

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

FERNANDA WIESEL GARCIA

**IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS QUE AFETAM *Apis mellifera*
ASSOCIADOS AO ÁCARO ECTOPARASITA *Varroa destructor* EM
APIÁRIOS DO RIO GRANDE DO SUL**

SÃO GABRIEL

2014

FERNANDA WIESEL GARCIA

**IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS QUE AFETAM *Apis mellifera*
ASSOCIADOS AO ÁCARO ECTOPARASITA *Varroa destructor* EM
APIÁRIOS DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo.

SÃO GABRIEL

2014

GARCIA, Fernanda Wiesel

Identificação de Vírus que Afetam *Apis mellifera* Associados ao
Ácaro Ectoparasita *Varroa destructor* em Apiários do Rio Grande do
Sul / Fernanda Wiesel Garcia.

80 folhas;

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa,
2014.

Orientação: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo.

1. Ciências Biológicas. 2. Biologia Geral 3. Genética
I. Tomazzoni Boldo, Juliano. II. Doutor.

FERNANDA WIESEL GARCIA

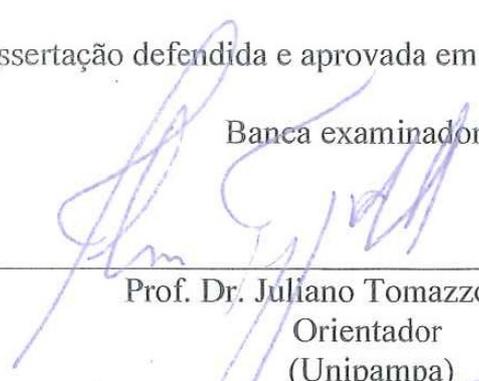
**IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS QUE AFETAM *Apis mellifera*
ASSOCIADOS AO ÁCARO ECTOPARASITA *Varroa destructor* EM
APIÁRIOS DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

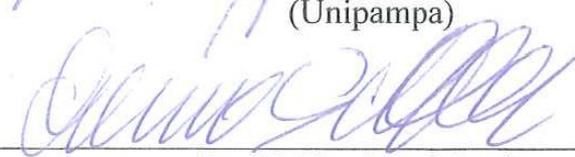
Área de Concentração: Ciências Biológicas

Dissertação defendida e aprovada em: 30 de abril de 2014.

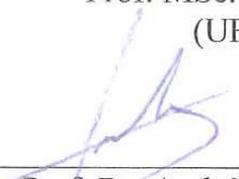
Banca examinadora:



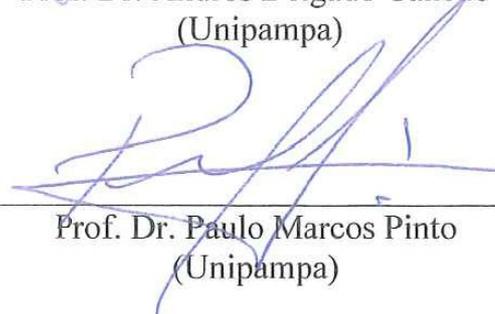
Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
Orientador
(Unipampa)



Prof. MSc. Aroni Sattler
(UFRGS)



Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
(Unipampa)



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
(Unipampa)

Dedico esta dissertação à minha filha,
Maria Carolina, a famosa e temida
Mamá, como uma forma de recompensar
meus vários momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Juliano Boldo, pela dedicação, pela amizade e pelo apoio. E por ser exemplo de competência, educação e honestidade.

A minha co-orientada e amiga Camila Hengel, que me acompanhou nas saídas de campo e nos experimentos no laboratório. Sentirei falta das bobagens e das risadas enquanto esperávamos correr o gel.

Ao Leôncio Batista, companheiro incansável de coletas, parceiro na criação de abelhas em ralos, e nas picadas nos dedos.

Ao Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo, pelo apoio e pelo empréstimo de materiais.

Aos colegas de mestrado e ao pessoal do laboratório, que sempre foram amigos e companheiros.

Ao meu marido, Paulo Roberto, que sempre me incentivou.

Aos meus pais, Cesar e Branca, que cuidaram da minha filha para que eu pudesse concluir o curso.

