

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

**CONSERVAÇÃO DE ABELHAS: DIVERSIDADE E VÍRUS**

**FLAVIANE SANTOS DE SOUZA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
JULHO - 2019**

# CONSERVAÇÃO DE ABELHAS: DIVERSIDADE E VÍRUS

**FLAVIANE SANTOS DE SOUZA**

Bióloga

Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009

Tese 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 Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**Coorientador:** Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

**Coorientador:** Prof. Dr. Stephen John Martin

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**JULHO - 2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S729c Souza, Flaviane Santos de.  
Conservação de abelhas: diversidade e vírus /  
Flaviane Santos de Souza. \_ Cruz das Almas, BA, 2019.  
67f.; il.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho  
Costa.  
Coorientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do  
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,  
Ambientais e Biológicas.

1.Abelha sem ferrão. 2.Abelha africanizada.  
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de  
Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Martin,  
Stephen Jhon. III.Título.

CDD: 638.1

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).  
Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

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

**CONSERVAÇÃO DE ABELHAS: DIVERSIDADE E VÍRUS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE  
FLAVIANE SANTOS DE SOUZA**

Realizada em 15 de julho de 2019

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Examinador Interno (Orientadora)

Prof. Dr. Carlos Augusto Dorea Bragança  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
Examinador Interno

Prof. Dra. Kátia Peres Gramacho  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFRSA  
Examinador Externo

Dra. Lorena Andrade Nunes  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB  
Examinador Externo

Dra. Marilene Fancelli  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Examinador Externo

*“God does not play dice.”*

*- Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de dizer muito obrigada a todas as pessoas que ajudaram e deram suporte a este projeto.

À professora Maria Angélica, pela longa parceria, amizade, orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Carlos Alfredo L. de Carvalho, pela amizade, orientação e oportunidades que fizeram dessa caminhada única entre dois países.

I would like to thank Professor Stephen Martin for the opportunity and masses help, encouragement and friendship during the development of my research at University of Salford. I also had a great time out of the lab, thanks for including me in your trips (Sheffield, Lake District, Peak District, Amazon Florest!), I have great memories.

I would like to express my gratitude to Jessica Kevill for all the masses of help, support and guidance at the lab and outside this. Also thankfull Laura Brettell for all tips and advises.

I am grateful to everyone else at Salford University, particularly Marian L. Denson, thanks for all your support.

À Dra. Lorena Nunes, por me apresentar a morfometria geométrica, pela amizade e colaboração.

Eu tive momentos maravilhosos e também de muitos perrengues durante o doutorado-sanduíche na Universidade de Salford. Fiz grandes amigos entre horários de laboratório, almoços, chás, muitos cafés e corridas entre trens e ônibus. Em sua maioria, brasileiros que tiveram a oportunidade, assim como eu, de um financiamento público para desenvolver suas pesquisas, e nos vimos na mesma situação de descobrir 'o outro lado do oceano'. Entre elas, Michéle Santos, Barbara Lins e Daniela Bitencourt, my lovelies. Com Ana Luzia, criamos nosso Reino! Agradeço à Camila Sant'anna, pelo suporte e amizade; e ao Little Brazil, especialmente Luisa Dutra, Ivana Schork, Isabela Forti, Marina Bonde, Profs. Jean Boubli e Rob Young, por todo carinho, dotes culinários e ternura.

À UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia), pela infraestrutura e apoio administrativo. Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, ao Colegiado e secretaria, pelo suporte administrativo, atenção e dedicação.

Ao NUGTESP (eterno NUATE), pelo apoio, amizade e suporte à pesquisa.

Ao INSECTA pelo suporte laboratorial e novas perspectivas de pesquisa.

A Maria Emilene Correa, Márcia de Fátima Ribeiro, Candida B. da Silva Lima, Victor Hugo Pedraça Dias e demais apicultores e meliponicultores, que nos forneceram abelhas, informações e contatos. À Bárbara Lins Caldas de Moraes, pelo suporte na construção dos mapas.

Ao IBAMA, pela permissão para visitar a ilha e coletar as informações, aos funcionários do ICMBio e ao DAI/DEFN, pela liberação da documentação necessária, auxílio e permissão de visita aos parques da ilha. Ao Diretor de Articulação e Infraestrutura do Distrito Estadual de Fernando de Noronha (ADEFN), pela permissão para visita científica à ilha. Ao Projeto Tamar pela disponibilidade e oportunidade de divulgar o nosso trabalho. Licença SISBIO: 46906-1, 50467 e 55056.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (Código Financeiro 001); ao CNPq (Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (Processos 400425/2014-9 e 208427/2017-1) pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa doutorado sanduíche no exterior desenvolvido na Universidade de Salford (Inglaterra); e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (Chamada 01/2011, Macroprograma 2, Código: 02.11.01.029.00.00) pelo suporte de parte das coletas das amostras de *Melipona subnitida*.

Finalmente, eu gostaria de expressar minha gratidão à minha família. O incentivo incondicional antes e durante o doutorado, como sempre, foi incrível e eu tenho muita sorte por ter vocês.

# SUMÁRIO

Página

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**REFERENCIAL TEÓRICO**.....1

**ARTIGO 1**

POPULATION VARIATION AND ISLAND EFFECT IN *Melipona subnitida*  
(HYMENOPTERA: APIDAE) .....32

**ARTIGO 2**

OCCURRENCE OF DEFORMED WING VIRUS VARIANTS IN THE STINGLESS  
BEE *Melipona subnitida* AND HONEY BEE *Apis mellifera* POPULATIONS IN  
BRAZIL.....50

**CONSIDERAÇÕES FINAIS** .....66



## CONSERVAÇÃO DE ABELHAS: DIVERSIDADE E VÍRUS

Autora: Flaviane Santos de Souza

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**Resumo:** As abelhas possuem importância global como polinizadoras e pelos seus produtos consumidos pelo homem. Apini e Meliponini formam dois grupos altamente eusociais. Dentro do primeiro, está *Apis mellifera*, a mais domesticada e com distribuição global. No segundo grupo, está a abelha sem ferrão *Melipona subnitida*, endêmica da região Nordeste do Brasil. Neste estudo foi avaliada a diversidade morfológica de 122 populações de *M. subnitida* coletadas em 12 localidades nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte por meio da variação morfométrica intra-específica da forma e tamanho da cabeça de operárias (Artigo 1). Houve diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as populações continentais e insulares. Os dois primeiros componentes principais explicaram 69,72% da variação total e o método de agrupamento hierárquico (UPGMA) revelou que os indivíduos coletados na Ilha de Fernando de Noronha diferem das demais locais com 100% de *bootstrap*. Também foi avaliada a presença do vírus deformador da asa (DWV) em *M. subnitida* e *A. mellifera*, uma vez que estas espécies frequentemente são manejadas em estreita proximidade (Artigo 2). Investigou-se as prevalências e cargas virais das três variantes mestras (tipo A, B e C) do DWV em 21 colônias de *M. subnitida* e 26 colônias de *A. mellifera*. O DWV foi detectado em todas as colônias. Em *M. subnitida* foi encontrada as variantes A e C, enquanto em *A. mellifera* foi encontrado as variantes A, B e C, dominando o tipo A. Nas colônias de *M. subnitida* introduzidas em Fernando de Noronha, mesmo a carga de DWV considerada baixa ( $< 1E + 03$ ), comparado a abelhas europeias sintomáticas, pode-se inferir que uma transmissão viral mínima entre a abelha sem ferrão e *A. mellifera*. Além disso, a presença onipresente da variante DWV-C em colônias de *M. subnitida*, e sua raridade em *A. mellifera*, pode sugerir que exista uma troca viral limitada entre essas duas espécies.

**Palavras-chave:** Abelha-sem-ferrão, abelha africanizada, adaptação insular, diversidade populacional, variantes mestras do DWV.

## BEES CONSERVATION: DIVERSITY AND VIRUS

Author: Flaviane Santos de Souza

Adviser: Dr.<sup>a</sup> Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

**Abstract:** Bees have global importance as pollinators and for their products consumed by man. Apini and Meliponini bees form two highly eusocial groups. Inside the first is *Apis mellifera*, the most commonly domesticated and globally distributed. In the second group, is the stingless bee *Melipona subnitida*, endemic to the Northeast region of Brazil. In this study we evaluated the morphological diversity of 122 populations of *M. subnitida* collected from 12 locations in the states of Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco and Rio Grande do Norte by intraspecific morphometric variation of head shape and size of the workers' heads (Article 1). There were significant differences ( $p < 0.01$ ) between continental and island populations. The first two main components explained 69.72% of the total variation and the hierarchical clustering method (UPGMA) revealed that the individuals collected on Fernando de Noronha Island differ from the other sites with 100% bootstrap. It was also evaluated the presence of Deformed Wing Virus (DWV) in *M. subnitida* and *A. mellifera*, as these species are often managed in close proximity (Article 2). The prevalence and viral load of the three DWV master variants (type A, B and C) in 21 colonies of *M. subnitida* and 26 colonies of *A. mellifera* were investigated. DWV was detected in all colonies. In *M. subnitida* were found variants A and C, while in *A. mellifera* were found variants A, B and C, dominating type A. In the colonies introduced in Fernando de Noronha, even the DWV load considered low ( $< 1E + 03$ ) compared to symptomatic European bees, it can be inferred that a minimal viral transmission between stingless bees and *A. mellifera* occurred on this island. In addition, the ubiquitous presence of the DWV-C variant in colonies of *M. subnitida*, and its rarity in *A. mellifera*, may suggest that there is a limited viral exchange between these two species.

**Keywords:** Stingless bees, africanized bee, geometric morphometrics, insular adaptation, population diversity, master variant of DWV.

## REFERENCIAL TEÓRICO

Há mais de 7.000 anos as abelhas são manejadas por humanos (BLOCH et al., 2010) e são também um dos grupos de insetos sociais mais estudados (DANFORTH et al., 2006). Pertencentes à ordem Hymenoptera, junto com formigas e vespas, a popularidade das abelhas é devido a sua grande importância para o homem tanto por causa do uso dos produtos apícolas (mel, cera, própolis, entre outros) como pelos serviços de polinização que fornecem. Esta polinização proporciona inúmeros benefícios, como a manutenção de populações de plantas silvestres, manutenção da biodiversidade, obtenção de sementes e frutos diversificados, além de apoiar valores culturais (POTTS et al., 2016).

As abelhas mais estudadas pertencem ao gênero *Apis*, com 11 espécies descritas (LO et al., 2010), entre as quais *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) é a mais domesticada, com distribuição global e poliniza 77% das plantas envolvidas na produção de recursos alimentares que sustentam a população humana (BUCHMANN e NABHAN, 1996).

Outro grupo bastante representativo é formado pelas abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini), nativas do Novo Mundo, com distribuição pantropical e notáveis polinizadores em regiões tropicais e subtropicais, com 33 gêneros e aproximadamente 400 espécies descritas (MOURE, URBAN e MELO, 2007; CAMARGO e PEDRO, 2013) dentre os quais, *Melipona subnitida* é uma das principais espécies do nordeste brasileiro.

Estas abelhas (Apini e Meliponini) formam dois grupos altamente eusociais, com formação de colônias, sobreposição de gerações, divisão de trabalho reprodutivo em um sistema de castas, cuidado cooperativo da prole. No entanto, as fêmeas Meliponini apresentam o ferrão e as estruturas associadas a ele extremamente reduzidas, o que as tornam incapazes de ferocar (KERR e LELLO, 1962) e, por isso são conhecidas como “abelhas-sem-ferrão”.

Assim, a presente tese, dividida em dois capítulos, visa explorar a diversidade biológica da abelha sem ferrão *Melipona subnitida* e também avaliar a prevalência do Vírus Deformador da Asa (Deformed Wing Virus [DWV]) através destas populações de *M. subnitida* e da abelha africanizada *Apis mellifera*.

## 1. *Melipona subnitida* Ducke, 1910

Popularmente conhecida como jandaíra (Figura 1), *M. subnitida* é uma espécie nativa e endêmica do semiárido brasileiro (CÂMARA et al., 2004) adaptada ao estresse climático e encontrada ao longo de todos os Estados nordestinos: Bahia, Alagoas, Paraíba, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (CAMARGO e PEDRO, 2007), com exceção do estado de Sergipe (CORREIA-OLIVEIRA et al., 2017).



**Figura 1.** Abelha operária de *Melipona subnitida* Ducke, 1910. Fonte: Acervo Insecta/UFRB, 2017.

A Caatinga é um bioma rico em recursos naturais e exclusivo do Brasil, ocupa mais de 750.000 km<sup>2</sup> (OLIVEIRA et al., 2012) e contém grande número de espécies adaptadas as temperaturas anuais elevadas, longos períodos de seca (PRADO, 2003; SILVA et al., 2013) e índices de chuvas extremamente irregulares ao longo dos anos (KROL et al., 2001; LEAL, TABARELLI e SILVA, 2003; CHIANG e KOUTAVAS, 2004), a exemplo da *M. subnitida*. Entretanto, é um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta, com perda de 61,98% do seu território no semiárido (FRANCISCO et al., 2013), principalmente devido ao desmatamento e exploração madeireira, levando à destruição dos locais de nidificação de abelhas. Tipicamente, a jandaíra constrói seus ninhos em cavidades de árvores nativas, sendo as espécies de plantas mais frequentes para sua nidificação a Imburana (*Commiphora leptophloeos*) e a Catingueira (*Caesalpinia bracteosa*) (CÂMARA et al., 2004; MENEZES, 2006).

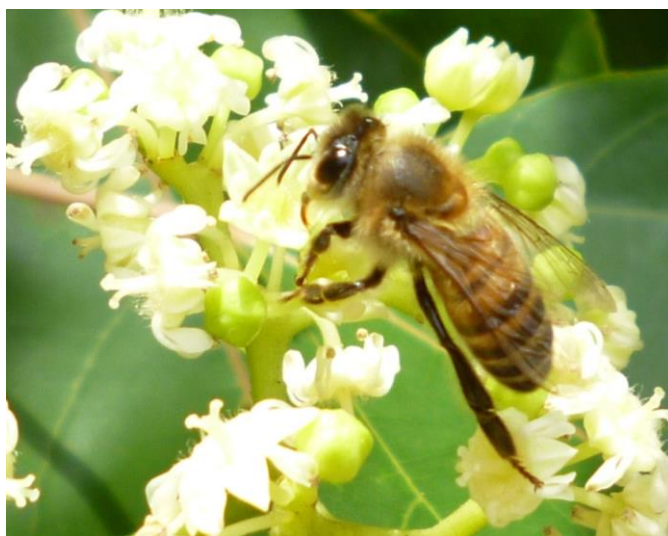
O manejo das abelhas sem ferrão, conhecido como meliponicultura (SILVEIRA, MELO e ALMEIDA, 2002), foi iniciada pelos índios e é hoje também desenvolvida desde pequenos e médios produtores que utilizam seus produtos (mel, cera, pólen entre outros) para o consumo e comércio (KERR, CARVALHO e NASCIMENTO, 1996; SANTOS, 2010). O mel de *M. subnitida* é considerado de excelente qualidade organoléptica, o que o torna bastante procurado na região do semi-árido brasileiro (BRUENING, 2001). E pode ser desenvolvida de forma integrada a plantios florestais, fruteiras e culturas de ciclo curto, que através de seus serviços de polinização podem contribuir com a produção agrícola e regeneração da vegetação natural (VENTURIERI, RAIOL e PEREIRA, 2003).

A atividade da meliponicultura está em expansão e *M. subnitida* (jandaíra), *M. scutellaris* (uruçu), *M. quadrifasciata* (mandaçaia), *M. fasciculata* e *Tetragonisca angustula* (jataí), *M. rufiventris* (tujuba), e *M. flavolineata* (uruçu amarela) são algumas das espécies comumente utilizadas na meliponicultura tradicional (JAFFÉ et al., 2015).

## **2. *Apis mellifera* Linnaeus, 1758**

Antes de serem disseminadas ao redor do mundo por humanos, as populações de *Apis mellifera* eram naturalmente distribuídas na Europa, África e Ásia Ocidental (FRANCK et al. 1998). Com base em caracteres morfométricos, 26 subespécies foram identificadas e agrupadas em quatro grandes ramos evolutivos (RUTTNER et al., 1978; RUTTNER, 1988), amplamente apoiado por estudos mitocondriais, que depois revelaram uma quinta linhagem adicional (MIGUEL et al 2011).

A *A. mellifera* do Brasil reflete o cruzamento entre as subespécies europeias (*A. mellifera mellifera* e *A. mellifera ligustica*) importadas pelos imigrantes europeus durante o século 17 e a subespécie africana *A. mellifera scutellata*, importada no ano de 1956 pelo geneticista Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr, com o objetivo de aumentar a produtividade de mel (DE JONG, 1996; VANDAME et al., 2002). Este cruzamento originou abelhas polihíbridas denominadas 'abelhas africanizadas' (Figura 2), por possuírem características predominantes da subespécie africana (GONÇALVES, 1974).



**Figura 2.** Abelha africanizada adulta, *Apis mellifera*. Fonte: Acervo Insecta/UFRB, 2019.

As abelhas africanizadas trouxeram algumas vantagens, quando comparadas às europeias, como adaptabilidade a ambientes tropicais/subtropicais, multiplicação de colônia mais rápida, aliado ao ciclo de desenvolvimento mais curto que as demais subespécies existentes no Brasil, resistência a doenças, ampla polinização e maior produção de mel e própolis. Contudo, as diferenças no comportamento defensivo e relacionado com o hábito de nidificação causaram grande preocupação em relação a acidentes, tanto com pessoas quanto com animais, e forçaram os apicultores a modificarem suas técnicas e equipamentos ou abandonarem a apicultura na época da africanização (DE JONG, 1996; OLIVEIRA e CUNHA, 2005). Porém, após um período de adequação/reformulação das técnicas de manejo com a abelha africanizada, nos anos 80 o Brasil subiu da 27<sup>o</sup> colocação para a 7<sup>o</sup> na produção mundial de mel (SOARES, 2012) ocupando lugar de destaque no ranking dos países exportadores, segundo a Associação Brasileira dos Exportadores de Mel (ABEMEL, 2016).

