMI, A. F.; MUSHARRAF, S. G.; et al. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 688, 2021.

KHANRA, P.; MUKHERJEE, D. N. Potentiality of Beekeeping in Doubling Farmers' Income in Jharkhand: A Way to Sweet Revolution. **International Journal of**

**Agriculture Sciences**, v. 10, n. 16, p. 0975-3710, 2018.

MARTIN, S. J. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. **Journal of Applied Ecology**, v. 38, n. 5, p. 1082-1093, 2001.

MCMENAMIN, A. J.; GENERSCH, E. Honey bee colony losses and associated viruses. **Current Opinion in Insect Science**, v. 8, p. 121-129, 2015.

NOËL, A.; LE CONTE, Y.; MONDET, F. *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it?. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 1, p. 45-57, 2020.

PEIXOTO, C. M.; FRANÇA, S. O.; MERCÊS, C. C.; CORREIA-OLIVEIRA, M. E.; CARVALHO, C. A. Occurrence of pathogenic viruses in Africanized honey bees in Brazil. **Journal of Apicultural Research**, p. 1-8, 2021.

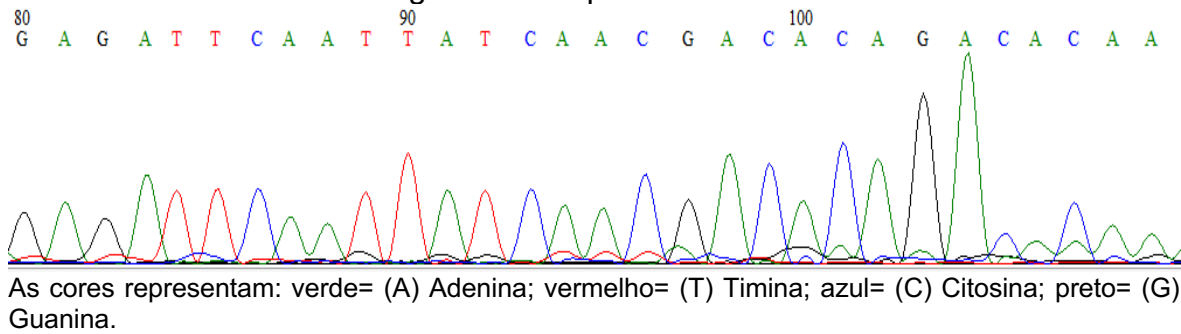
SAYERS, E. W.; BOLTON, E. E.; BRISTER, J. R.; CANESE, K.; CHAN, J.; COMEAU, D. C.; et al. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids**, v. 50, n. D1, p. D20-D26, 2022.

SGUAZZA, G. H.; REYNALDI, F. J.; GALOSI, C. M.; PECORARO, M. R. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 194, n. 1-2, p. 102-106, 2013.

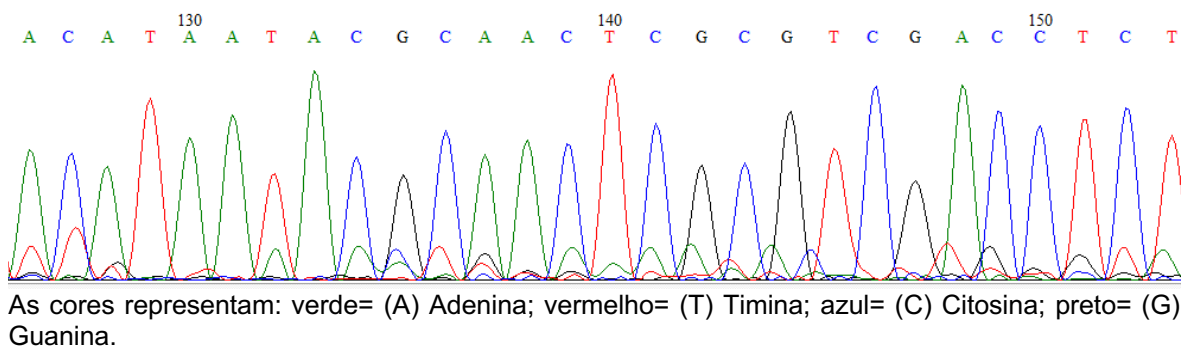
SHELOMI, M.; LIN, W.; JOHNSON, B. R.; FURLONG, M. J.; ETEBARI, K. Detection of deformed wing virus (DWV) in the Vietnamese walking stick *Medauroidea extrudentata* (Phasmatodea). **Virus Research**, v. 293, p. 198263, 2021.

## ANEXOS

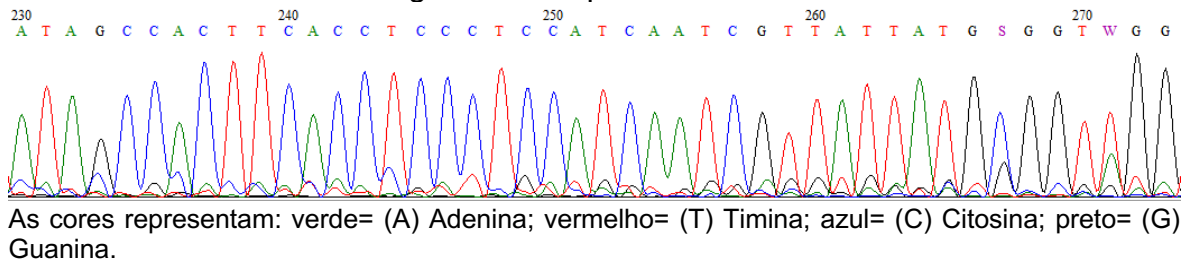
Anexo 1. Parte do eletroferograma da espécie de vírus DWV.



Anexo 2. Parte do eletroferograma da espécie de vírus ABPV.



Anexo 3. Parte do eletroferograma da espécie de vírus BQCV.



Anexo 4. Parte do eletroferograma da espécie de fungo *Vairimorpha ceranae*.