Aos professores pelos ensinamentos e dedicação.

Ao grupo de pesquisa e todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram na realização do meu trabalho.

Aos apicultores que permitiram a realização de coletas em seus apiários.

Á Deus que me deu forças para concluir esta jornada, quando muitas vezes pensei em desistir.

"Se as abelhas desaparecerem da face da Terra, a humanidade terá mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana."

Albert Einstein

RESUMO

A apicultura é uma atividade de importância econômica e ambiental. O clima e a flora do Brasil somados à presença da abelha africanizada conferem um excelente potencial apícola. Entretanto, as abelhas são suscetíveis a uma variedade de doenças. Vários são os patógenos que podem acometer abelhas melíferas, sendo o foco deste trabalho a relação entre o ácaro *Varroa destructor* e os vírus que acometem abelhas. *V. destructor* é um ectoparasita, sendo a varroose, doença causada por este ácaro, responsável pela mortalidade de milhares de colônias de *Apis mellifera* em várias partes do mundo. Entretanto, os danos causados pela varroose variam com a raça de abelhas e condições climáticas. Embora o ácaro cause poucos danos nas colônias de abelhas africanizadas no Brasil, a coexistência deste ectoparasita com determinados tipos virais pode comprometer seriamente a saúde da colônia, uma vez que muitos destes vírus tem sua transmissão relacionada ao ectoparasita, apontando este como um vetor da infecção. Portanto, faz-se necessária a identificação de quais vírus estão associados ao ácaro e que, possivelmente, utilizam-se do ácaro como vetor. Dentro deste contexto, objetivamos verificar a existência de vírus associados ao ácaro *V. destructor* em espécimes coletadas em apiários de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Foram realizadas coletas de ácaros em apiários localizados em oito municípios gaúchos. A partir das amostras coletadas, foi realizada extração de RNA total e síntese de cDNA. O cDNA sintetizado foi submetido à PCR utilizando-se 9 pares de *primers* para detecção de vírus que afetam abelhas e um par de *primers* para controle endógeno. As amostras

foram submetidas a eletroforese em gel de agarose. Identificou-se, em três apiários, a presença dos vírus SBV (Vírus da Cria Ensacada) e VDV-1 (Vírus *Varroa destructor*-1) associados ao ácaro *V. destructor*. Estes dados são inéditos uma vez que estudos semelhantes nunca foram realizados no Brasil ou em abelhas africanizadas e poderão servir de base no desenvolvimento de programas de controle deste parasita.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. *Varroa destructor*. Vírus.

ABSTRACT

Beekeeping is an activity that has both economic and environmental importance. Brazil has excellent climate and flora for beekeeping, and alongside the presence of Africanized bee populations, it has great potential for apiculture. However, *Apis mellifera* bees are susceptible to a variety of diseases. There are several pathogens that can affect honeybees and the focus of this work is to assess the relationship between the *Varroa destructor* mite and viruses that affect bees in the state of Rio Grande do Sul. *V. destructor* is an ectoparasite and the disease caused by this mite may be responsible for the death of thousands of colonies of *A. mellifera* in several parts of the world. However, the damage caused by the varroa mite vary according to the race of the affected bees and weather conditions. Although the varroa mite cause little damage in colonies of Africanized bees in Brazil, the coexistence of this ectoparasite with certain types of viruses can seriously compromise the health of the colony, since many of these viruses use the mite for transmission, pointing this as a probable vector. Therefore, it is necessary to identify which viruses are associated with the mite and that possibly use it as vector. Within this context, the objective of this work is to verify the presence of viruses associated with the *V. destructor* mite in specimens collected in apiaries in different regions of Rio Grande do Sul. Mite collections were made in apiaries located in eight different cities in the state. Collected samples were subjected to total RNA extraction and cDNA synthesis was performed. The synthesized cDNA was subjected to PCR using nine primer pairs for

detection of viruses affecting bee and one pair of primers for endogenous control. Amplified samples were subjected to electrophoresis on agarose gel. With this work, we have been able to identify in the presence of SBV and VDV-1 virus associated with *V. destructor* mite in three different apiaries. The obtained data are novel, since similar studies have never been conducted before in Brazil or using Africanized bee colonies, and could be used as basis in development of control strategies of this parasite.