Quanto aos principais desafios encontrados na criação de abelhas estão o uso descontrolado de pesticidas (doses letais e sub-letais), alterações climáticas, desmatamentos, queimadas, déficit nutricional, parasitas – como o ácaro *Varroa destructor* (ANDERSON e TRUEMAN, 2000), e patógenos – como vírus, bactérias

e fungos (SUMPTER e MARTIN, 2004; GOBLIRSCH, 2018) que causam perdas de colônias e o declínio desses polinizadores.

### 3. Morfometria aplicada em estudos populacionais

O estudo da morfologia em diferentes organismos é uma das formas mais acessíveis para se obter grandes quantidades de informações sobre biodiversidade (FRANCOY e IMPERATRIZ-FONSECA, 2010; PORTO, VILHELMOSEN e ALMEIDA, 2016) quando comparado a outras técnicas, por exemplo a biologia molecular. Assim, a análise morfométrica é um método de fenotipagem quantitativo para tamanho e forma (DE SOUZA et al., 2015). Segundo Bookstein (1998), a análise descritiva da variação destes caracteres é uma ferramenta fundamental para estudos de biologia de organismos e melhorou consideravelmente nos últimos anos.

Historicamente, os estudos morfométricos utilizavam medidas corporais com análise univariada (um caráter por vez) para a classificação taxonômica e estudos de diversidade dos organismos, o que tornava difícil a discriminação entre os grupos (FRANCOY, 2007). No início do século XX, houve uma transição do campo descritivo para o campo quantitativo (BOOKSTEIN, 1998), sendo que na década de 60, começou a ser utilizada a morfometria multivariada (fundamentada em Análise de Componentes Principais e Análises Discriminantes) dando maior robustez aos dados.

A exemplo dos trabalhos com morfometria tradicional, Ruttner (1983) distinguiu rainhas de operárias através do tamanho da cabeça, mandíbula e basitarsus. A desvantagem desta técnica é que não considera a forma da estrutura na análise. Em 2015, através da morfometria geométrica, De Souza et al. (2015) analisaram diferenças entre castas de *A. mellifera*, utilizando dentre várias medidas, a estrutura da cabeça e demonstraram a superioridade desta técnica em relação à morfometria tradicional, quanto à identificação e classificação de castas de abelhas e intermediários.

A morfometria geométrica se baseia em coordenadas cartesianas de pontos anatômicos (*landmarks*) geradas em coordenadas x e y, tamanho do centroide e as deformações parciais e relativas que compõem a matriz de dados

utilizada nas análises multivariadas (ROHLF e MARCUS, 1993). Os marcos anatômicos são sobrepostos, removidos os efeitos de translação, escala e rotação, e assim as configurações de referência irão diferir apenas na forma, para serem analisadas por métodos estatísticos multivariados (TOFILSKI, 2008).

O rápido progresso dessa técnica resultou em grande parte de uma teoria matemática coerente que leva em consideração a curvatura na análise entre as coordenadas (landmarks) para forma, a qual desempenha importante papel em muitos estudos biológicos, e podem sinalizar os diferentes papéis funcionais desempenhados em respostas a pressões seletivas, processo de crescimento e morfogênese. Já a análise do tamanho, calculado matematicamente independente da forma, considera a escala geométrica para determinar a localização do centro da forma (centroide) e calcular a distância entre cada ponto de referência e seu centroide (ZELDITCH et al., 2004).

Esta técnica tem apresentado grande quantidade de resultados na identificação e estimativa de diversidade em diversas espécies de abelhas principalmente utilizando medidas de asa: *Apis mellifera* (BAROUR e BAYLAC, 2016), gênero *Melipona* (FRANCOY e IMPERATRIZ-FONSECA, 2010; PRADO-SILVA et al., 2016), dentro destas está *M. subnitida* (BONATTI et al., 2014; LIMA et al., 2014).

#### **4. A Perda de colônias**

Durante os últimos 30 anos, apicultores em muitas partes do mundo vem experimentando perdas de colônias, por exemplo na Europa Central, onde foram reportadas perdas de 25% por ano entre 1985 e 2005 (POTTS et al., 2010) e nos Estados Unidos (EUA), com perdas anuais em aproximadamente 38% entre 2010 e 2016 (VANENGELSDORP et al., 2008; BEEINFORMED PARTNERSHIP, 2017).

A maioria das mortes de colônias em zona temperada (por exemplo, Europa, EUA e Nova Zelândia) ocorreu durante o inverno, quando as abelhas se agrupam dentro das colônias para regulação da temperatura. Historicamente os dados de perda de colônia reportados para o Reino Unido, as perdas anuais permaneciam constantes entre 5% e 10% durante o inverno, entretanto atingiu seu pico em meados do ano de 2000, quando a associação de apicultores



reportou a perda de 33,8% (British Beekeeping Association (BBKA, 2017)). Para os EUA as perdas anuais reportadas foram maiores, de 14% no verão e 43,7% no inverno nos anos 2014/2015 (BEEINFORMED PARTNERSHIP, 2017). Desde então, a tendência tem sido gradativamente uma diminuição dessas perdas de colônias, sendo no inverno de 2016/17 o Reino Unido registrou 13,2% (BBKA, 2017) e os EUA, 21,1% (BEEINFORMED PARTNERSHIP, 2017).

Este fenômeno ficou conhecido mundialmente como 'Distúrbio do Colapso das Colônias' (Colony Collapse Disorder [CCD]), se referindo à expressiva perda de operárias (VANENGELSDORP et al., 2009). E muitos fatores foram relacionados tal como pesticidas, perda de habitat, urbanização, parasitas e patógenos (BROWN e PAXTON, 2009; GENERSCH, 2010; HENRY et al., 2012). Atualmente, estudos apontam a propagação do vírus Deformador da Asa (DWV) como principal causa e sua associação com um vetor, o ácaro *Varroa destructor* (HIGHFIELD et al., 2009; CARRECK, BALL e MARTIN, 2010; DAINAT et al., 2012; MARTIN et al., 2012).

O declínio de colônias no hemisfério norte chamou a atenção para esta comunidade de polinizadores, e apesar da apreensão mundial, os continentes da América do Sul, África e Austrália não registraram grandes perdas associadas ao ácaro (NEUMANN e CARRECK, 2010). Para o Brasil e regiões tropicais, *Varroa destructor* não se apresenta como um grande problema (CASTILHO et al., 2019). Especificamente no Brasil a perda de colônias é fortemente atribuída ao intenso uso de pesticidas na agricultura e pouco relacionado à infestação pelo ácaro, falhas de manejo e escassez de recursos alimentares (FREITAS e PINHEIRO, 2012; SILVA et al., 2015). Entre os anos de 2013 e 2017 foram registradas altas taxas de perdas de colônias (média de 64,7%), sendo que, apenas em 2017, a taxa média anual foi de 69,7% (CASTILHO et al., 2019).

#### **4.1. Associação entre as abelhas melíferas e o ácaro *Varroa destructor***

O ácaro *V. destructor* foi originalmente descrito em Java – uma ilha da Indonésia - e restrito ao sul da Ásia (OUDEMANS, 1904; SAMMATARO, GERSON e NEEDHAM, 2000). Inicialmente, um parasita nativo de *Apis cerana*, que no final dos anos 50 saltou a barreira de espécies para *A. mellifera*, quando as abelhas europeias foram mantidas ao lado de colônias de abelhas asiáticas

(DANKA et al., 1995). Sendo considerado um problema global (SAMMATARO, GERSON e NEEDHAM, 2000).

Este ácaro se alimenta exclusivamente da hemolinfa de abelhas adultas, larvas do 5º ínstar e pupa. Em 1952, foi relatado infestando *A. mellifera* em colônias da Rússia (DANKA et al., 1995); já na década de 60 foi registrado na China (SMIRNOV, 1978); e na década de 70, introduzido na América do Sul, trazido do Japão para o Uruguai, chegando ao Brasil em 1971; e em 1992 foi encontrado no México (VANDAME et al., 2002). Nos EUA, as informações acerca da presença do ácaro datam de 1987 (DE GUZMAN et al., 1997) e no Reino Unido, de 1992 (PAXTON, 1992). Existem apenas poucos lugares como Austrália, Havaí e ilhas isoladas que permanecem livres do ácaro (SAMMATARO, GERSON e NEEDHAM, 2000; MARTIN et al., 2012).

O equilíbrio parasita-hospedeiro evoluiu como resultado da seleção natural entre *A. cerana* e *Varroa* (PENG et al., 1987). Assim, as abelhas operárias de *A. cerana* têm a capacidade de detectar células infestadas por *Varroa*, mesmo após a cria ser operculada. Quando uma célula infestada é encontrada, as operárias abrem e removem os ácaros e crias. Esse comportamento é denominado comportamento higiênico ou de remoção (PENG et al., 1987; RATH e DRESCHER, 1990) e, mais recentemente, foi chamado de comportamento sensível a *Varroa* (CARRECK, 2011). O crescimento populacional de *Varroa* é ainda mais limitado em *A. cerana*, pois as fêmeas de *Varroa* só podem se reproduzir dentro de células de zangões, o que representa 1-5% de todas das crias dentro da colônia (ARECHAVALETA-VELASCO e GUZMÁN-NOVOA, 2001). Por outro lado, nas colônias de *A. mellifera* o ácaro também se reproduz nas células de crias de operárias, permitindo que as populações de ácaros aumentem até 2000 vezes anualmente, podendo causar a morte de colônias em um ano (MARTIN, 1998).

Normalmente, os apicultores empregam várias técnicas de manejo para reduzir infestação por de *Varroa*, que envolvem a aplicação de acaricidas nos quais os ácaros tem demonstrado desenvolver resistência (MILANI, 1995, 1999; THOMPSON et al., 2002; SAMMATARO et al., 2005) e métodos biotécnicos envolvendo várias manipulações de colônias, tal como impedir a oviposição da rainha visando reduzir o número de larvas para reprodução do ácaro

(ROSENKRANZ, AUMEIER e ZIEGELMANN, 2010). No entanto, naturalmente populações de *A. mellifera* desenvolveram uma tolerância a *Varroa*. Essa característica também está ligada ao comportamento higiênico, com remoção física de pupas infestadas e a remoção/dano do ácaro, e constitui importante fator de resistência nas abelhas africanizadas (AUMEIER, 2001) e europeias (RINDERER et al., 2001).

Em geral, estas populações tolerantes são de particular interesse para pesquisadores e programas de melhoramento genético de abelhas, e podem ser encontradas em todo o mundo: Inglaterra (MORDECAI et al., 2016a), Suécia (FRIES, IMDORF e ROSENKRANZ, 2006; LOCKE e FRIES, 2011), México (MONDRAGÓN, SPIVAK e VANDAME, 2005), França (LE CONTE et al., 2007), América do Norte (SEELEY, 2007) e Brasil, as quais sobrevivem sem o tratamento contra o ácaro (DE JONG, 1996; GUERRA Jr., GONÇALVES e DE JONG, 2000). O clima também é um fator importante, registra-se que em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, os níveis de infestação por varroa são menores que em regiões mais frias (MORETTO et al., 1991).

## 5. Vírus em abelhas

Aproximadamente 23 patógenos virais foram identificados em abelhas (CHEN e SIEDE, 2007; RUNCKEL et al., 2011; LI et al., 2014). A maioria dos vírus está presente em baixa carga viral e não causa sintomas aparentes da doença (assintomáticas). Múltiplas infecções virais podem estar presentes em uma única abelha a qualquer momento (TRAYNOR et al., 2016). Estas são, na sua maioria, vírus RNA de sentido positivo, pertencentes às famílias Dicistroviridae e Iflavididae e são frequentemente associadas à infestação por *Varroa* (BAILEY e BALL, 1991; CHEN e SIEDE, 2007; TENTCHEVA et al., 2004), um eficaz vetor de vírus em abelhas, sendo os principais: o Vírus da Paralisia Aguda (ABPV), Vírus Caxemira (KBV), Vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV) e o Vírus Deformador da Asa (DWV) (BERTHOUD et al., 2010; MARTIN et al., 2012; SCHROEDER e MARTIN, 2012; FRANCIS, NIELSEN e KRYGER, 2013).

O sentido do vírus se refere à polaridade dos ácidos nucléicos (5'-3' sentido positivo e 3'-5' sentido negativo) e determina como eles são replicados em uma

célula hospedeira. O RNAm viral é um pré-requisito para a replicação do vírus, que é traduzido nas proteínas necessárias para montar um novo virion. Os vírus que tem seu genoma composto pela fita simples de RNA podem ser subdivididos em: a) vírus cujo genoma tem a mesma orientação do RNAm, chamado genoma de polaridade positiva; e b) os vírus cujo genoma tem a orientação inversa do RNAm, chamados de polaridade negativa. Assim, quando a polaridade genômica do vírus é positiva, seu RNAm é traduzido diretamente pelos ribossomas da célula hospedeira. Caso o RNA tenha sua fita no sentido negativo, esta não pode ser traduzido diretamente pelos ribossomas, sendo necessária a RNA polimerase para transcrever/criar o RNAm viral que, por sua vez, será traduzidos em proteínas virais (CARTER e GENERSCH, 2008).

### **5.1 Vírus Deformador da Asa (*Deformed Wing Virus* [DWV])**

O vírus DWV, foco do segundo capítulo, pertencente à família Iflaviridae dentro da ordem Picornavirales, contém apenas uma cópia do genoma em cadeia simples de RNA, sentido positivo e genoma de 10.140 nt (nucleotídeos) (LANZI et al., 2006).

Inicialmente chamado de Vírus da Abelha do Egito (EBV), o DWV foi encontrado em abelhas adultas assintomáticas em 1977, no Egito (BAILEY, CARPENTER e WOODS, 1979). Subsequentemente foi isolado em abelhas do Japão em 1982 e renomeado como vírus deformador da asa pelos sintomas que apresentavam (LANZI et al., 2006). O DWV é o principal patógeno viral que afeta as abelhas em todo o mundo, já descritas para 18 espécies de abelhas (Quadro 1), incluindo *M. subnitida* – resultados do capítulo 2 – (GENERSCH et al., 2010; SCHROEDER e MARTIN, 2012; MARTIN e BRETTELL, 2019). No Brasil, o DWV teve seu primeiro registro em 2008, nas abelhas africanizadas (TEIXEIRA et al., 2008).

**Quadro 1.** Lista de espécies de abelhas em que a presença de DWV foi detectada (adaptada de Martin e Brettell, 2019).

<b>Espécies de Abelhas sociais (Apidae)</b>	<b>Referência</b>
<i>Apis mellifera</i>	LEVIN et al., 2019.
<i>Apis cerana</i>	TEHEL et al., 2016.
<i>Apis florea</i>	AMIRI, 2018.
<i>Apis dorsata</i>	AMIRI, 2018.
<i>Bombus</i> spp	GENERSCH et al. 2006; FÜRST et al., 2014; LEVIN et al., 2019.
<i>Bombus lucorum</i>	FÜRST et al., 2014; LEVIN et al., 2019.
<i>Bombus sylvarum</i>	LEVIN et al., 2019.
<i>Bombus terrestris</i>	GENERSCH et al. 2006; FÜRST et al., 2014; LEVIN et al., 2019.
<i>Bombus vagans</i>	SINGH et al., 2010.
<i>Bombus huntii</i>	TEHEL et al., 2016.
<i>Bombus atratus</i>	REYNALDI et al., 2013; GAMBOA et al., 2015.
<i>Bombus lapidarius</i>	FÜRST et al., 2014.
<i>Bombus pascuorum</i>	GENERSCH et al. 2006; ZHANG, 2012.
<i>Bombus impatiens</i>	SINGH et al., 2010; SACHMAN-RUIZ et al., 2015
<i>Bombus monticola</i>	FÜRST et al., 2014.
<i>Bombus ternarius</i>	BONCRISTIANI et al., 2009.
<i>Melipona subnitida</i>	SOUZA et al., 2019 (Resultado do capítulo 2 desta tese citado pelos autores).
<i>Scaptotrigona mexicana</i>	GUZMAN-NOVOA et al., 2015.
<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	ALVAREZ et al., 2018.

Este vírus, no entanto, não é exclusivo de abelhas, sendo até o momento já detectado em 64 espécies, abrangendo oito ordens (Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Dermaptera, Blattodea e Arachnida), resultando em uma ampla gama de hospedeiros para um único patógeno viral (MANLEY, BOOTS e WILFERT, 2015; MARTIN e BRETTELL, 2019; SINGH et al., 2010).

Recentemente, o DWV foi descrito como um complexo quasiespécie, com diferentes genótipos (MORDECAI et al., 2016b). Este complexo existe em um ambiente altamente mutagênico com um número de variantes mestres, cada uma tendo seu próprio conjunto de progênies mutantes. Este processo constante de mutação é devido à natureza dos vírus de RNA, que têm altas taxas de replicação propensas a erros como resultado do processo de transcrição reversa (PALACIOS et al., 2008; LAURING e ANDINO, 2010).

Como uma quasiespécies, o DWV existe como três variantes (genótipos) principais intimamente relacionadas: tipo A (LANZI et al., 2006), tipo B (ONGUS et al., 2004) e tipo C (MORDECAI et al., 2016b). A variante tipo A é a mais

comumente detectada e tem sido associada ao declínio das colônias (MARTIN et al., 2012; SCHROEDER e MARTIN, 2012; FRANCIS et al., 2013). O DWV tipo B (previamente designado por *V. destructor virus-1* (VDV-1)) foi implicado na sobrevivência em longo prazo de uma população de abelhas melíferas infestadas de ácaros no Reino Unido (MORDECAI et al., 2016a), embora outros estudos sugiram que o tipo B seja o mais letal (MCMAHON et al., 2016a; NATSOPOULOU et al., 2017). Os efeitos do DWV tipo C ainda são desconhecidos, pois é a variante mais recentemente descrita (MORDECAI et al., 2016b).

O vírus DWV recebeu seu nome devido às abelhas melíferas exibirem o sintoma da asa deformada, o que dificulta sua capacidade de voo, e para além desse, os sintomas clínicos podem ser também crescimento atrofiado, redução do tamanho do corpo, descoloração da cutícula, redução do tempo de vida, anormalidades sociais e comportamentais (BOWEN-WALKER, MARTIN e GUNN, 1999; DE MIRANDA e GENERSCH, 2010). Embora o fenótipo de deformação da asa seja um bom indicador da infecção por DWV, a falta aparente deste sintoma pode subestimar os níveis de infecção, mesmo em colônias altamente infectadas, pois a proporção de abelhas que apresentam sintomas visíveis é relativamente baixa (BRETTELL et al., 2017).

A transmissão do DWV pode ocorrer de forma vertical e horizontalmente. A transmissão vertical acontece quando os vírus são transmitidos dos pais para os descendentes durante a reprodução, via sêmen ou na superfície do ovo (CHEN et al., 2005; 2006; YUE et al., 2006). Essa transmissão é frequentemente associada à carga viral menor, uma vez que a próxima geração de hospedeiros é necessária para a sobrevivência e transmissão do vírus a longo prazo (FRIES e CAMAZINE, 2001; EBERT e BULL, 2003).

A transmissão horizontal ocorre por meio das atividades de alimentação das abelhas, com DWV detectado no pólen e alimento larval (CHEN et al., 2006; YUE et al., 2007). Essa atividade de alimentação é frequentemente associada a uma infecção assintomática (DE MIRANDA e GENERSCH, 2010). A transmissão horizontal também ocorre por meio da atividade de alimentação dos ácaros, que por sua vez inoculam o DWV diretamente na hemolinfa das abelhas, podendo causar infecções letais devido a alta carga viral injetada. Esta atividade de alimentação dos ácaros nas colônias de abelhas melíferas transformaram esse

vírus benigno em um dos mais difundidos no mundo (HIGHFIELD et al., 2009; MARTIN et al., 2012; SCHROEDER e MARTIN, 2012).

Desde a descoberta do DWV, várias técnicas foram desenvolvidas para detectar infecções. A pesquisa inicial empregou o uso de técnicas sorológicas, como o ELISA, que foram usadas para detectar a presença de antígenos específicos do DWV (BOWEN-WALKER, MARTIN e GUNN, 1999; SHEN et al., 2005).

Avanços tecnológicos recentes levaram ao uso de métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR), que são agora empregados regularmente nas pesquisas virais com o DWV. O PCR depende do uso de *primers* específicos, que atuam como ponto de partida para a síntese de DNA. Esta técnica é usada para amplificar cópias de DNA ou RNA de uma sequência genética alvo. Existem vários métodos de PCR disponíveis. Entretanto, o PCR limita-se a um resultado negativo / positivo, sendo necessários resultados quantitativos no campo da virologia para estabelecer a virulência de um vírus, uma vez que existe uma suposição básica de que quanto maior a carga viral, maior a virulência. Portanto, a PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) tem sido útil na identificação do DWV e amplamente utilizada (TENTCHEVA et al., 2004; GENERSCH, 2005; GAUTHIER et al., 2007; KUKIELKA et al., 2008; HIGHFIELD et al., 2009; MCMAHON et al., 2016).

O sequenciamento de última geração (NGS) produz uma grande quantidade de dados relativos a variantes virais, recombinantes e carga. Isso levou à identificação de novas variantes mestras de DWV – quasisespécie - (MOORE et al., 2011; DALMON et al., 2017; BRETTELL e MARTIN, 2017; MORDECAI et al., 2016b) e como resultado permitiu que pesquisadores aprofundassem sua compreensão de como o complexo quasisespécie do DWV interage com o hospedeiro.

Com os avanços tecnológicos e devido à descoberta das variantes DWV (A, B e C), os estudos começaram a se concentrar na presença e no papel destas variantes do DWV, incluindo o desenvolvimento de novos *primers* específicos a cada variante (KEVILL et al., 2017), e com o qual foram utilizados na metodologia do segundo capítulo desta tese.

Assim, este trabalho teve por objetivos: i) avaliar a variação morfométrica intraespecífica quanto a forma e tamanho da cabeça em populações insulares e continentais de *M. subnitida* e ii) avaliar a prevalência e a carga viral de três variantes mestras do DWV (tipo A, B e C) em populações de *M. subnitida* e de *A. mellifera*. Dessa forma, os estudos foram divididos nos seguintes Artigos:

Artigo 1: Variação populacional e efeito de ilha em *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae); e

Artigo 2: Ocorrência das variantes do vírus deformador da asa nas populações da abelha sem ferrão *Melipona subnitida* e da abelha melífera *Apis mellifera* no Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEMEL [Associação Brasileira dos Exportadores de Mel]. **Setor apícola brasileiro em números**. 2016. Disponível em: <  
<https://brazilletsbee.com.br/INTELIG%C3%8ANCIA%20COMERCIAL%20ABEMEL%20-%20JANEIRO2018.pdf>> acessado em 01 de junho de 2019.

ALVAREZ, L. J.; REYNALDI, F. J.; RAMELLO, P. J.; GARCIA, M. L. G.; SGUAZZA, G. H.; ABRAHAMOVICH, A. H.; LUCIA, M. Detection of honey bee viruses in Argentinian stingless bees (Hymenoptera: Apidae). **Insectes Sociaux**, 65:191-197, 2018.

AMIRI, E.; KRYGER, P.; MEIXNER, M. D.; STRAND, M. K.; TARPY, D. R.; RUEPPELL, O. Quantitative patterns of vertical transmission of deformed wing virus in honey bees. **Plos One**, v. 13:e0195283, 2018.

ANDERSON, D. L.; TRUEMAN, J. W. H. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. **Experimental & Applied Acarology**, v. 24, p. 165–189, 2000.

ARECHA VALETA-VELASCO, M. E.; GUZMÁN-NOVOA, E. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Apidologie**, v. 32, n. 2, p. 157–174, 2001.



AUMEIER, P. Bioassay for grooming effectiveness towards *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees. **Apidologie**, v. 32, n 1, p. 81–90, 2001.

BAILEY, L.; BALL, B. V. **Honey Bee Pathology**. Elsevier, 1991, p. 208.

BAILEY, L.; CARPENTER, J. M.; WOODS, R. D. Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. **Journal of General Virology**, v. 43, n. 3, p. 641–647, 1979.

BAROUR, C.; BAYLAC, M. Geometric morphometric discrimination of the three African honeybee subspecies *Apis mellifera intermissa*, *A. m. sahariensis* and *A. m. capensis* (Hymenoptera, Apidae): Fore wing and hind wing landmark configurations. **Journal of Hymenoptera Research**, v. 52, p. 61–70, 2016.

BBKA [British Beekeeping Association]. **Winter honey bee losses in England**. Disponível em: <<https://www.bbka.org.uk/winter-honey-bee-losses-in-england>> acessado em 01 de abril de 2019.

BEEINFORMED PARTNERSHIP. **Honey Bee Colony Losses 2016-2017: Preliminary Results**. Disponível em: <<https://beeinformed.org/2017/05/25/2016-2017-loss-results-thank-you-to-all-survey-participants/>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

BERENYI, O.; BAKONYI, T.; DERAKHSHIFAR, I.; KOGLBERGER, H.; TOPOLSKA, G.; RITTER, W.; PECHHACKER, H.; NOWOTNY, N. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3605–3611, 2007.

BERTHOUD, H.; IMDORF, A.; HAUETER, M.; RADLOFF, S.; NEUMANN, P. Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 60–65, 2010.

BLOCH, G.; FRANCOY, T. M.; WACHTEL, I.; PANITZ-COHEN, N.; FUCHS, S.; MAZAR, A. Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 25, p. 11240–11244, 2010.

BONATTI, V.; SIMÕES, Z. L. P.; FRANCO, F. F.; FRANCOY, T. M. Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings.

**Naturwissenschaften**, v. 101, n. 1, p. 17–24, 2014.

BONCRISTIANI, H. F.; DI PRISCO, G.; PETTIS, J.S.; HAMILTON, M.; CHEN, Y. P. Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee, *Apis mellifera*. **Virology Journal**, 6:221, 2009.

BOOKSTEIN, F. L. A hundred years of morphometrics. **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 44, p. 7–59, 1998.

BOWEN-WALKER, P.; MARTIN, S.; GUNN, A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite varroa jacobsoni Oud. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, n. 1, p. 101–106, 1999.

BRETTELL, L. E.; MARTIN, S. J. Oldest Varroa tolerant honey bee population provides insight into the origins of the global decline of honey bees. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45953, 2017.

BRETTELL, L.; MORDECAI, G.; SCHROEDER, D.; JONES, I.; SILVA, J. DA; VICENTE-RUBIANO, M.; MARTIN, S. A Comparison of Deformed Wing Virus in Deformed and Asymptomatic Honey Bees. **Insects**, v. 8, n. 1, p. 28, 2017.

BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 410–416, 2009.

BRUENING, H. **Abelha Jandaíra**. 2ª ed. RN, 2001, p. 148.

BUCHMANN, S.; NABHAN, G. **The Forgotten Pollinators**. Washington: Island Press, 1996, p. 312.

CÂMARA, J. Q.; SOUSA, A. H. DE; VASCONCELOS, W. E. DE; FREITAS, R. DA S.; MAIA, P. H. DA S.; ALMEIDA, J. C. DE; MARACAJÁ, P. B. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, p. 20, 2004.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. *In*: MOURE, J.; URBAN, D.; MELO, G. (Eds.). **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007. p. 272–578.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. *In*: MOURE, J.; URBAN, D.; MELO, G. (Eds.). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. 2013. (data de acesso: 12 setembro, 2014).

CARRECK, N. L. Breeding honey bees for varroa tolerance. *In*: CARRECK, N. L. (Ed.). **Varroa- still a problem in the 21st century**, 2011. p. 43–52.

CARRECK, N. L.; BALL, B. V.; MARTIN, S. J. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 93–94, 2010.

CARTER, M. J.; GENERSCH, E. Molecular characterisation of honey bee viruses. *In*: AUBERT, M. ET AL. (Ed.). **Virology and the Honey Bee**. Luxembourg: European Communities, 2008. p. 85–120.

CASTILHOS, D.; BERGAMO, G. C.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2019.

CHEN, Y. P.; HIGGINS, J. A.; FELDLAUFER, M. F. Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis of Deformed Wing Virus Infection in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 436–441, 2005.

CHEN, Y.; EVANS, J.; FELDLAUFER, M. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, n. 3, p. 152–159, 2006.

CHEN, Y. P.; SIEDE, R. Honey Bee Viruses. **Advances in Virus Research**, v. 70, p. 33–80, 2007.

CHIANG, J. C. H.; KOUTAVAS, A. Tropical flip-flop connections. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 684–685, 2004.

CORREIA-OLIVEIRA, M. E.; LIMA, C. B. DA S.; ALVES, R. M. DE O.; SODRÉ, G. DA S.; SOUZA, B. DE A.; F. RIBEIRO, M. DE; CARVALHO, C. A. L. DE. The Southern Limit of Natural Occurrence of the stingless bee *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Entomological Research**, v. 41, n. 4, p. 353–360, 2017.

DAINAT, B.; EVANS, J. D.; CHEN, Y. P.; GAUTHIER, L.; NEUMANN, P. Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 981–987, 2012.

DALMON, A.; DESBIEZ, C.; COULON, M.; THOMASSON, M.; CONTE, Y. LE; ALAUX, C.; VALLON, J.; MOURY, B. Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 41045, 2017.

DANFORTH, B. N.; SIPES, S.; FANG, J.; BRADY, S. G. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 41, p. 15118–15123, 2006.

DANKA, R. G.; RINDERER, T. E.; KUZNETSOV, V. N.; DELATTE, G. T. A USDA-ARS project to evaluate resistance to *Varroa jacobsoni* by honey bees of Far-Eastern Russia. **American Bee Journal**, v. 135, n. 11, p. 746–748, 1995.

DE GUZMAN, L. I.; RINDERER, T. E.; STELZER, J. A. DNA evidence of the origin of *Varroa jacobsoni* Oudemans in the Americas. **Biochemical Genetics**, v. 35, p. 327–335, 1997.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, n. 2, p. 67–70, 1996.

DE MIRANDA, J. R.; GENERSCH, E. Deformed wing virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. SUPPL. 1, p. S48–S61, 2010.

DE SOUZA, D.; WANG, Y.; KAFTANOGLU, O.; JONG, D. DE; AMDAM, G. V.; S. GONÇALVES, L.; M. FRANCOY, T. Morphometric Identification of Queens, Workers and Intermediates in In Vitro Reared Honey Bees (*Apis mellifera*). **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0123663, 2015.

EBERT, D.; BULL, J. J. Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 15–20, 2003.

FRANCIS, R. M.; NIELSEN, S. L.; KRYGER, P. Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e57540, 2013.

FRANCISCO, P. R. M.; CHAVES, I. B.; CHAVES, L. H. G.; LIMA, E. R. V. Estimativa da degradação da biomassa da vegetação de caatinga através de índices de vegetação. **Polêm!ca**, v. 12, n. 2, p. 306–321, 2013.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.-M. The origin of west european subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution**, v. 52, n. 4, p. 1119–1134, ago. 1998.

FRANCOY, T. M. **Variabilidade genético-morfológica em populações Neotropicais de *Apis mellifera***. Tese - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. São Paulo, p. 163, 2007.

FRANCOY, T. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 01, p. 317–321, 2010.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros. Brasília: **MMA**, 2012. 112 p.

FRIES, I.; CAMAZINE, S. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. **Apidologie**, v. 32, n. 3, p. 199–214, 2001.

FRIES, I.; IMDORF, A.; ROSENKRANZ, P. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. **Apidologie**, v. 37, n. 5, p. 564–570, 2006.

FÜRST, M. A.; MCMAHON, D. P.; OSBORNE, J. L.; PAXTON, R. J.; BROWN, M. J. F. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 364–66, 2014.

GAMBOA, V.; RAVOET, J.; BRUNAIN, M.; SMAGGHE, G.; MEEUS, I.; Figueroa, J.; RIAÑO, D.; GRAAF, D. C. Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 129, p. 36–39, 2015.

GAUTHIER, L.; TENTCHEVA, D.; TOURNAIRE, M.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; COLIN, M. E.; BERGOIN, M. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. **Apidologie**, v. 38, n. 5, p. 426–435, 2007.

GENERSCH, E. Development of a rapid and sensitive RT-PCR method for the detection of deformed wing virus, a pathogen of the honeybee (*Apis mellifera*). **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 1, p. 121–123, 2005.

\_\_\_\_\_. 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.

\_\_\_\_\_. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 87–97, 2010.

GENERSCH, E.; YUE, C.; INGEMAR, F.; DE MIRANDA, J.R. Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 91, pp. 61-63, 2006.

GOBLIRSCH, M. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 49, n. 1, p. 131-150, 2018.

GONÇALVES, L. S. The introduction of the African bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America. **American Bee Journal**, v. 114, n.11, p. 414-419 p. 1974.

GUERRA JR., J. C. V.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D. Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) are more efficient at removing worker brood artificially infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans than are Italian bees or Italian/Africanized hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 89–92, 2000.

GUZMAN-NOVOA, E.; HAMIDUZZAMAN, M. M.; ANGUIANO-BAEZ, R.; CORREA-BENÍTEZ, A.; CASTAÑEDA-CERVANTES, E.; ARNOLD, N. I. First detection of honey bee viruses in stingless bees in North America. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 2, p. 93–95, 2015.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.-F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348–350, 2012.

HIGHFIELD, A. C.; NAGAR, A. EL; MACKINDER, L. C. M.; NOEL, L. M.-L. J.; HALL, M. J.; MARTIN, S. J.; SCHROEDER, D. C. Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7212–7220, 2009.

JAFFÉ, R.; CARVALHO, A. T.; MAIA, U. M.; BLOCHTEIN, B.; CARVALHO, C. A. L. DE; CARVALHO-ZILSE, G. A.; FREITAS, B. M.; MENEZES, C.; RIBEIRO, M. F.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121157, 2015.

KERR, W. E.; LELLO, E. Sting glands in stingless bees – a vestigial character (hymenoptera, Apidae). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 70, p. 190–214, 1962.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte-MG: Acangaú (Coleção Manejo da vida silvestre), 1996.

KEVILL, J.; HIGHFIELD, A.; MORDECAI, G.; MARTIN, S.; SCHROEDER, D. ABC Assay: Method Development and Application to Quantify the Role of Three DWV Master Variants in Overwinter Colony Losses of European Honey Bees. **Viruses**, v. 9, n. 11, p. 314, 2017.

KROL, M.; JAEGER, A.; BRONSTERT, A.; KRYWKOW, J. The semi-arid integrated model (SIM), a regional integrated model assessing water availability, vulnerability of ecosystems and society in NE-Brazil. **Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere**, v. 26, n. 7–8, p. 529–533, 2001.

KUKIELKA, D.; ESPERÓN, F.; HIGES, M.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. **Journal of Virological Methods**, v. 147, n. 2, p. 275–281, 2008.

LANZI, G.; MIRANDA, J. R. DE; BONIOTTI, M. B.; CAMERON, C. E.; LAVAZZA, A.; CAPUCCI, L.; CAMAZINE, S. M.; ROSSI, C. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Virology**, v. 80, n. 10, p. 4998–5009, 2006.

LAURING, A. S.; ANDINO, R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. 1–8, 2010.

LE CONTE, Y.; VAUBLANC, G. DE; CRAUSER, D.; JEANNE, F.; ROUSSELLE, J.-C.; BÉCARD, J.-M. Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. **Apidologie**, v. 38, n. 6, p. 566–572, 2007.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga: uma Introdução ao Desafio**. Recife, Brasil: Universitária UFPE, 2003.