Keywords: *Apis mellifera*. *Varroa destructor*. Virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Comportamento higiênico de <i>Apis mellifera</i>	19
Figura 2- Aspectos gerais de <i>V. destructor</i>	25
Figura 3- Fase reprodutiva e forética do ciclo de vida de <i>V. destructor</i>	26
Figura 4- Ciclo reprodutivo de <i>V. destructor</i> dentro da célula de cria de uma operária.....	27
Figura 5- Ciclo de vida de <i>V. destructor</i>	28
Figura 6- Danos diretos e indiretos causados por <i>V. destructor</i>	30
Figura 7- Vias de transmissão de vírus em abelhas.....	32
Figura 8- Pontos de coleta das amostras de <i>V. destructor</i>	41
Figura 9- Estimativa da infestação de <i>V. destructor</i> em apiário de São Gabriel.....	45
Figura 10- Estimativa da Infestação de <i>V. destructor</i> nos apiários avaliados.....	46
Figura 11- Presença dos tipos virais em amostras de <i>V. destructor</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades físicas dos vírus de abelhas melíferas conhecidos atualmente.....	34
Tabela 2- Propriedades biológicas dos vírus de abelhas melíferas conhecidos atualmente.....	36
Tabela 3- Pares de <i>primers</i> utilizados na reação de PCR.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEMEL - Associação Brasileira dos Exportadores de Mel

ABV - *Arkansas bee virus*

ABPV - Vírus da Paralisia Aguda

AIV - *Vírus Apis Irisdescent*

ALPV - *Aphid lethal paralysis virus*

AmFV - Vírus Filamentoso *Apis mellifera* (AmFV)

ANEFA - Associação Nacional de Empresas Florestais, Agrícolas e do Ambiente

BBPV - *Berkeley bee picorna-like virus*

BQCV - Vírus da Realeira Negra

BSRV - *Big Sioux River virus*

BVX - Vírus X de Abelha

BVY - Vírus Y de Abelha

CBPSV - *Chronic bee paralysis satellite virus*

CAP – Confederação dos Agricultores de Portugal

CBPV - Vírus da Paralisia Crônica

CCD - Síndrome do Colapso de Desordem da Colônia

cDNA - DNA complementar

CE - Comunidade Europeia

CWV – *Cloudy wing virus*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DWV - Vírus da Asa Deformada

EBV - Vírus Egípcio

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IAPV - Vírus Israelense da Paralisia Aguda

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KBV - Vírus Caxemira

LSV-1 - *Lake Sinai virus-1*

LSV-2 - *Lake Sinai virus-2*

MMLV - *Moloney Murine Leukemia Virus*

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

RNA – Ácido Ribonucleico

SBPV- *Slow bee paralysis virus*

SBV - Vírus da Cria Ensacada

TSBV - Vírus da Cria Ensacada Tailandês / Chinês

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNIPAMPA - Universidade Federal do Pampa

UV – Ultravioleta

v/v- Volume / Volume

VdMLV - *Varroa destructor Macula-like virus*

VDV-1 - Vírus *Varroa destructor-1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ABELHAS.....	15
1.2 APICULTURA.....	16
1.3 ABELHAS AFRICANIZADAS.....	17
1.4 SANIDADE E ENFERMIDADES.....	19
1.5. SÍNDROME DO COLAPSO DE DESORDEM DA COLÔNIA (CCD).....	21
1.6 ÁCARO <i>Varroa destructor</i>	23
1.7 VÍRUS DE ABELHAS.....	31
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3 MÉTODOS	39
3.1 COLETA DE ESPÉCIMES DO ÁCARO <i>Varroa destructor</i>	39
3.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR.....	41
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS VÍRUS PRESENTES EM <i>V. destructor</i>	42
4 RESULTADOS	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 ABELHAS

As abelhas são essencialmente vespas que abandonaram a predação em favor do aprovisionamento de seus ninhos com néctar e pólen. Apresentam uma combinação de características individuais e grande cooperação. O modo como se adaptam ao mundo que as rodeia é uma das mais ricas fontes de estudo e de conhecimento dentre todos os organismos (WINSTON, 2003).