LEVIN, S.; SELA, N.; EREZ, T.; NESTEL, D.; PETTIS, J.; NEUMANN, P.; CHEJANOVSKY, N. New viruses from the ectoparasite mite *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Viruses**, v. 11, p. 94, 2019.

LI, J. L. *et al.* Systemic Spread and Propagation of a Plant-Pathogenic Virus in European Honeybees, *Apis mellifera*. **mBio**, v. 5, n. 1, 2014.

LIMA, C. B.; NUNES, L. A.; RIBEIRO, M. D. F.; CARVALHO, C. A. Population Structure of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) at the Southern Limit of its Distribution Based on Geometric Morphometrics of Forewings. **Sociobiology**, v. 61, n. 4, 2014.

LO, N.; GLOAG, R. S.; ANDERSON, D. L.; OLDROYD, B. P. A molecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the Giant Honey Bee of the Philippines, *A. breviligula* Maa, and the Plains Honey Bee of southern India, *A. indica* Fabricius, are valid species. **Systematic Entomology**, v. 35, n. 2, p. 226–233, 2010.

LOCKE, B.; FRIES, I. Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. **Apidologie**, v. 42, n. 4, p. 533–542, 2011.

MANLEY, R.; BOOTS, M.; WILFERT, L. REVIEW: Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. **Journal of Applied Ecology**, v. 52, n. 2, p. 331–340, 2015.

MARTIN, S. A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Ecological Modelling**, v. 109, n. 3, p. 267–281, 1998.

MARTIN, S.J.; HIGHFIELD, A. C.; BRETTELL, L.; VILLALOBOS, E. M.; BUDGE, G. E.; POWELL, M.; NIKAIDO, S.; SCHROEDER, D. C. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1304–1306, 2012.

MARTIN, S. J.; BRETTELL, L. E. Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. **Annual Review of Virology**, v. 6, n.1, 2019. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015700.

MCCMAHON, D. P.; NATSOPOULOU, M. E.; DOUBLET, V.; FÜRST, M.; WEGING, S.; BROWN, M. J. F.; GOGOL-DÖRING, A.; PAXTON, R. J. Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1833, p. 20160811, 2016.

MENEZES, P. Criação racional de abelha jandaíra. *In*: BRUENING, H. (Ed.). **Abelha Jandaíra**. Natal, Brasil. p. 121–135, 2006.

MIGUEL, I.; BAYLAC, M.; IRIONDO, M.; MANZANO, C.; GARNERY, L.; ESTONBA, A. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. **Apidologie**, v. 42, n. 2, p. 150–161, 2011.

MILANI, N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. **Apidologie**, v. 26, n. 5, p. 415–429, 1995.

MILANI, N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. **Apidologie**, v. 30, n. 2–3, p. 229–234, 1999.

MONDRAGÓN, L.; SPIVAK, M.; VANDAME, R. A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. **Apidologie**, v. 36, n. 3, p. 345–358, 2005.

MOORE, J.; JIRONKIN, A.; CHANDLER, D.; BURROUGHS, N.; EVANS, D. J.; RYABOV, E. V. Recombinants between Deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 1, p. 156–161, 2011.

MORDECAI, GIDEON J.; BRETTELL, L. E.; MARTIN, S. J.; DIXON, D.; JONES, I. M.; SCHROEDER, D. C. Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies. **The ISME Journal**, v. 10, n. 5, p. 1182–1191, 2016a.

- MORDECAI, GIDEON J.; WILFERT, L.; MARTIN, S. J.; JONES, I. M.; SCHROEDER, D. C. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. **The ISME Journal**, v. 10, n. 5, p. 1264–1273, 2016b.
- MORETTO, G.; GONÇALVES, L. S.; JONG, D. DE; BICHUETTE, M. Z. The effects of climate and bee race *Varroa jacobsoni* Oud infestations in Brazil. **Apidologie**, v. 22, p. 197–203, 1991.
- MOURE, J. M.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. **Sociedade Brasileira de Entomologia**, 2007.
- NATSOPOULOU, M. E.; MCMAHON, D. P.; DOUBLET, V.; FREY, E.; ROSENKRANZ, P.; PAXTON, R. J. The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5242, 2017.
- NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 1–6, 2010.
- OLIVEIRA, M. L. DE; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 389–394, 2005.
- OLIVEIRA, G. DE; ARAÚJO, M. B.; RANGEL, T. F.; ALAGADOR, D.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 11, p. 2913–2926, 2012.
- ONGUS, J. R.; PETERS, D.; BONMATIN, J.; BENGSCHE, E.; VLAK, J. M.; OERS, M. M. VAN. 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.
- OUDEMANS, A. C. On a new genus and species of parasitic Acari. **Notes from the Leyden Museum**, v. 24, p. 216–222, 1904.

PALACIOS, G. *et al.* Genetic Analysis of Israel Acute Paralysis Virus: Distinct Clusters Are Circulating in the United States. **Journal of Virology**, v. 82, n. 13, p. 6209–6217, 2008.

PAXTON, R. The mite marches on: *Varroa jacobsoni* found in the UK. **Bee World**, v. 73, n. 2, p. 94–99, 1992.

PENG, Y.-S.; FANG, Y.; XU, S.; GE, L. The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 49, n. 1, p. 54–60, 1987.

PORTO, D. S.; VILHELMOSEN, L.; ALMEIDA, E. A. B. Comparative morphology of the mandibles and head structures of corbiculate bees (Hymenoptera: Apidae: Apini). **Systematic Entomology**, v. 41, n. 2, p. 339–368, 2016.

POTTS, S. G.; ROBERTS, S. P. M.; DEAN, R.; MARRIS, G.; BROWN, M. A.; JONES, R.; NEUMANN, P.; SETTELE, J. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 15–22, 2010.

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; GARIBALDI, L. A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220–229, 2016.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. *In: Ecologia e conservação da caatinga*. Recife, Brasil: Editora Universitária, UFPE, 2003.

PRADO-SILVA, A.; NUNES, L. A.; ALVES, R. M. DE O.; CARNEIRO, P. L. S.; WALDSCHMIDT, A. M. Variation of fore wing shape in *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera, Meliponini) along its geographic range. **Journal of Hymenoptera Research**, v. 48, p. 85–94, 2016.

RATH, W.; DRESCHER, W. Response of *Apis cerana* Fabr towards brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud and infestation rate of colonies in Thailand. **Apidologie**, v. 21, n. 4, p. 311–321, 1990.

REYNALDI, F.; SGUAZZA, G.; ALBICORO, F.; PECORARO, M.; GALOSI, C. First molecular detection of co-infection of honey bee viruses in asymptomatic *Bombus atratus* in South America. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, p. 797–800, 2013.

RINDERER, T. E.; DE GUZMAN, L. I.; DELATTE, G. T.; STELZER, J. A.; LANCASTER, V. A.; KUZNETSOV, V.; BEAMAN, L.; WATTS, R.; HARRIS, J. W. Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees from far-eastern Russia. **Apidologie**, v. 32, n. 4, p. 381–394, 2001.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 8, n. 4, p. 129–132, 1993.

ROSENKRANZ, P.; AUMEIER, P.; ZIEGELMANN, B. Biology and control of *Varroa destructor*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. S96–S119, 2010.

RUNCKEL, C.; FLENNIKEN, M. L.; ENGEL, J. C.; RUBY, J. G.; GANEM, D.; ANDINO, R.; DERISI, J. L. Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, Nosema, and Crithidia. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e20656, 2011.

RUTTNER, F. **Queen rearing: Biological basis and technical instruction**. Apimondia Publishing House, Bucharest, Romania: 1983, p. 358.

RUTTNER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybees**, Springer Verlag, Berlin. 1988, p. 284.

RUTTNER, F.; TASSENCOURT, L.; LOUVEAUX, J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L., **Apidologie**, v. 9, p. 363–381, 1978.

SACHMAN-RUIZ, B; NARVÁEZ-PADILLA, V.; REYNAUD, E. Commercial *Bombus impatiens* as reservoirs of emerging infectious diseases in central México. **Biological Invasions**, v. 17, p.s 2043–2053, 2015.

SAMMATARO, D.; GERSON, U.; NEEDHAM, G. Parasitic Mites of Honey Bees: Life History, Implications, and Impact. **Annual Review of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 519–548, 2000.

SAMMATARO, D.; UNTALAN, P.; GUERRERO, F.; FINLEY, J. The resistance of varroa mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. **International Journal of Acarology**, v. 31, n. 1, p. 67–74, 2005.

SANTOS, A. B. Abelhas nativas: polinizadores em declínio. **Natureza on line**, v. 8, n. 3, p. 103–106, 2010.

SCHROEDER, D. C.; MARTIN, S. J. Deformed wing virus. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 589–591, 2012.

SEELEY, T. D. Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. **Apidologie**, v. 38, n. 1, p. 19–29, 2007.

SHEN, M.; YANG, X.; COX-FOSTER, D.; CUI, L. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. **Virology**, v. 342, n. 1, p. 141–149, 2005.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P. DOS; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S. DA; SILVA, G. S. DA; NOVAIS, J. S. DE; SANTOS, F. DE A. R. DOS; CAMARA, C. A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10–18, 2013.

SILVA, I. P.; OLIVEIRA, F. A. S.; PEDROZA, H. P.; GADELHA, I. C. N.; MELO, M. M.; SOTO-BLANCO, B. Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. **Apidologie**, v. 46, n. 6, p. 703–715, 2015.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte. 2002.

SINGH, R.; LEVITT, A. L.; RAJOTTE, E. G.; HOLMES, E. C.; OSTIGUY, N.; VANENGELSDORP, D.; LIPKIN, W. I.; DEPAMPHILIS, C. W.; TOTH, A. L.; COX-

FOSTER, D. L. RNA Viruses in Hymenopteran Pollinators: Evidence of Inter-Taxa Virus Transmission via Pollen and Potential Impact on Non-Apis Hymenopteran Species. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e14357, 2010.

SMIRNOV, A. Research results obtained in USSR concerning aetiology, pathogenesis, epizootiology, diagnosis and control of Varroa disease in bees. **Apiacta. An international technical magazine of apicultural and economic information**, v. 13, n. 4, p. 149-162, 1978.

SOARES, A. E. E. **Abelhas Africanizadas no Brasil: Do Impacto Inicial às Grandes Transformações**. Anais da 64ª Reunião Anual da SBPC, 2012.

SOUZA, F. S.; KEVILL, J. L.; CORREIA-OLIVEIRA, M. E.; CARVALHO, C. A. L.; MARTIN, S. J. M. Occurrence of deformed wing virus variants in the stingless *Melipona subnitida* and honey bee *Apis mellifera* populations in Brazil. **JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY**, v. 100, n. 2, p. 289–94, 2019.

SUMPTER, D. J. T.; MARTIN, S. J. The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. **Journal of Animal Ecology**, v. 73, p. 51–63, 2004.

TEHEL, A.; BROWN, M. J.; PAXTON, R. J. Impact of managed honey bee viruses on wild bees. **Current Opinion in Virology**, v. 19, p. 16–22, 2016.

TEIXEIRA, E. W.; CHEN, Y.; MESSAGE, D.; PETTIS, J.; EVANS, J. D. Virus infections in Brazilian honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, n. 1, p. 117–119, 2008.

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

THOMPSON, H. M.; BROWN, M. A.; BALL, R. F.; BEW, M. H. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK. **Apidologie**, v. 33, n. 4, p. 357–366, 2002.

TOFILSKI, A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 558–563, 2008.

TRAYNOR, K. S.; RENNICH, K.; FORSGREN, E.; ROSE, R.; PETTIS, J.; KUNKEL, G.; MADELLA, S.; EVANS, J.; LOPEZ, D.; VANENGELSDORP, D. Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. **Apidologie**, v. 47, n. 3, p. 325–347, 2016.

VANDAME, R.; MORAND, S.; COLIN, M.-E.; BELZUNCES, L. P. Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. **Apidologie**, v. 33, n. 5, p. 433–445, 2002.

VANENGELSDORP, D.; HAYES, J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, p. 1–6, 2008.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6481, 2009.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. DE F. O.; PEREIRA, C. A. B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança - PA, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2003.

YUE, C.; SCHRÖDER, M.; BIENEFELD, K.; GENERSCH, E. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, n. 2, p. 105–108, 2006.

YUE, C.; SCHRODER, M.; GISDER, S.; GENERSCH, E. Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of General Virology**, v. 88, n. 8, p. 2329–2336, 2007.



ZHANG, X.; HE, S. Y.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. S.; YIN, G. F.; CHEN, Y. P. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 156–59, 2012.

ZELDITCH, M. L.; SWIDERSKI, D. L.; SHEETS, H. D.; FINK, W. L. **Geometric Morphometrics for Biologists**. Elsevier Academic Press, 2004, 416p.

**ARTIGO 1****POPULATION VARIATION AND ISLAND EFFECT IN *Melipona subnitida* (HYMENOPTERA: APIDAE)<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo publicado no periódico *Journal of Apicultural Research* (ISSN 0021-8839), v,58, n.1, p. 67-74, 2019 DOI: 10.1080/00218839.2018.1494920.

## **Population variation and island effect in *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae)**

**Abstract:** We examined the head morphology of island and mainland populations of the stingless bee *Melipona subnitida*. We employed geometric morphometrics to test for differences in head morphology and analyzed 122 colonies. Head measurements were performed using 25 landmarks and semi-landmarks. For head shape, landmarks were analyzed by generalized procrustes analysis, principal component analysis (PCA), Mahalanobis distance, discriminant function analysis, cross-validation and unweighted pair-group method clustering (UPGMA). For head size, data were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test. In addition, the relations between head shape, head size, geographical distance and altitude were analyzed using Pearson's correlation coefficients. Morphological analyses revealed significant differences ( $p < .01$ ) between mainland and island populations. Moreover, island bees differed in head shape and head size. The first two principal components explained 69.72% of the total variation, and UPGMA revealed that the individuals collected on the Island of Fernando de Noronha differed from the remaining locations, with 100% bootstrap support. Cross-validation correctly classified 84% of the individuals into their respective locations. The results also indicated structuring of those populations introduced to and isolated on the Island of Fernando de Noronha for more than 30 years. The characterization of the studied *M. subnitida* populations, especially the island populations, alerts us to the fact that isolation may lead to a loss of diversity, or even of the whole population, in *M. subnitida* and the remaining meliponines, possibly negatively affecting biotic interactions, especially plant–pollinator interactions.

### **Variación poblacional y efecto insular en *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae)**

**Resumen:** Examinamos la morfología de la cabeza de poblaciones insulares y continentales de *Melipona subnitida*. Empleamos morfometría geométrica para probar las diferencias en la morfología de la cabeza y analizamos 122 colonias.

Las mediciones de la cabeza se realizaron utilizando 25 puntos y semi-puntos de referencia. Para la forma de la cabeza, los puntos de referencia se analizaron mediante el análisis procrustal generalizado, el análisis de componentes principales (PCA), la distancia Mahalanobis, el análisis de funciones discriminantes, la validación cruzada y la agrupación de métodos de grupos de pares no ponderados (UPGMA). Para el tamaño de la cabeza, los datos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey. Además, se analizaron las relaciones entre la forma de la cabeza, el tamaño de la cabeza, la distancia geográfica y la altitud utilizando los coeficientes de correlación de Pearson. Los análisis morfológicos revelaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre las poblaciones del continente y de las islas. Además, las abejas insulares diferían en la forma y el tamaño de la cabeza. Los dos primeros componentes principales explicaron el 69,72% de la variación total, y la UPGMA reveló que los individuos recolectados en la Isla de Fernando de Noronha difirieron del resto de las localidades, con un 100% de apoyo de bootstrap. La validación cruzada clasificó correctamente al 84% de los individuos en sus respectivas ubicaciones. Los resultados también indicaron la estructuración de las poblaciones introducidas y aisladas en la isla de Fernando de Noronha durante más de 30 años. La caracterización de las poblaciones estudiadas de *M. subnitida*, especialmente las poblaciones insulares, nos alerta de que el aislamiento puede llevar a una pérdida de diversidad, o incluso de toda la población, en *M. subnitida* y los meliponinos restantes, afectando posiblemente negativamente a las interacciones bióticas, especialmente las interacciones planta-polinizador.

Keywords: Stingless bees; insular adaptation; head size; population diversity; geometric morphometrics

## Introduction

Understanding the processes that lead to differentiation between populations is very important in evolutionary biology (Spurgin, Illera, Jorgensen,

Dawson, & Richardson, 2014). Differentiation may happen due to natural or human-mediated events. Islands are good environmental systems and provide natural experiments to test relatively simple hypotheses about population biology and genetic diversity (Wang et al., 2014; White & Searle, 2007). In addition to studies at the intra-specific level, the particular nature of these habitats may also provide evidence of adaptive divergence (Sagonas et al., 2014).

In many cases of isolation, a small number of founder individuals in combination with the new environmental conditions evolve to an island endemic form (White & Searle, 2007). Furthermore, the level of genetic differentiation between populations is positively correlated to the phenotypic divergence caused by isolation and adaptation (Nosil, Funk, & Ortiz-Barrientos, 2009). Many groups, such as island bird species, may show decreased flight capacity (McNab, 1994), loss of dispersal capacity and body size changes (Lomolino, Riddle, & Brown, 2005) becoming smaller than their mainland homologs, as observed in lizard populations (Roughgarden, 1995; Schwartz & Henderson, 1991). The body size of island individuals therefore frequently differs from mainland individuals – “the island rule” (van Valen, 1973) – becoming either smaller or larger.

In 1983, 30 colonies of “Jandaíra” stingless bees (*Melipona subnitida* Ducke, 1910) were introduced to the Island of Fernando de Noronha (IFN), 345 km from the Brazilian coast. Twenty colonies originated from the municipality of Fortaleza (Ceará state) and 10 from the municipality of Mossoró (Rio Grande do Norte state) (Kerr & Cabeda, 1985). Recently, Ribeiro and Lima (2015) reported unmanaged bee colonies by the beekeepers through the years, with neither honey nor other product being commercialized, also no feral colonies were found.

The relative time to monitoring the consequences of founder effect has been attempted in few studies. In the wild, the process of bird colonization (*Geospiza magnirostris*) in the Galapagos Islands provided evidence of drift and selection causing morphological divergence (Grant, Grant, & Peetren, 2001). This divergence occurred after nine years and showed the tendency for faster modifying morphological traits on islands holds over relatively short time scales (Millien, 2006). Therefore *M. subnitida* colonies were successfully established, and because they have survived in isolation on this island until the present day, they

are interesting for studies of ecological and evolutionary processes (Lee & Lin, 2012).

*Melipona subnitida* is native and endemic to Northeast Brazil and is relevant to environmental conservation because is an important pollinator, honey and pollen producer, and is resilient to the climatic stress of a semi-arid environment. Also this stingless bees is important for the meliponiculture throughout the region (Cortopassi-Laurino et al., 2006).

Bees have been studied using different methods including geometric morphometrics, which has been found to be effective for bee identification and diversity estimation, especially when wing measurements are used, such as in *Apis mellifera* (Barour & Baylac, 2016; Sousa, Araujo, Gramacho, & Nunes, 2016), *Melipona* spp. (Araújo et al., 2016; Lima Junior, Carvalho, Nunes, & Francoy, 2012; Lima Junior, Carvalho, Nunes, & Santos, 2015; Nunes, Passos, Carvalho, & Araujo, 2013; Prado-Silva, Nunes, de Oliveira, Carneiro, & Waldschmidt, 2016) and *M. subnitida* (Bonatti, Simões, Franco, & Francoy, 2014; Lima, Nunes, Ribeiro, & Carvalho, 2014). However, few studies have used head morphometrics (Souza et al., 2015) or compared island and mainland bee populations (Rivera-Marchand, Oskay, & Giray, 2012).

The aim of the present study was to evaluate the intra-specific morphometric variation of head shape and size in island and mainland populations of *M. subnitida* and to identify island selective pressures that may shape phenotypic traits.

## **Material and methods**

### ***Samples***

In total, 1058 individuals of *M. subnitida*, belonging to 122 managed colonies from 12 different locations in five states of the Brazilian Northeast region, were evaluated (Table 1, Figure 1).

**Table 1.** Information about *M. subnitida* locations, number of colonies, geographical coordinates, altitude and Köppen–Geiger climate classification.

State	Location	Number of colonies	Lat (S)	Long (W)	Altitude (m)	Climatic Classification Köppen-Geiger
Alagoas (AL)	Água Branca	10	9°10'24.7"	37°51'41.9"	380	Aw
	Mata Grande	12	9°11'09.3"	37°50'09.8"	424	Aw
Bahia (BA)	Joá	06	9°31'08.8"	38°25'36.7"	243	BSh
	São José	08	9°39'04.8"	38°22'43.2"	243	BSh
Ceará (CE)	Fortaleza	06	3°43'02"	38°32'35"	15	Aw
Pernambuco (PE)	Island of Fernando de Noronha	12	3°50'51.4"	32°24'17.7"	90	Aw
	Cumarú	08	8°1'58.5"	35°45'3.11"	348	Aw
	Exu	04	7°20'22.6"	39°54'58.5"	887	Aw
	Passira	05	7°55'37.8"	35°30'14.0"	160	Aw
	Riacho das Almas	06	8°3'40.7"	35°49'9.62"	413	BSh
	Taquaritinga do Norte	12	7°56'14.1"	36°7'05.7"	785	Aw
Rio Grande do Norte (RN)	Mossoró	33	5°12'34.17"	37°20'23.03"	30	Aw

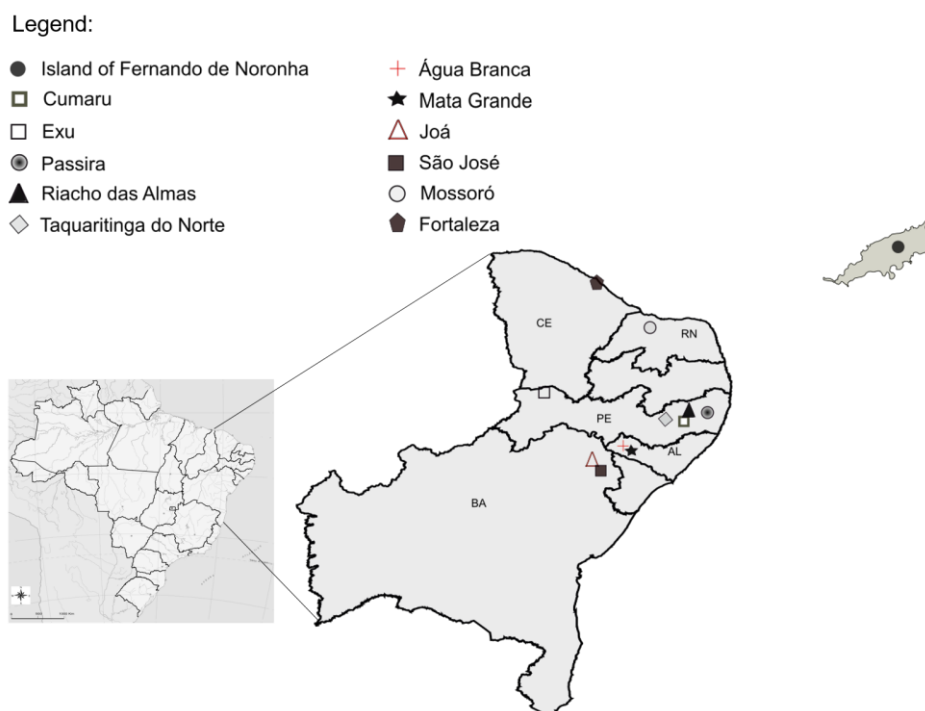


Figure 1. Map of the Brazilian Northeast showing the geographical location of the studied populations of *Melipona subnitida*.

### **Head shape and size**

Heads of worker bees were removed and placed on slides for microscopy. Images were captured using a camera coupled to a stereomicroscope (Leica Application Suite 3.4.1, Wetzlar, Germany). Nine landmarks (1-3 = ocelli, 12-13 = antennae, and 18-21 = clypeus) and 16 semi-landmarks (4-11 = compound eyes,

14-17 = clypeus, and 22-25 = compound eyes) were digitized using tpsDIG2 (Rohlf, 2015, Stony Brook, USA) (Figure 2). For head shape, generalized procrustes analysis, principal component analysis (PCA), discriminant function analysis and cross-validation were performed by colony average in MorphoJ 2.0 software (Klingenberg, 2011, Manchester, UK). Unweighted pair-group method cluster analysis (UPGMA), based on the Mahalanobis distance and the cophenetic correlation coefficient, was performed using Past 1.81 (Paleontological Statistics) software (Hamer, Harper, & Ryan, 2001, Oslo, Norway), with 10,000 permutations. For head size, based on centroid size, data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. Relations between head shape and size and geographical distance and altitude were analyzed by Pearson's correlation analysis using Past software (Hamer et al., 2001, Oslo, Norway).

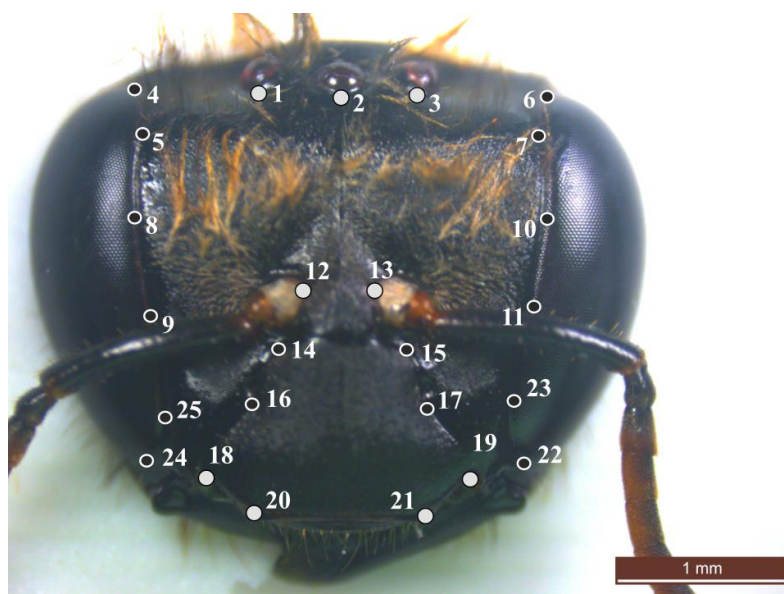


Figure 2. Landmarks (white circles) and semi-landmarks (black circles) in the head of *Melipona subnitida*.

## Results

### ***Variation in head shape***

Principal component analyses revealed differences among the *M. subnitida* populations, indicating that head shape characters are effective in separating populations of this species. The first two principal components explained 69.72%



of the total variation (PCA1 =51.26% and PCA2 =18.46%) (Figure 3). Principal component 1 (PC1) separated the PE and CE populations (positive axis) from the BA and IFN populations (negative axis). Principal component 2 (PC2) separated the PE population from the CE population and the RN population from the PE, BA and IFN populations. However, it did not separate the BA population from the IFN population.

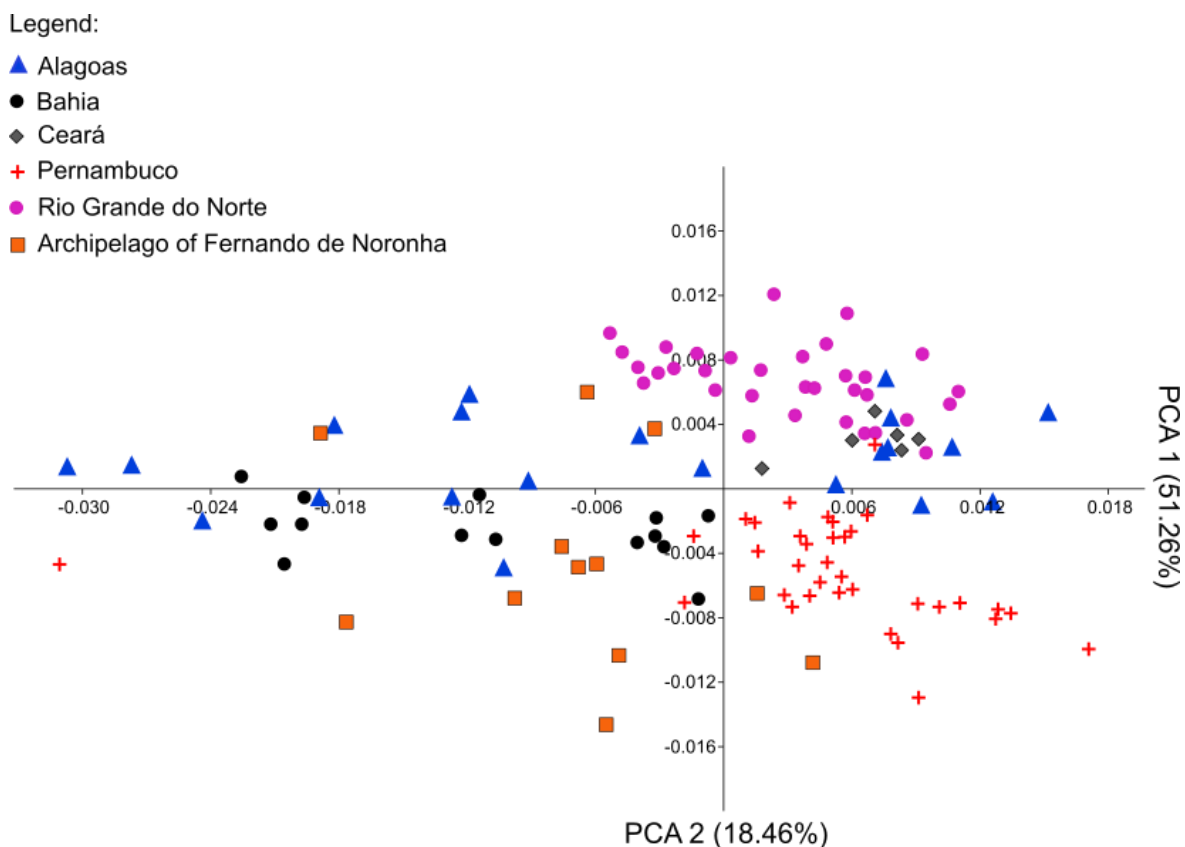


Figure 3. Principal component analysis scatter plot for *Melipona subnitida* populations from the Island of Fernando de Noronha and the Brazilian mainland (represented by five states).

Thin-plate splines for PC1 showed that most of the morphological differentiation was associated with the antennae region, clypeus and extremities of the compound eyes (Figures 4A–B). The individuals located in the positive PC1 showed expansion in the clypeus shape and the lower extremity of the compound eyes, whereas in the negative axis, the opposite was observed. Thin-plate splines for PC2 showed that the higher variation was related to the upper part of the head, especially the ocelli region. The dendrogram generated by UPGMA, based on the

cophenetic correlation coefficient (79%), revealed that the individuals collected on the Island of Fernando de Noronha differed from the populations in mainland natural areas with 100% bootstrap support (Figure 5).

Cross-validation correctly classified 84.55% ( $p < .01$ ) of the individuals into their respective groups, with populations collected in Bahia and Rio Grande do Norte ( $p < .0001$ ) and between Ceará and IFN ( $p < .0001$ ), for which 100% of the individuals were discriminated, being highlighted. The lowest classification accuracy was observed for individuals collected in Alagoas and Ceará (57.14%;  $p < .01$ ) and in Bahia and IFN (57.74%;  $p < .01$ ). The discrimination rate by cross-validation for the comparison between island and mainland locations was 84.9% ( $p < .01$ ). The highest discrimination rates were observed for the comparison with populations from Exu and Fortaleza (100%;  $p < .01$ ); the lowest, with the population from Cumaru (60.41;  $p < .01$ ) (Table 2).

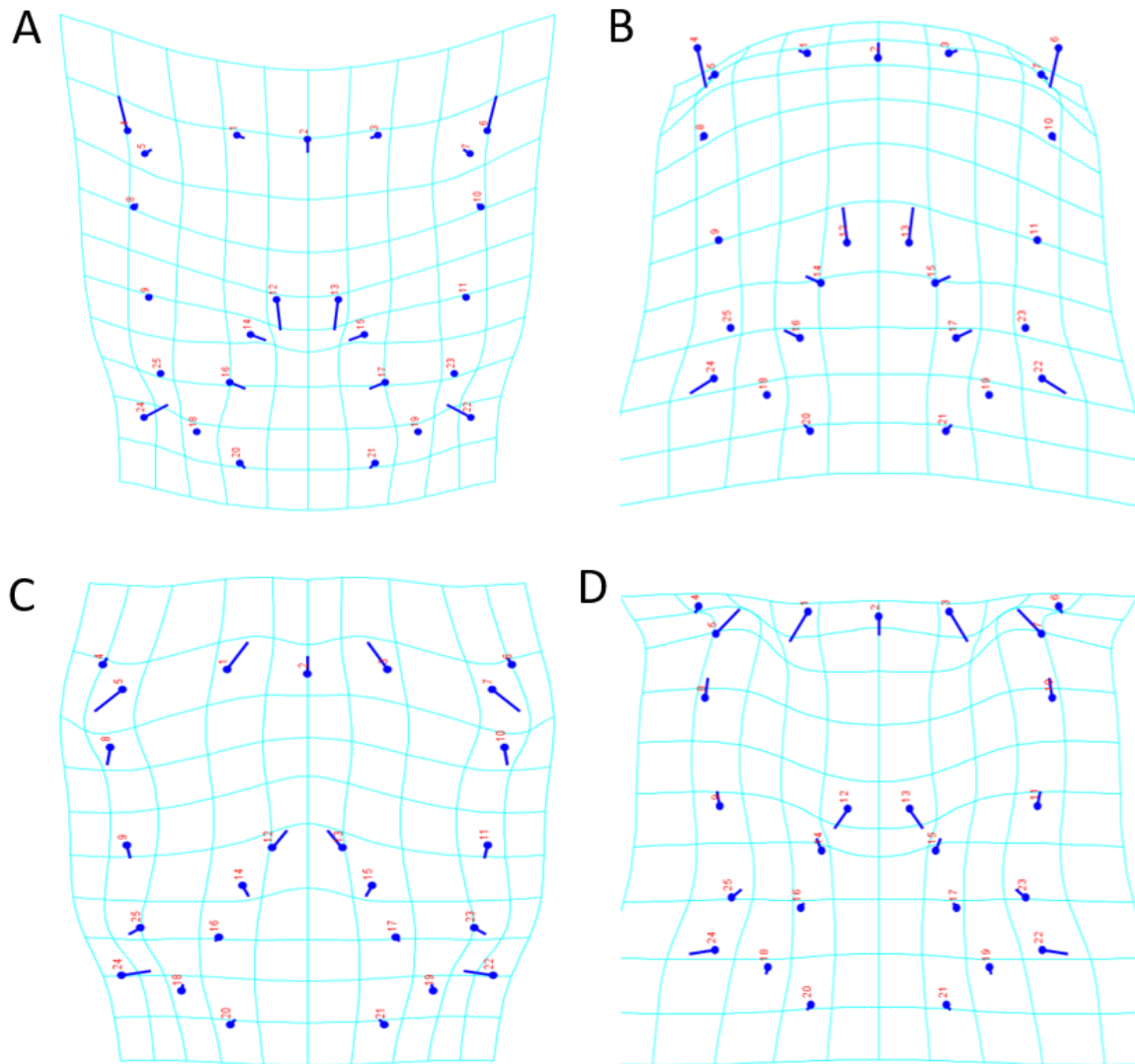


Figure 4. Positive and negative axis thin-plate splines for the first principal component (PC1) (A, B) and the second principal component (PC2) (C, D). Vectors indicate direction and sense of variation for each landmark.