Um enxame possui três tipos de membros: rainha, zangões e operárias. Cada uma destas castas possui funções muito bem estabelecidas dentro da sociedade das abelhas, onde a rainha vive cercada por suas assistentes e é alimentada com um alimento rico, a geleia real, necessária para executar poucas, mas cruciais tarefas dentro da colônia como, por exemplo, a postura de ovos. Os zangões são alimentados pelas operárias e tem como tarefa fecundar a rainha. As operárias executam diversas tarefas no enxame e, muito raramente, reproduzem (WINSTON, 2003).

Na polinização, as abelhas têm um papel fundamental favorecendo a reprodução sexuada de várias angiospermas e, desta maneira, aumentando a variabilidade genética e contribuindo para a biodiversidade de muitos ecossistemas (ALMEIDA, 2011). Há uma perfeita harmonia na natureza entre vegetais e seus polinizadores, tendo havido uma coevolução de ambos. No caso das abelhas, estas precisam do néctar e do pólen como fontes exclusivas de alimentos e, em

contrapartida, as plantas necessitam da atividade de polinização das abelhas para se perpetuarem (ROCHA, 2012; BIESMEIJER et al, 2006).

Todas as abelhas melíferas atuais (família Apidae: Apini) são classificadas no gênero *Apis*, o qual inclui cinco espécies: *Apis mellifera*, *Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis cerana* e *Apis florea*. A distribuição geográfica natural do gênero *Apis* apresenta maior diversidade de espécies na Índia e regiões adjacentes, onde todas as espécies, exceto *A. mellifera*, são encontradas, o que denota que foi nestas regiões que, provavelmente, se originaram e evoluíram as Apini. Quanto à *A. mellifera*, acredita-se que tenha se originado nas regiões tropicais africanas e migrado para a Ásia e para climas europeus mais frios. Atualmente, a espécie *A. mellifera* encontra-se mundialmente distribuída, devido ao transporte para a prática da apicultura (WINSTON, 2003).

1.2 APICULTURA

A apicultura é uma atividade milenar, tão antiga quanto a história da humanidade, que consiste no uso de colônias de abelhas para obtenção de vários produtos, tais como o mel, cera, própolis, geleia real, pólen e outros (ANEFA, 2012). A atividade apícola é comprovadamente rentável, podendo ser desenvolvida em, praticamente, todo o espaço geográfico, desde que possua condições de solo e clima favorável e uma vegetação rica em floradas, sendo uma atividade sustentável e de grande importância econômica (LIMA, 2005).

A produção do mel no Brasil vem alcançando altos índices de crescimento,

chegando a cerca de 50 mil toneladas por ano (PORTAL BRASIL, 2011). O Rio Grande do Sul está entre os estados brasileiros com maior produção de mel, tendo sido responsável, no ano de 2011, por 16,8 % da produção de mel do país (IBGE, 2012). Outro fator que contribui para a produção apícola brasileira, é que esta não utiliza medicamentos (acaricidas, antibióticos, etc) o que aumenta a qualidade dos produtos da colmeia, além de baratear a produção, tornando os produtos da apicultura nacional mais competitivos e atrativos no mercado mundial. O Brasil ocupa, atualmente, a 11^a posição no *ranking* dos produtores mundiais, sendo o sétimo maior exportador do produto, tendo exportado 16.181 toneladas no ano de 2013, além de possuir um enorme potencial para produção de mel orgânico (ABEMEL, 2014).

A atividade apícola não possui só o mel como produto comercializável. Outros produtos como a cera, o própolis, a geleia real, a apitoxina, o pólen e o aluguel de caixas de abelhas para fins de polinização também são de grande importância econômica. No caso do Brasil, o país apresenta um excelente potencial apícola conferido por seu clima, flora bastante diversificada e por culturas agrícolas que tendem a diversificar e aumentar a qualidade do mel, aliados à presença de abelhas africanizadas.