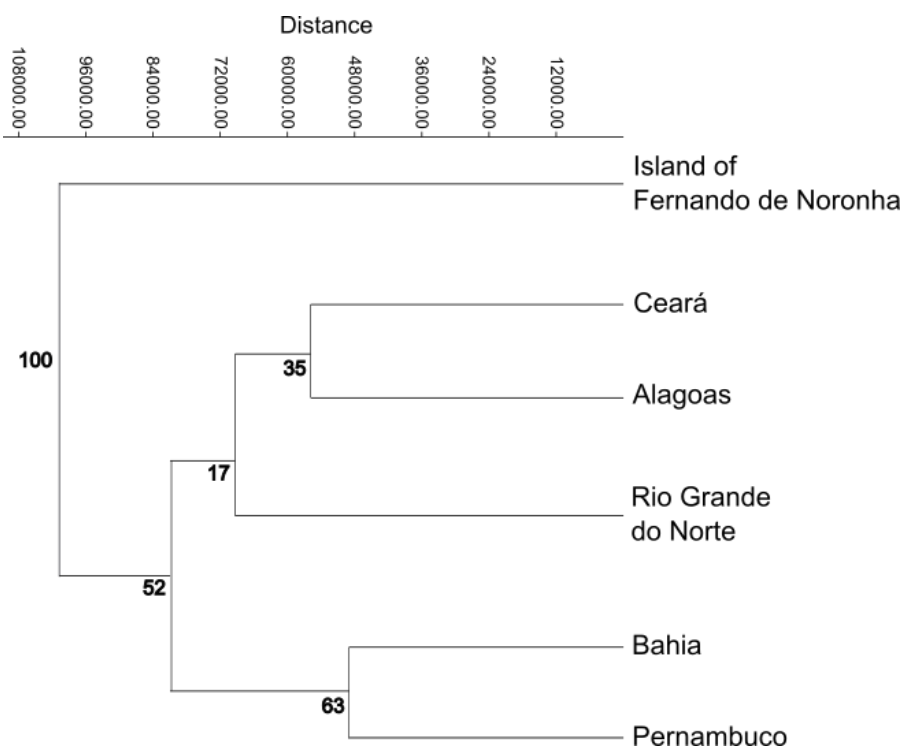


Figure 5. Dendrogram generated by UPGMA for *Melipona subnitida* populations, based on Mahalanobis distances for head shape. Cophenetic correlation coefficient of 79% after 10,000 permutations.

**Table 2.** Percentage cross-validation for the *M. subnitida* population from the Island of Fernando de Noronha compared with mainland populations.

Location	Island of Fernando de Noronha (%)	<i>p</i>
Água Branca (AL)	70.83	$p < 0.01$
Cumarú (PE)	60.41	$p < 0.01$
Exu (PE)	100	$p < 0.01$
Fortaleza (CE)	100	$p < 0.01$
Joá (BA)	91.67	$p < 0.01$
Mata Grande (AL)	79.17	$p < 0.01$
Mossoró (RN)	98.48	$p < 0.01$
Passira (PE)	95.83	$p < 0.01$
Riacho das Almas (PE)	87.50	$p < 0.01$
São José (BA)	87.50	$p < 0.01$
Taquaritinga do Norte (PE)	62.50	$p < 0.01$

### Variation in head size

ANOVA revealed significant differences in head size ( $p < .001$ ). The individuals with larger head sizes were collected in AL and BA. Medium size heads were found in CE, PE and RN, and the smallest head sizes were found in IFN (Figure 6). Significant correlations were observed among the morphometric data, geographical coordinates and altitude ( $p < .01$ ) (Table 3).

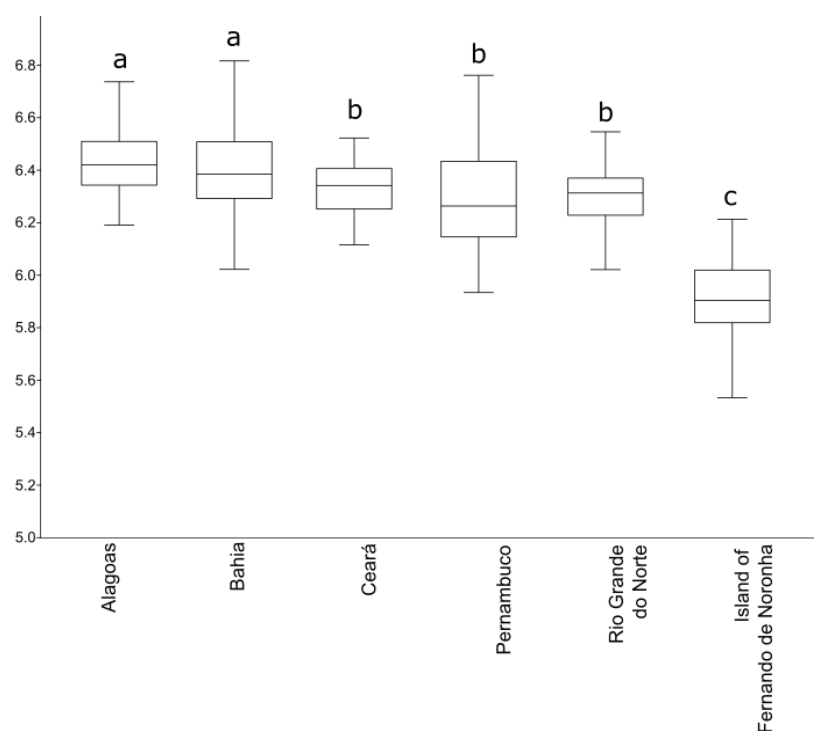


Figure 6. Boxplot for head size, based on centroid size, of *Melipona subnitida*. Different letters indicate statistically significant differences according to the Tukey test.

**Table 3.** Correlations among head shape, head size, altitude and geographical distance, using head measurements of *M. subnitida*.

Matrix comparison	R <sup>2</sup>	P
Shape x Size	0.11179	0.00027263**
Shape x Latitude	-0.12504	0.000046085**
Shape x Longitude	-0.10961	0.00035889**
Shape x Altitude	-0.071507	0.02013*
Size x Latitude	-0.45756	<0.0001**
Size x Longitude	-0.6699	<0.0001**
Size x Altitude	0.27694	<0.0001**

\* $p < .05$ ; \*\* $p < .001$ .

## Discussion

The present study revealed evidence that the head size (smaller) and shape of *M. subnitida* were related to the island effect. This was confirmed by the high discrimination rates shown with cross-validation between the IFN population and the populations from Fortaleza-CE and Mossoró-RN – the original source locations for the island populations – and clustering in an external branch in the dendrogram.

Colonization of a new habitat by a small number of individuals and ecological factors such as limited locations for nesting and vegetation and deficient management practices by the island inhabitants (Ribeiro & Lima, 2015) may play an important part in insular differentiation, especially because *M. subnitida* is an introduced species.

In general, ocean islands may have limited resources (Rivera-Marchand et al., 2012), and environmental differences are more pronounced if the organisms travel from the mainland to the island. Islands tend to have more limited resources, space and predators, which may affect the incoming species (McNab, 1994).

In our results, the Pearson correlation analysis showed that the head shape and size varied with geographical distance and altitude, indicating a gradual distribution of these characters in the geographical space. Lima Júnior, Carvalho, Nunes, and Franco et al. (2015) and Nunes, Pinto, Carneiro, Pereira, and Waldschmidt (2007) also found differences between *Melipona scutellaris* colonies according to the altitude gradient. Lima et al. (2014) and Bonatti et al. (2014) observed similar results for the wings of *M. subnitida* from different mainland populations, indicating that head geometric morphometrics can be used efficiently to detect small variations and to discriminate between groups of bees.

With regard to migration or considering beekeepers influence, Lima et al. (2014) also found formation of different groups along geographical zone across Alagoas, Bahia and Pernambuco, suggesting a lack of genetic flow. Therefore the analyses presented here share with genetic diversity, little or no gene flow occurring naturally (Bonatti et al., 2014) indicating populations of *M. subnitida* are under a differentiation process in mainland.

Although geographic barriers have played an important role, climate change is also an important factor for insects pollinators (Potts et al., 2016). Establishing representative conservation area is essential, thus the predicted loss of suitable habitat projected for the year 2050 for *M. subnitida*, suggest borders of Pernambuco states as one of the best regions for reconnecting the bees environment from now to the future, although the total area suitable for this stingless bee will change a little (Giannini et al., 2017).

Sagonas et al. (2014) analyzed the head morphology of island and mainland lizard populations and also found differences in head shape but not in head size. The smallest head sizes were observed for bees collected in the Island of Fernando de Noronha. Decreases in body size and changes in shape may indicate insular adaptation to limited resources and reduced territorial competition (Lee & Lin, 2012).

The restricted flow between islands and the mainland (geographical barriers) allows inferences about the genetic consequences of isolation and population differentiation (Wang et al., 2007). These consequences are aggravated by the fact that island populations are much more prone to disappearance than mainland populations (White & Searle, 2007). Fragmentation in the distribution of many mainland species due to human activities is worrisome (Haddad et al., 2015; Maués & Oliveira, 2010) because decreases are expected in the diversity of local populations, which also leads to decreases in the capacity to adapt to environmental changes (White & Searle, 2007). The studied population of *M. subnitida* from the Island of Fernando de Noronha is therefore a model for understanding the dynamics of isolated populations in caatinga vegetation fragments.

Isolation, especially in small areas, may lead populations to death due to demographic stochasticity (Shafer, 1981). In addition, lower genetic variability due to the drift effect may cause a loss in adaptive capacity, especially adaptation to environmental changes (Allendorf & Leary, 1986; Nei, Maruyama, & Chakraborty, 1975). The problem of limited food resources may also increase losses rates, due to competition for survival spaces. In the case of *M. subnitida*, this competition is aggravated because the Island of Fernando de Noronha is not the species' place of natural occurrence.

To the best of our knowledge, our study is the first to analyze the effects of isolation of *M. subnitida* on an island and shows that care should be taken with this species and other meliponines due to isolation effects, which may lead to population losses and consequent negative effects on biotic interactions and even on ecosystem stability. Connectivity between habitats and, consequently, between populations is necessary so that bee communities remain abundant and diverse (Steffan-Dewenter & Tschamntke, 1999). Moreover, such connectivity is essential for plant–pollinator interactions in endangered native plant species and economically important crop plants.

## References

- Allendorf, F. W., & Leary, R. F. (1986). Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In M. E. Soulé (Ed.), *Conservation biology: The science of scarcity and diversity* (pp. 57–76). Sunderland, MA: Sinauer.
- Araújo, E. D., Oliveira, R. G., Calazans, H. C. M., França, C. C. S., Santos, V., Jain, S. A., ... Ribeiro, G. T. (2016). Risk of local extinction and genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) in a possible northeastern limit of its distribution in Brazil. *Sociobiology*, 63, 804. doi:10.13102/sociobiology.v63i2.946
- Barour, C., & Baylac, M. (2016). Geometric morphometric discrimination of the three African honey bee subspecies *Apis mellifera intermissa*, *A. m. sahariensis* and *A. m. capensis* (Hymenoptera, Apidae): Fore wing and hind wing landmark configurations. *Journal of Hymenoptera Research*, 52, 61–70. doi:10.3897/jhr.52.8787
- Bonatti, V., Simões, Z. L. P., Franco, F. F., & Franco, T. M. (2014). Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, 101, 17–24. doi:10.1007/s00114-013-1123-5
- Cortopassi-Laurino, M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Roubik, D. W., Dollin, A., Heard, T., Aguilar, I., ... Nogueira-Neto, P. (2006). Global meliponiculture: Challenges and opportunities. *Apidologie*, 37, 275–292. doi:10.1051/apido:2006027
- Giannini, T. C., Costa, W. F., Cordeiro, G. D., Imperatriz-Fonseca, V. L., Saraiva, A. M., Biesmeijer, J., & Garibaldi, L. A. (2017). Projected climate change threatens pollinators and crop production in Brazil. *PLoS One*, 12(8), e0182274. doi:10.1371/journal.pone.0182274



- Grant, P. R., Grant, B. R., & Peetren K. (2001). A population founded by a single pair of individuals: Establishment, expansion, and evolution. *Genetica*, 112–113, 359–382. doi:10.1023/A:1013363032724
- Haddad, N. M., Brudvig, L. A., Clobert, J., Davies, K. F., Gonzalez, A., Holt, R. D., & Townshend, J. R. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances*, 1(2), e1500052. doi:10.1126/sciadv.1500052
- Hamer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9. Retrieved from [https://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf)
- Kerr, W. E., & Cabeda, M. (1985). Introdução de abelhas no território federal de Fernando de Noronha. *A Revista Ciência e Cultura*, 37(3), 467–471.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11, 353–357. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x
- Lee, Y. H., & Lin, C. P. (2012). Morphometric and genetic differentiation of two sibling gossamer-wing damselflies, *Euphaea formosa* and *E. yayeyamana*, and adaptive trait divergence in subtropical East Asian islands. *Journal of Insect Science*, 12, 53. doi:10.1673/031.012.5301
- Lima, C. B. S., Nunes, L. A., Ribeiro, M. F., & Carvalho, C. A. L. (2014). Population structure of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) at the southern limit of its distribution based on geometric morphometrics of forewings. *Sociobiology*, 61, 478–482. doi:10.13102/sociobiology.v61i4.478-482
- Lima Júnior, C. A., Carvalho, C. A. L., Nunes, L. A., & Franco, T. M. (2012). Population divergence of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Meliponina) in two restricted areas in Bahia, Brazil. *Sociobiology*, 59, 107–122. Retrieved from <http://periodicos.uefs.br/index.php/sociobiology/article/view/670>
- Lima Júnior, C. A., Carvalho, C. A. L., Nunes, L. A., & Santos, W. S. (2015). Variação morfométrica entre populações disjuntas de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Interciência (Caracas)*, 40, 324–329. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33937066006.pdf>
- Lomolino, M. V., Riddle, B. R., & Brown, J. H. (2005). *Biogeography* (3rd ed.). Sunderland, MA: Sinauer.
- Maués, M. M., & Oliveira, P. E. A. M. (2010). Consequências da fragmentação do habitat na ecologia reprodutiva de espécies arbóreas em florestas tropicais, com ênfase na amazônia. *Oecologia Australis*, 14(1), 238–250. doi:10.4257/oeco.2010.1401.14
- McNab, B. K. (1994) Energy conservation and the evolution of flightlessness in birds. *The American Naturalist*, 144, 628–642. doi:10.1086/285697

- Millien, V. (2006). Morphological evolution is accelerated among island mammals. *PLoS Biology*, 4(10), 1863–1868. doi:10.1371/journal.pbio.0040321
- Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1–10. doi:10.2307/2407137
- Nosil, P., Funk, D. J., & Ortiz-Barrientos, D. (2009). Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, 18, 375–402. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03946.x
- Nunes, L. A., Passos, G. B., Carvalho, C. A. L., & Araújo, E. D. (2013). Size and shape in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera; Meliponini). *Brazilian Journal of Biology*, 73, 887–893. doi:10.1590/S1519-69842013000400027
- Nunes, L. A., Pinto, M. F. F. C., Carneiro, P., Pereira, D. G., & Waldschmidt, A. M. (2007). Divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. *Journal of Biosciences*, 23, 1–9. Retrieved from <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6798>
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., ... Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human wellbeing. *Nature*, 540(7632), 220–229. doi:10.1038/nature20588
- Prado-Silva, A., Nunes, L. A., de Oliveira, A. R. M., Carneiro, P. L. S., & Waldschmidt, A. M. (2016). Variation of fore wing shape in *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera, Meliponini) along its geographic range. *Journal of Hymenoptera Research*, 48, 85–94. doi:10.3897/JHR.48.6619
- Ribeiro, M. F., & Lima, C. B. S. (2015). Avaliação da criação de abelhas-sem-ferrão em Fernando de Noronha após 30 anos de sua introdução. *Magistra*, 27, 484–492. Retrieved from <https://magistraonline.ufrb.edu.br/index.php/magistra/article/view/416>
- Rivera-Marchand, B., Oskay, D., & Giray, T. (2012). Gentle Africanized bees on an oceanic island. *Evolutionary Applications*, 5, 746–756. doi:10.1111/j.1752-4571.2012.00252.x
- Rohlf, F. J. (2015). *tpsDig2, digitize landmarks and outlines* (version 2.19). Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.
- Roughgarden, J. (1995). *Anolis lizards of the Caribbean: Ecology, evolution, and plate tectonics*. Oxford: Oxford University Press.
- Sagonas, K., Pafilis, P., Lymberakis, P., Donihue, C. M., Herrel, A., & Valakos, E. D. (2014). Insularity affects head morphology, bite force and diet in a Mediterranean lizard. *Biological Journal of Linnean Society of London*, 112, 469–484. doi:10.1111/bij.12290

Schwartz, A., & Henderson, R. W. (1991). *Amphibians and reptiles of the West Indies: Descriptions, distributions, and natural history*. Gainesville, FL: University of Florida Press.

Shafer, M. L. (1981) Minimum population sizes for species conservation. *Bioscience*, 31, 131–134. doi:10.2307/1308256

Sousa, A. R. S., Araujo, E. D., Gramacho, K. P., & Nunes, L. A. (2016). Bee's morphometrics and behavior in response to seasonal effects from ecoregions. *Genetics and Molecular Research*, 15, 1–2. doi:10.4238/gmr.15027597

Souza, D. A., Wang, Y., Kaftanoglu, O., De Jong, D., Amdam, G. V., Gonçalves, L. S., & Francoy, T. M. (2015). Morphometric identification of queens, workers and intermediates in *in vitro* reared honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 10(4), e0123663. doi:10.1371/journal.pone.0123663

Spurgin, L. G., Illera, J. C., Jorgensen, T. H., Dawson, D. A., & Richardson, D. S. (2014). Genetic and phenotypic divergence in an island bird: Isolation by distance, by colonization or by adaptation? *Molecular Ecology*, 23, 1028–1039. doi:10.1111/mec.12672

Steffan-Dewenter, I., & Tscharntke, T. (1999). Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia*, 121(3), 432–440. doi:10.1007/s004420050949

van Valen, L. (1973). Body size and the number of plants and animals. *Evolution*, 27, 27–35. doi:10.1111/j.1558-5646.1973.tb05914.x

Wang, S., Zhu, W., Gao, X., Li, X., Yan, S., Liu, X., ... Li, Y. (2014). Population size and time since island isolation determine genetic diversity loss in insular frog populations. *Molecular Ecology*, 23, 637–648. doi:10.1111/mec.12634

White, T. A., & Searle, J. B. (2007). Genetic diversity and population size: Island populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *Molecular Ecology*, 16, 2005–2016. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03296.x

**ARTIGO 2****OCCURRENCE OF DEFORMED WING VIRUS VARIANTS IN THE  
STINGLESS BEE *Melipona subnitida* AND HONEY BEE *Apis  
mellifera* POPULATIONS IN BRAZIL<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup>Artigo publicado no periódico *Journal of General Virology* (ISSN 0022-1317), v.100, n.2, p. 289-294, 2019. DOI: 10.1099/jgv.0.001206.

## Occurrence of deformed wing virus variants in the stingless bee *Melipona subnitida* and honey bee *Apis mellifera* populations in Brazil

**Abbreviation:** DWV, deformed wing virus.

One supplementary figure and one supplementary table are available with the online version of this article.

**Abstract:** The global spread of the parasitic *Varroa* mite has introduced a new bee to the bee horizontal transmission route for several RNA viruses that bypasses existing barriers in honey bees. From among these viruses, deformed wing virus (DWV) is now among the most widespread insect pathogens in the world. Brazilian stingless bees are a diverse group often managed in close proximity to honey bees. Therefore, we investigated the prevalence and load of DWV in 21 stingless bee (*Melipona subnitida*) and 26 honey bee (*Apis mellifera*) colonies from Brazil. DWV was detected in all colonies with DWV-A and DWV-C dominating in *M. subnitida*, while DWV-A dominated in *A. mellifera*. Average total viral loads per bee were  $8.8E+07$  and  $6.3E+07$  in *M. subnitida* and *A. mellifera*, respectively, which are much lower than DWV levels ( $>1E+10$ ) found in honey bees in the northern hemisphere. In colonies introduced 30 years ago to the remote island of Fernando de Noronha, the DWV load was low ( $<1E+03$ ) in honey bees but we detected higher loads ( $1.6E+08$ ) in all *M. subnitida* colonies on the island. This may suggest that minimal, if any, viral transmission of DWV from stingless bees to honey bees has occurred on this island. Furthermore, the ubiquitous presence of the DWV-C variant in *M. subnitida* colonies, and its rarity in *A. mellifera*, may again suggest that limited viral exchange between these two species is occurring.

**Keywords:** cross-species transmission; *Varroa*; viral types.

## INTRODUCTION

The stingless bees (Apidae: Meliponini) are the most diverse group of eusocial bees, comprising more than 400 species contained within 60 genera [1]. The majority of species occur in the neo-tropics with colonies typically containing 200–2000 adults and a perennial life cycle [2]. Many species, particularly the large *Melipona* species, have a long association with humans that harvest their highly prized honey [3] but they are also responsible for pollinating 40–90% of the native flora in some Brazilian regions [4]. The stingless bee, *M. subnitida*, is a swarm founding species, brood development takes around 40 days and workers survive for a few months. This species is endemic to the dryland–shrub forest ‘Caatinga biome’ found in NE Brazil and is the typical stingless bee maintained by beekeepers throughout the region, which helps towards the conservation of local biodiversity as well as providing extra income to the beekeepers [3].

Brazil has a long history of managing honey bees (*Apis mellifera*) originally imported from Europe but, in 1957, 26 colonies of imported African *A. m. scutellata* escaped quarantine and spread throughout Brazil, hybridizing with existing honeybees to form the Africanized honey bee [5]. However, when in 1971 the parasitic *Varroa* (*Varroa destructor*) mite arrived in Brazil [6], the Africanized honey bees were naturally tolerant to the mite whereas the European honeybees suffered large-scale losses. The death of mite-infested colonies is often associated with the presence of several viral pathogens [7], of which deformed wing virus (DWV) has become the most prevalent in *Varroa*-infested honey bee colonies [8–11].

Although *Varroa* is a parasite of only honey bees, it increases DWV levels via viral transmission during feeding [12], which can spill over into other species of bees and wasps that share the same environment [13]. In part, this could explain why DWV has been detected in a wide range of non-*Apis* insects [14–17] and has even been detected in pollen [18]. However, DWV may also be a generalist insect virus and not a honey bee-specific pathogen, with the effect of *Varroa* being to raise the DWV loads across the pollinator community [13]. The impact of DWV on these hosts remains unknown [19], although there is growing concern [17, 20–22].

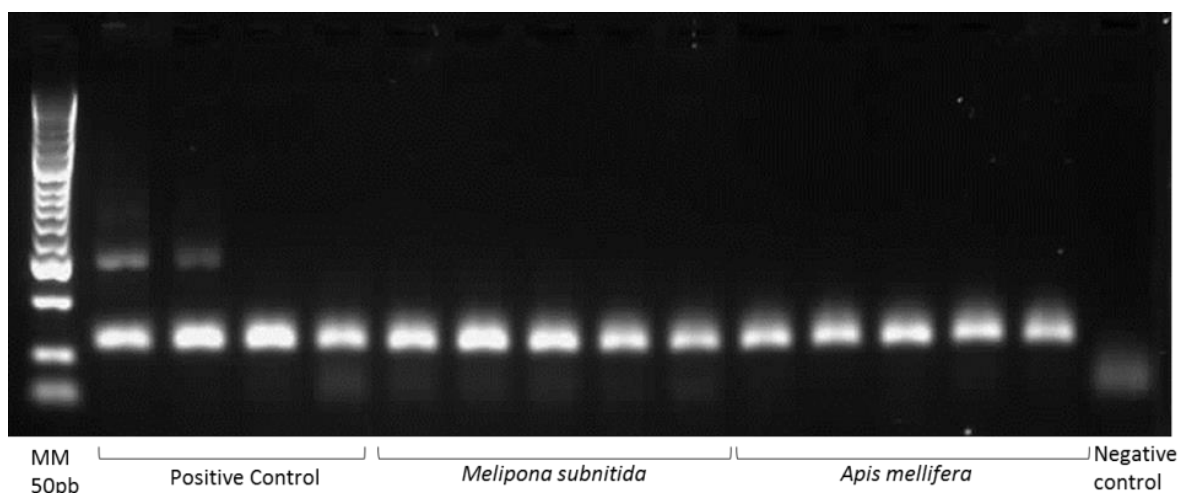
Based on consistent variations in both the nucleotide and amino acid sequences of the polyprotein-encoding region, DWV has now been split into three master-variants: types A, B (formally called Varroa destructor virus 1) and C [23]. Types B and C share 79% nucleotide identity and 89% identity in amino acid sequences with the A type. On the other hand, types B and C share 79% in their nucleotide identity and 90% identity in their amino acid sequences [23]. In South America, DWV was first detected in 2005 in Uruguay [24] and Brazil in 2007 [25]. Therefore, there have been ample opportunities for cross-species infections to occur, especially since both honey bees and stingless bees are often managed in close proximity, especially on the remote island of Fernando de Noronha.

However, despite the importance of stingless bees, relative to honey bees (*Apis* spp.) very little is known about their pests and pathogens. Therefore, the aim of this study was to evaluate the prevalence and viral load from three described DWV master-variants (A, B, and C) across a population of stingless bee (*Melipona subnitida*) and Africanized honey bees from Brazil.

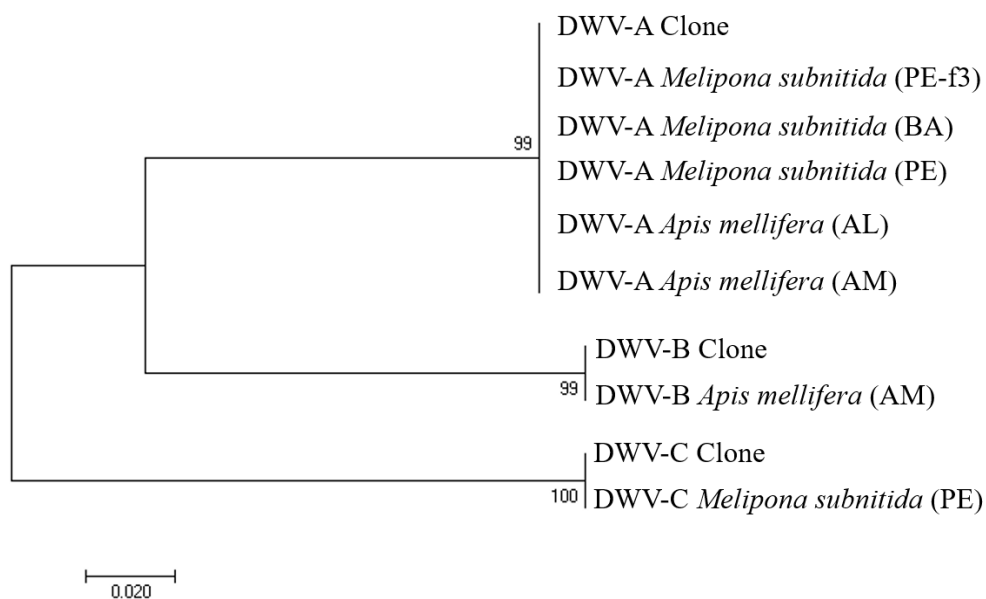
## RESULTS

### Prevalence of DWV

We detected DWV in each sample of *M. subnitida* and *A. mellifera*. Negative controls indicated that no contamination had occurred in any of the runs. Furthermore, the housekeeping gene indicated that all samples contained intact RNA (Fig. 1) and the sequences from both *M. subnitida* and *A. mellifera* aligned with the controls for each DWV master-variant (Fig. 2). The average Ct values indicated more  $\beta$ -actin in the *A. mellifera* samples ( $19.7\text{Ct}\pm 1.91$  S.D.) relative to those from *M. subnitida* ( $23.5\text{ Ct}\pm 0.70$  S.D.).



**Fig. 1.** Typical gel showing the presence of  $\beta$ -actin in all samples of *M. subnitida*, *A. mellifera* and positive controls, confirming that the samples contained intact RNA.

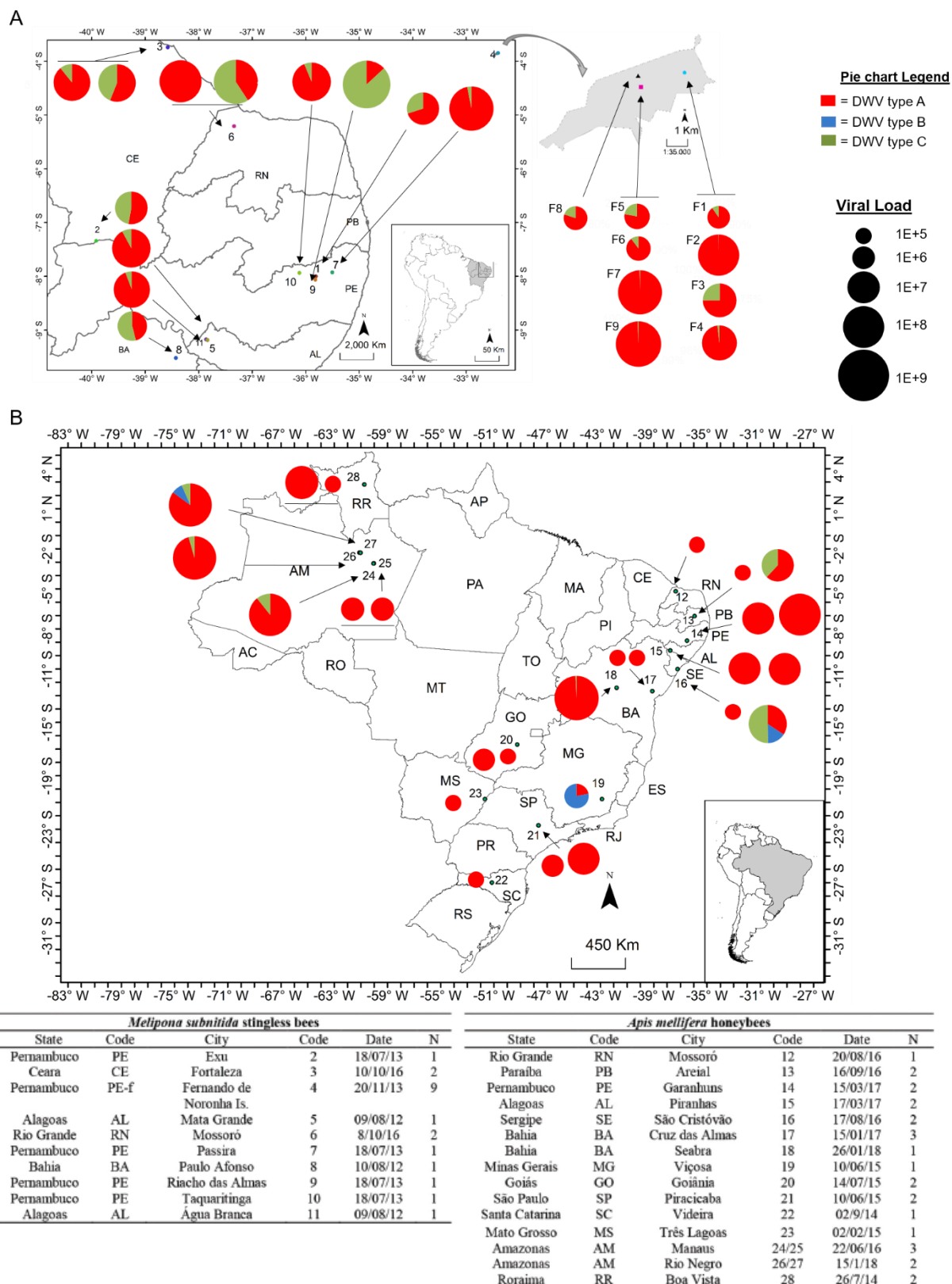


**Fig. 2.** A bootstrapped neighbour-joining tree summarizing relationships of the DWV variants A, B and C in *M. subnitida* and *A. mellifera* from Brazil (this study) against control sequences for each strain derived from *A. mellifera* in the UK [23]. The numbers indicate the collection location of the sequenced samples. The tree was inferred from nucleotide sequences (Fig. S1, is available in the online version of this article) that are based on a 98 bp section of the RdRp gene of which the number of nucleotide differences between DWV-A and DWV-B is 16, with 20 between DWV-A and DWV-C and 21 between DWV-B and DWV-C.

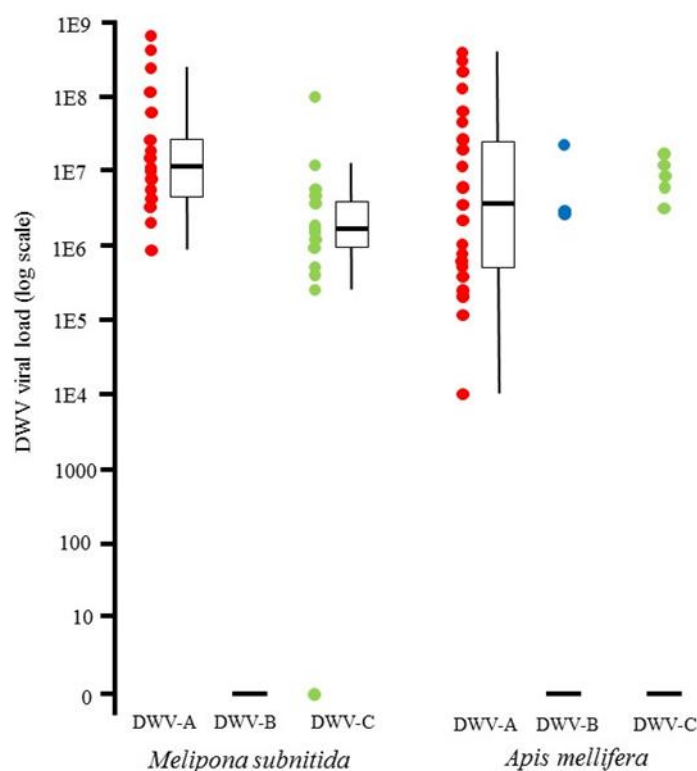


## DWV viral loads

The A and C master-variants were detected in the *M. subnitida* population only (Fig. 3). The DWV-A variant was dominant in 78% of the colonies (Fig. 3), with the C-variant dominating the remaining 22%. On the other hand, in *A. mellifera* 92% of colonies were dominated by the A variant and only one colony (4%) each was dominated by either the B or C variant. The DWV-B variant was quantifiable in only three *A. mellifera* colonies (Figs 3, 4), while DWV-C was quantifiable in only five (Figs 3, 4). The total estimated DWV viral load detected per bee averaged  $3.6E+07$  and  $6.3E+07$  in *M. subnitida* and *A. mellifera*, respectively, on the Brazilian mainland. However, on Fernando de Noronha, where the honey bees are heavily infested with *Varroa destructor* mites, a previous study [26] found that DWV loads remained at borderline levels of detection ( $\sim 1E+03$ ) in these honey bees. In contrast, the *M. subnitida* colonies were dominated by both DWV-A and DWV-C variants with an average viral load per bee of  $1.6E+08$ , which is many orders of magnitude higher than for the honey bees on the island.