1.3 ABELHAS AFRICANIZADAS

As abelhas africanizadas são resultado do polihibridismo advindo dos cruzamentos entre abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*) e abelhas europeias (*A.*

mellifera), predominando neste híbrido características morfológicas e comportamentais das abelhas africanas (PEREIRA et al., 2003). Morfologicamente, a principal diferença visível se refere ao tamanho, uma vez que as abelhas híbridas apresentam um tamanho corporal menor em relação às abelhas europeias. Porém, é em relação ao comportamento que estas abelhas se distinguem significativamente.

As abelhas africanizadas são mais defensivas, apresentam alta capacidade de adaptação a ambientes inóspitos, tolerando climas mais frios, continuando o trabalho em temperaturas baixas, enquanto as europeias se recolhem nessas épocas (PEREIRA et al., 2003). Tais híbridos também apresentam maior capacidade de enxameação e suas operárias possuem um ciclo de desenvolvimento precoce (18,5 a 19 dias) em relação às europeias (21 dias), com intensa atividade forrageira, o que lhes confere vantagem na produção. A maior resistência a doenças é uma característica marcante destas abelhas, estando amplamente relacionada ao comportamento de *grooming / selfgrooming* (limpeza corporal / auto limpeza) e ao comportamento higiênico, o qual, segundo muitos autores, é um dos principais mecanismos comportamentais de resistência ou tolerância a doenças (BOECKING et al., 1999; MONDRAGÓN et al., 2005; PEREIRA, 2008).

Estes híbridos apresentam um comportamento higiênico altamente eficiente, detectando e removendo crias mortas e doentes para fora da colmeia (Figura 1). Este comportamento é fundamental para saúde da colônia, visto que a larva ou pupa morta dentro do favo, devido à possível ação de um agente patogênico, pode causar prejuízos à colônia como um todo e, tornar-se um foco de infecção que poderá colocar em risco todos os indivíduos que estão em desenvolvimento (BOECKING et al., 1999; MONDRAGÓN et al., 2005; PEREIRA, 2008).



Figura 1- Comportamento higiênico de *Apis mellifera*. Abelhas removendo pupa doente. Disponível em: <http://growingsmallfarms.ces.ncsu.edu/growingsmallfarms-farmphotoapr2505/>. (Acesso em 13 de Janeiro de 2014).

1.4 SANIDADE E ENFERMIDADES

Independente de espécie ou subespécie, as abelhas são suscetíveis a uma variedade de doenças e ameaças ambientais, algumas das quais tem aumentado significativamente ao longo dos últimos 5 a 10 anos, ainda não tendo sido identificado os fatores responsável pelas perdas de colônias em todas as regiões do mundo (GENERSCH, 2010). Fatores biológicos e ambientais, atuando isoladamente ou em conjunto, tem o potencial de causar morte prematura das colônias. Dentre estes fatores, algumas doenças desempenham um papel significativo tanto no aumento da mortalidade dos indivíduos da colônia, como no colapso da mesma.

Uma colmeia em equilíbrio não adoece. Somente quando se rompe o

equilíbrio surgem os problemas na colônia e o possível desenvolvimento de doenças, modificando o comportamento da população, a qual entra em estado de estresse, ficando ainda mais suscetível às enfermidades. Assim, para que uma enfermidade se desenvolva, são necessárias condições para isto, como desnutrição, rainhas fracas, favos velhos, material deteriorado, manejo inadequado e a presença do agente patogênico (TAPIA, 2010).

Existem vários organismos que podem causar danos às abelhas, tanto na fase de larva quanto na fase adulta. Algumas bactérias, fungos e vírus causam doenças que afetam principalmente as larvas. Já as abelhas adultas são frequentemente atacadas por fungos, ácaros e insetos (RAMOS et al., 2007).

Diversos problemas sanitários ameaçam as colônias. Dentre eles, a padronização do material apícola e algumas técnicas de manejo, acompanhadas da intensificação da produção, que resultam numa proximidade cada vez maior entre as colônias. Estes fatores, juntamente com o constante deslocamento de colônias, o comércio de abelhas (rainhas, núcleos ou pacotes de abelhas) entre apicultores de diferentes regiões do mesmo país, ou mesmo, entre apicultores de diferentes países e continentes, contribui de forma marcante para a disseminação da maioria das doenças das abelhas (CAP, 2012).

Algumas enfermidades surgem em uma colmeia sadia e são capazes de romper com o equilíbrio natural da colônia (varroose, nosemose, Loque Americana, acarioses em geral) e outras, que ocorrem geralmente em consequência de uma enfermidade já estabelecida ou em decorrência de algum estresse, ou seja, quando o equilíbrio da colônia já está rompido (virose, Loque Europeia) (TAPIA, 2010).

1.5. SÍNDROME DO COLAPSO DE DESORDEM DA COLÔNIA (CCD)

Um fenômeno intrigante vem sendo observado em várias partes do mundo. Trata-se da síndrome do colapso de desordem da colônia (do inglês *Colony Collapse Disorder*, CCD). A CCD se refere à dizimação em massa de populações de abelhas, sendo caracterizada pela ausência de abelhas vivas ou mortas na colônia, mas com a presença de crias e alimento, podendo ser encontrado, em alguns casos, uma pequena quantidade de operárias e a rainha dentro da colmeia. Esta síndrome foi primeiramente divulgada nos Estados Unidos no inverno de 2006, já acometeu colmeias em vários países da Europa e vem se espalhando pelo mundo (COSTA-MAIA et al., 2010; EMBRAPA, 2012). Destruição do habitat, o uso de agroquímicos, a presença de patógenos e mudanças climáticas podem contribuir para estas perdas (PETTIS et al., 2013). A restrição nutricional e a exposição a pesticidas e agrotóxicos podem alterar a susceptibilidade ou a gravidade de uma enfermidade, uma vez que tais produtos químicos podem alterar as vias do sistema imunológico das abelhas (PETTIS et al., 2013).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, órgão responsável por informar oficialmente a ocorrência de problemas sanitários animais e vegetais no Brasil, até o momento a síndrome do colapso de desordem das Colônias não foi detectada no país. No Brasil, já houve relatos de abandono de colônias em vários estados, porém, estas perdas não preenchem os requisitos da CCD, uma vez que as causas são conhecidas e os sintomas são bem diferentes dos causados por tal síndrome (EMBRAPA, 2012). No nordeste, em 2012, a estiagem foi a principal causa do desaparecimento das abelhas aliada à alta temperatura, falta de

sombreamento e manejo alimentar inadequado (LOPES, 2011; VIDAL, 2013). No município gaúcho de Santa Margarida do Sul um apiário inteiro foi dizimado, tendo o envenenamento por agroquímicos como a causa mais provável de tal mortandade. (Machado, com. pessoal). Alterações climáticas, patógenos e uso de agroquímicos são citados como causas da mortalidade das abelhas no Brasil, mas a falta de documentação sobre o desaparecimento de enxames dificulta o trabalho de controle e o monitoramento da situação (ROCHA, 2012). Atualmente o Bee Alert Geolocator, uma plataforma criada para que apicultores e a comunidade científica registrem as ocorrências de desaparecimento e perda de abelhas em todo o mundo, vem contribuindo para a identificação de suas causas. Através do Bee Alert, é possível localizar no mapa os locais e a quantidade de casos reportados. O Bee Alert está disponível em: <http://www.semabelhasemalimento.com.br/beealert/>.

Apesar de descartar o CCD, o Ibama indica que os defensivos agrícolas estão entre os principais causadores do desaparecimento de abelhas no Brasil, pois estes produtos químicos matam os insetos imediatamente após a aplicação ou afetam seu sistema sensor, fazendo com que as abelhas não consigam retornar à colmeia, enfraquecendo assim o enxame (ROCHA, 2012).