**Fig. 3.** Proportion and viral load of DWV-A (red), B (blue) and C (green) variants detected in each colony of either A) *Melipona subnitida* or B) *Apis mellifera* from across Brazil. The collection dates, location and number of colonies sampled from each location throughout Brazil are given in the table. Each colony sample consisted of ~30 individual bees, of which 10 bee heads were pooled from each colony for RNA extraction.



**Fig. 4.** A box plot alongside the individual data showing the mean viral load (log scale) for each DWV master-variant detected in the 21 *M. subnitida* and 26 *A. mellifera* colonies collected from Brazil. Each colony sample consisted of a pool of ten bee heads. Type A=red, type B=blue and type C=green.

## DISCUSSION

This study indicates that DWV is prevalent in the stingless bee, *M. subnitida*, but was not detected in other species from this genus, including *M. quadrifasciata*, *M. torrida* [27] and *M. scutellaris* [28]. However, DWV has previously been found in the stingless bees *Scaptotrigona mexicana* from Mexico [29] and *Tetragonisca fiebrigi* from Argentina [27].

The high prevalence of DWV in *A. mellifera* was expected, since DWV is consistently the most prevalent viral pathogen of European and Africanized honey bees [11].

The A type was also the dominant form of DWV in 23 individual bees sampled from Cruz das Almas, Bahia, NE Brazil, as well as in the pooled bee samples in this study [26]. Outside of Brazil, a comprehensive study using 168

DWV transcriptomes deposited in public databases also found the A type to be more abundant than the B type in all but two cases [30], which mirrors the situation found in US honey bees in 2010 [31]. Although type B appears to be replacing type A in the USA [31], and is common in Europe [32], it was detected in any quantity in only three colonies in this study (Fig. 3). This is despite the likely long-term infection of both stingless and honey bees in Brazil. The rarely detected C variant [31, 33] was present in almost all the *M. subnitida* colonies but only in five of the 26 honey bee colonies.

Interestingly, on the remote island of Fernando de Noronha, where both *M. subnitida* and *A. mellifera* were artificially introduced in the mid-1980s [34, 35] and have been maintained in close proximity over the past 34 years, DWV-A dominated all nine *M. subnitida* colonies with a mean viral load of  $1.6E+08$ . On the other hand, the European honey bees on this island have very low ( $\sim 1E+03$ ) viral loads and a diverse range of DWV variants [36]. This provides further evidence that DWV may be a general hymenopteran or insect virus rather than a honey bee pathogen that has spilled over into the pollinator community. Again, the ubiquitous presence of the DWV-C variant in *M. subnitida* colonies and rarity in *A. mellifera* colonies on the mainland may suggest limited viral exchange between these two species. The chance of transmission between species may be reduced due to the low DWV viral loads, per bee, present in both the stingless ( $8.83E+07$ ) and honey bees ( $6.25E+07$ ) investigated in this study (Figs 3, 4), relative to those found in asymptomatic ( $2.4E+09$ ) and symptomatic ( $6.9E+11$ ) European honey bees [37]. When these high DWV loads are present in honey bees, DWV was found to appear in neighbouring wasps and solitary bees [13]. The low DWV loads in the Brazilian honey bees relative to those in the northern hemisphere could be linked with their ability to tolerate the Varroa mite, or possibly being better adapted to maintaining lower levels of viraemia.

## METHODS

### Samples

Pools of 30 *M. subnitida* workers were collected directly at the entrance of 24 colonies from meliponaries at ten different locations across the NE Brazil (Fig.

3), which covers the natural distribution of this species. In addition, pools of ten *M. subnitida* workers from nine colonies located on the remote oceanic island of Fernando de Noronha were collected in November 2013 using the same method. These latter samples are interesting, since this population was originally established from 30 colonies brought to the island in 1983 from the mainland states of Ceará and Rio Grande do Norte [34]. Also, in 1984 a small population of European honey bees established on Fernando de Noronha [34] were accidentally infested by the Varroa mite, although the typically high levels of DWV were not present in either the honey bees or Varroa [35].

In addition, pools of 30 healthy Africanized honey bee adult workers were collected from the brood area of 26 colonies across Brazil (Fig. 3). All samples were collected in absolute ethanol and stored at -20 °C, before transportation in liquid nitrogen using a Vapour shipper to the UK for analysis.

### **Detection and quantification of DWV variants**

Total RNA was extracted from a pool of ten heads per colony for both stingless and honey bees. DWV types A and B are both known to replicate in the heads of asymptomatic honey bees [38] as well as in their bodies (thorax + abdomen), and this was supported by ref. [39] which also found both types in the heads and bodies. Furthermore, honey bee head extracts were successfully used to conduct a survey of DWV in 1104 bee colonies from Germany [8]. All the foregoing studies, including the current one, used either column-based extraction kits (RNeasy, Qiagen, Germany) or a purification step. This is required since when RNA is extracted from honey bee heads using Trizol, pigments from the eye can inhibit the PCR reaction resulting in false-negative results [40]. The heads were ground in liquid nitrogen into a fine homogeneous powder and RNA was extracted from a 30 mg sub-sample using the RNeasy mini kit (Qiagen), which was enhanced using a QIAshredder kit (Qiagen) for the *M. subnitida* samples [41]. Nanodrop (8000 series, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) quantification was used to standardize the amounts of total RNA to 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  using RNase free water, before storage at -80 °C.

In order to quantify the viral load of each DWV master-variant we used a recently developed method [33]. Briefly, cDNA was synthesized using a one-step SensiFAST SYBR No ROX One-step kit (Bioline, London); the reactions contained 1  $\mu\text{l}$  RNA at a concentration of 50 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  per sample, 10  $\mu\text{l}$  SensiFAST mix, 0.2  $\mu\text{l}$  reverse transcriptase, 0.4  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor, 0.75 pmol of each primer [DWV F and R-Types A, B and C (Table S1)] and 7.5  $\mu\text{l}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ . Reactions were run on a Rotor-Gene Q Thermocycler (Qiagen) with an initial reverse transcription stage at 45 °C for 10 min and a denaturation step of 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of denaturation for 15 s at 95 °C, annealing for 15 s at 58 °C for primers A and B and 61.5 °C for primer C, and extension for 15 s at 72 °C. A final dissociation melt curve was performed at 72–90 °C, in 0.5 °C increments, each with a 90 s hold. The melt curve was used to ensure that a single targeted product was amplified and that no contamination was present in either the reverse transcription negative controls or the no-template controls. A selection of PCR products from both stingless and honey bees were verified by sequencing and aligned against DWV type A, B and C sequences from UK honey bees [33]. The multiple alignment file (Fig. S1) was analysed with MEGA v7.0 software [42] to build a bootstrapped neighbour-joining tree [43] to confirm the identity of the three DWV variants. The threshold cycle (Ct) value was determined for each sample using the Rotor-Gene Q Series Analysis software (Qiagen), and viral quantification was done using serial dilutions of the standard DWV RNA, ranging from 1E+03 to 1E+08 copies of DWV per reaction. All samples were run in triplicate and the average taken. Those samples with a standard deviation of  $\geq 3$  Ct were repeated. Furthermore, PCR products were run on a 2% agarose gel stained with 0.001% GelRed to confirm that bands of the correct size had been amplified. A control housekeeping gene b-actin [37] was also run to ensure that no degradation of the samples had occurred, due to the great distances over which these samples were transported, both within and between countries. Genome equivalents per bee were calculated per sample using the following equation:

$$\begin{aligned} \text{Genome equivalents} &= (\text{average copy number}) \\ &\quad \times (\text{RNA dilution factor}) \\ &\quad \times (\text{elution volume of RNA}) \\ &\quad \times (\text{proportion of bee material}) \end{aligned}$$

## References

1. **Rasmussen C, Cameron SA.** Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol J Linn Soc Lond* 2010; 99: 206–232.
2. **Wille A.** Biology of the stingless bees. *Annu Rev Entomol* 1983; 28:41–64.
3. **Jaffé R, Pope N, Torres Carvalho A, Madureira Maia U, Blochtein B et al.** Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. *PLoS One* 2015;10:e0121157.
4. **Nascimento VA, Matusita SH, Kerr WE.** Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. *Genet Mol Biol* 2000;23:79–81.
5. **Winston ML.** *Killer Bees: The Africanized Honeybee in The Americas.* Cambridge, Mass: Harvard University Press; 1992: ISBN 0-674-50353-8.
6. **De Jong D, Goncalves LS, Morse RA.** Dependence on climate of the virulence of *Varroa destructor*. *Bee World* 1984;65:117–121.
7. **McMenamin AJ, Genersch E.** Honey bee colony losses and associated viruses. *Curr Opin Insect Sci* 2015;8:121–129.
8. **Genersch E, von Der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C et al.** The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 2010;41:332–352.
9. **Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE et al.** Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 2012;336:1304–1306.
10. **Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, Moore JD, Bull JC et al.** A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004230.
11. **Wilfert L, Long G, Leggett HC, Schmid-Hempel P, Butlin R et al.** Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science* 2016;351:594–597.
12. **Nazzi F, Le Conte Y.** Ecology of *Varroa destructor*, the major Ectoparasite of the Western honey bee, *Apis mellifera*. *Annu Rev Entomol* 2016;61:417–432.
13. **Santamaria J, Villalobos EM, Brettell LE, Nikaido S, Graham JR et al.** Evidence of *Varroa*-mediated deformed wing virus spillover in Hawaii. *J Invertebr Pathol* 2018;151:126–130.
14. **Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, Holmes EC, Ostiguy N et al.** RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-Taxa virus transmission via pollen and

potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS One* 2010;5:e14357–16.

15. **Evison SE, Roberts KE, Laurenson L, Pietravalle S, Hui J et al.** Pervasiveness of parasites in pollinators. *PLoS One* 2012;7:e30641.

16. **Levitt AL, Singh R, Cox-Foster DL, Rajotte E, Hoover K et al.** Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods. *Virus Res* 2013;176:232–240.

17. **Manley R, Boots M, Wilfert L.** Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *J Appl Ecol* 2015;52:331–340.

18. **Mazzei M, Carrozza ML, Luisi E, Forzan M, Giusti M et al.** Infectivity of DWV associated to flower pollen: experimental evidence of a horizontal transmission route. *PLoS One* 2014;9:e113448.

19. **Tehel A, Brown MJ, Paxton RJ.** Impact of managed honey bee viruses on wild bees. *Curr Opin Virol* 2016;19:16–22.

20. **Li J, Peng W, Wu J, Strange JP, Boncristiani H et al.** Cross-species infection of deformed wing virus poses a new threat to pollinator conservation. *J Econ Entomol* 2011;104:732–739.

21. **Fürst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ, Brown MJ.** Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 2014;506:364–366.

22. **Graystock P, Goulson D, Hughes WO.** Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proc Biol Sci* 2015;282:20151371.

23. **Mordecai GJ, Wilfert L, Martin SJ, Jones IM, Schroeder DC.** Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the deformed wing virus quasispecies. *Isme J* 2016;10:1264–1273.

24. **Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P.** Honeybee viruses in Uruguay. *J Invertebr Pathol* 2006;93:67–70.

25. **Teixeira EW, Chen Y, Message D, Pettis J, Evans JD.** Virus infections in Brazilian honey bees. *J Invertebr Pathol* 2008;99:117–119.

26. **Brettell LE, Mordecai GJ, Schroeder DC, Jones IM, da Silva JR et al.** A comparison of deformed wing virus in deformed and asymptomatic honey bees. *Insects* 2017;8:28.

27. **Alvarez LJ, Reynaldi FJ, Ramello PJ, Garcia MLG, Sguazza GH et al.** Detection of honey bee viruses in Argentinian stingless bees (Hymenoptera: Apidae) *Insect. Soc* 2017;65:191–197.



28. **Ueira-Vieira C, Almeida LO, De Almeida FC, Amaral IMR, Brandeburgo MAM et al.** Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. *Apidologie* 2015;46:628–630.
29. **Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Anguiano-Baez R, Correa-Benítez A, Castañeda-Cervantes E et al.** First detection of honey bee viruses in stingless bees in North America. *J Apic Res* 2015;54:93–95.
30. **Cornman RS.** Relative abundance of deformed wing virus, Varroa destructor virus 1, and their recombinants in honey bees (*Apis mellifera*) assessed by kmer analysis of public RNA-Seq data. *J Invertebr Pathol* 2017;149:44–50.
31. **Ryabov EV, Childers AK, Chen Y, Madella S, Nessa A et al.** Recent spread of Varroa destructor virus-1, a honey bee pathogen, in the United States. *Sci Rep* 2017;7:17447.
32. **McMahon DP, Natsopoulou ME, Doublet V, Fürst M, Weging S et al.** Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proc Biol Sci* 2016;283:20160811.
33. **Kevill JL, Highfield A, Mordecai GJ, Martin SJ, Schroeder DC.** ABC assay: method development and application to quantify the role of three DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees. *Viruses* 2017;9:314.
34. **Kerr WE, Cabeda M.** Introdução de abelhas no território federal de Fernando de Noronha. *Rev of Ciencia e Cultura* 1985;37:467–471.
35. **De Jong D, Soares A.** An isolated population of Italian bees that has survived *Varroa jacobsoni* infestation without treatment for over 12 years. *Am. Bee J* 1997;137:742–747.
36. **Brettell LE, Martin SJ.** Oldest Varroa tolerant honey bee population provides insight into the origins of the global decline of honey bees. *Sci Rep* 2017;7:45953.
37. **Highfield AC, El Nagar A, Mackinder LC, Noël LM, Hall MJ et al.** Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:7212–7220.
38. **Zioni N, Soroker V, Chejanovsky N.** Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. *Virology* 2011;417:106–112.
39. **Kevill JL.** The role of resistance to *Varroa destructor* and Deformed wing virus in the European honey bee (*Apis mellifera*). PhD Thesis. Manchester UK: University of Salford; 2018. pp. 232.
40. **Boncristiani H, Li J, Evans JD, Pettis J, Chen Y.** Scientific note on PCR inhibitors in the compound eyes of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie* 2011;42:457–460.
41. **Forsgren E, Locke B, Semberg E, Laugen AT, Miranda JR.** Sample preservation, transport and processing strategies for honeybee RNA extraction:

Influence on RNA yield, quality, target quantification and data normalization. *J Virol Methods* 2017;246:81–89.

42. **Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870–1874.

43. **Saitou N, Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível verificar a diversidade morfológica entre as populações de *M. subnitida* introduzidas na Ilha de Fernando de Noronha e nas populações continentais.

Os resultados indicam que as modificações na forma e tamanho (menor) da cabeça em *M. subnitida* estão relacionados ao efeito ilha. Bem como, esses caracteres variaram com a distância geográfica e a altitude, indicando uma distribuição gradual desses caracteres no espaço geográfico do continente.

Os efeitos do isolamento de *M. subnitida* na ilha mostram que cuidados devem ser tomados com esta espécie e outros meliponíneos quanto aos efeitos de isolamento, perdas populacionais e consequentes efeitos negativos nas interações bióticas do ecossistema, diante dos resultados que uma restrição de fluxo gênico já ocorre entre as populações em sua área de distribuição natural.

Nos estudos moleculares, a presença do vírus DWV em *M. subnitida*, abelha sem ferrão e nativa do Brasil, amplia as considerações de que este vírus não é específico de *Apis*, mas sim um vírus comum a insetos, tendo sua propagação ocorrido de forma oportunista, associada ao ácaro *Varroa*, como um eficiente vetor viral nas abelhas *A. mellifera*.

Este projeto promoveu interessantes resultados acerca da distribuição do vírus DWV e suas variantes mestras (quasiespécies) em espécies do Brasil. Para *M. subnitida*, ocorrendo apenas as variantes DWV-A e DWV-C. Para *A. mellifera*, ocorrendo a presença das 3 variantes (inclusive DWV-B), sendo o tipo A em maiores concentrações.

A presença do DWV-C em *M. subnitida*, e muitas vezes sua dominância em algumas localidades, contrasta com a prevalência viral na espécie *A. mellifera*, sugerindo que diferentes variantes do DWV podem variar a depender do hospedeiro e sua susceptibilidade.

As baixas cargas de DWV na abelha *A. mellifera* em relação às do hemisfério norte podem estar ligadas à sua capacidade em tolerar o ácaro *Varroa*, ou possivelmente adaptadas a manter os níveis virais baixos. Não obstante, a preocupação dos efeitos do DWV em espécies de abelhas brasileiras, faz-se

necessário também enfatizar a importância da conservação dos biomas, do manejo sustentável das abelhas e do controle sobre o uso de pesticidas, para a conservação e manutenção das espécies.

Um dos principais desafios para os futuros programas de pesquisa é continuar a rastrear o vírus DWV, acompanhando sua evolução e impactos que cada variante (já descritas ou emergentes) têm sobre os vários hospedeiros de insetos (MARTIN e BRETTELL, 2019).

Adicionalmente aos capítulos apresentados, também participei do estudo intitulado “DWV-A Lethal to Honey Bees (*Apis mellifera*): A Colony Level Survey of DWV Variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 States across the US”, publicado no periódico científico *Viruses* (ISSN 1999-4915) (DOI:10.3390/v11050426), cujo objetivo foi investigar a prevalência sazonal, a carga viral e mudanças na distribuição das três principais variantes do DWV (DWV-A, -B e -C) dentro das colônias de abelhas da Inglaterra, País de Gales e 32 estados nos Estados Unidos. Alcançando como principais resultados a relação de prevalência e alta carga viral do DWV-A em colônias que morreram nos Estados Unidos quando comparadas às colônias sobreviventes. Enquanto que na Inglaterra e no País de Gales, a prevalência e dominância do DWV-B coincidiu com baixas perdas de colônias durante o inverno, corroborando a letalidade do DWV-A.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MARTIN, S. J.; BRETTELL, L. E. Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. **Annual Review of Virology**, v. 6, n.1, 2019.