Na Europa, o uso de pesticidas neocotinoides como clothianidin, imidacloprid e thiametoxam foi restrito pela Comissão Europeia (CE), na tentativa de preservar as abelhas melíferas durante o processo de polinização. Baseado nos focos de exposição a que as abelhas estão submetidas ao polinizar, foram analisados os resíduos de néctar e pólen de plantas tratadas com tais pesticidas, a poeira produzida no plantio de sementes e os resíduos produzidos pelas plantas no processo de gutação, evidenciando o risco de intoxicação das abelhas nos três focos. Em países como Itália, Alemanha, Áustria e Eslovênia, o uso de neocotinoides

no plantio de milho causou toxicidade aguda nas abelhas, levando a enormes perdas de colônias (MAXIN, 2014). Pettis et al. (2013), ressaltam que a exposição a doses de agroquímicos aumentam a susceptibilidade das abelhas a diversos parasitas e patógenos, em especial ao microsporídeo *Nosema* spp.

Embora não exista um consenso sobre as causas da CCD e as patologias sejam diversas, o ácaro *V. destructor* e patógenos associados, além da presença de agroquímicos e do microsporídeo *Nosema* spp, tem claramente um papel central no declínio das colônias. *V. destructor* é um patógeno endêmico, que associado aos vírus culmina na morte das colônias, sendo encontrado em praticamente todas as colônias diagnosticadas com CCD, o que ressalta sua importância (WILLIAMS, 2010).

1.6 ÁCARO *Varroa destructor*

O ácaro *Varroa destructor*, anteriormente considerado como integrante da espécie *Varroa jacobsoni*, é considerado uma grande preocupação na apicultura mundial. Parasita comum à abelhas *Apis cerana*, só tornou-se um problema mais grave quando entrou em contato com o novo hospedeiro, a abelha *Apis mellifera* (WIELEWSKI, 2013). No Brasil o ácaro foi introduzido na década de 70. Estudos moleculares revelaram a existência de diferentes haplótipos do ácaro, os quais são relacionados à virulência. O haplótipo K (Coreano) é encontrado em locais com elevados níveis de infestação como é o caso da Europa. No Brasil, há predomínio do haplótipo J (Japonês), o qual é relacionado com baixos níveis de infestação

(ANDERSON e TRUEMAN, 2000).

V. destructor (comumente denominado varroa) é um ectoparasita da família Varroidae e visível a olho nu. A fêmea e o macho apresentam grande dimorfismo sexual principalmente em coloração, tamanho e forma do corpo. A fêmea possui coloração castanho-avermelhada, medindo 1,1-1,2 mm de comprimento e 1,5-1,6 mm de largura, com forma elipsoidal e o macho amarelado, medindo cerca de 0,7mm de comprimento e 0,7mm de largura, com forma arredondada (Figura 2a) (ALLSOPP, 2006; ROSENKRANZ et al., 2010).

O ácaro fêmea adulta pode parasitar tanto as crias como as abelhas adultas (Figura 2b), podendo ser transmitida de abelha para abelha (transmissão horizontal), enquanto as fêmeas que ainda não atingiram maturação sexual parasitam apenas larvas e pupas (Figura 2c), encontrando-se dentro das células de cria das abelhas até atingirem a idade adulta. O macho, nunca deixa a célula, pois morre após a cópula (ALLSOPP, 2006; ROSENKRANZ et al., 2010).



Figura 2- Aspectos gerais da *Varroa destructor*. **A.** Composição normal de uma família do ácaro dentro de uma célula de cria, aproximadamente 11 dias após a célula ser operculada. Linha superior, da esquerda para a direita: protoninfa, deutoninfa e fêmea sexualmente imatura. Linha inferior, da esquerda para direita: fêmea sexualmente madura, ácaro mãe, macho adulto. **B.** *Varroa* fêmea no tórax de *A. mellifera*. **C.** Células de cria de zangão infestadas por *V. destructor*. Fonte: ROZENKRANZ et al., (2010).

O ciclo de vida de *V. destructor* corresponde a duas fases: a fase forética, onde o ácaro encontra-se sobre as abelhas adultas e a fase reprodutiva, dentro da célula de cria operculada (coberta por uma cúpula de cera, sob a qual acontecerá a metamorfose da abelha) (Figura 3). O ácaro invade a célula de cria da abelha, quando esta começa a ser operculada, momento em que a larva apresenta em sua hemolinfa uma maior quantidade do hormônio juvenil 3, o qual é um sinalizador para o início da postura de ovos pelo ácaro (TAPIA, 2010; MORETTO, 1991).

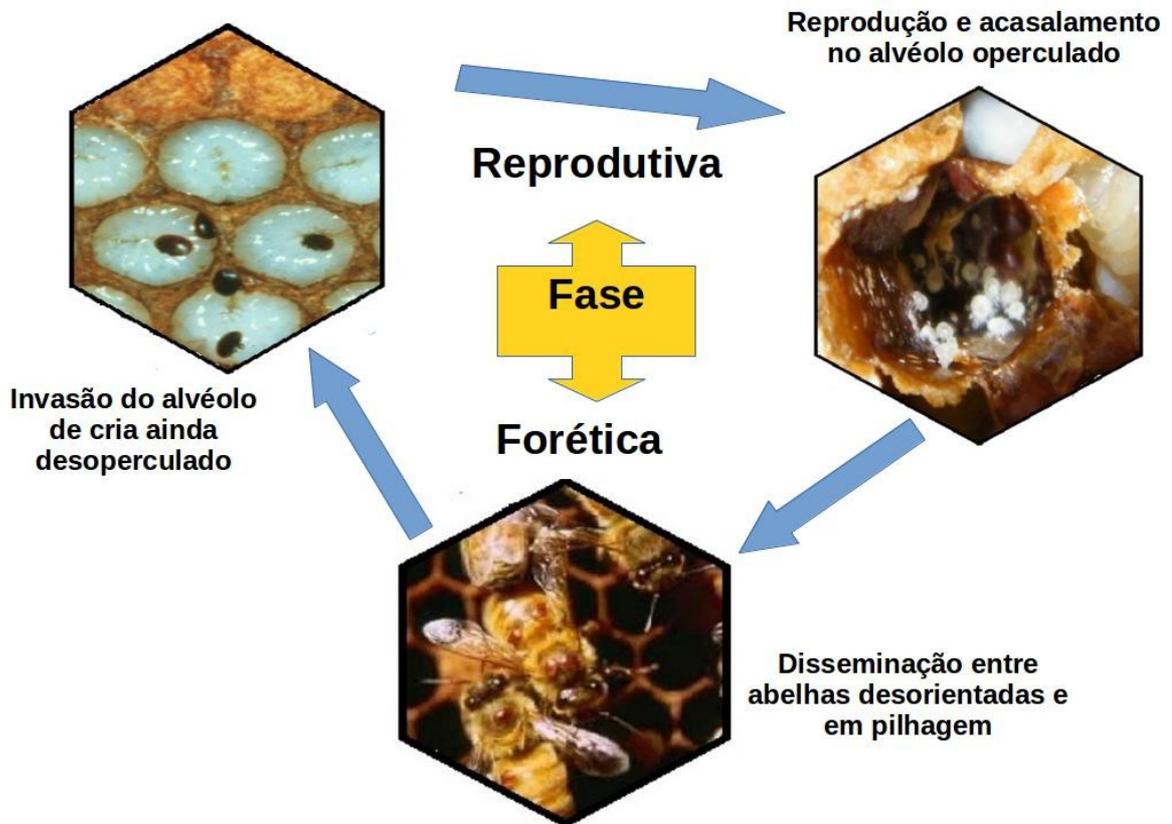


Figura 3- Fase reprodutiva e forética do ciclo de vida de *V. destructor*. Fonte: modificado de ROZENKRANZ et al., (2010).

Todo período de desenvolvimento da varroa ocorre dentro da célula de cria, passando por quatro fases: ovo, protoninfa, deutoninfa e adulto. O período de tempo de ovo até adulto é de 6 a 7 dias para fêmeas e 5 a 6 dias para machos. Durante a fase reprodutiva o ácaro produz um macho e várias fêmeas, o qual fecundará as suas próprias irmãs, antes destas emergirem da célula, de tal forma que, quando a nova abelha nasce, com ela emergem da célula o parasita progenitor e parte da sua descendência, já fecundadas (Figura 4) (VIDAL, 2013). Assim, o ciclo de desenvolvimento da varroa está relacionado com o ciclo de desenvolvimento da

abelha, sendo a abelha adulta um hospedeiro intermediário e meio de transporte para os ácaros fêmeas (Figura 5).

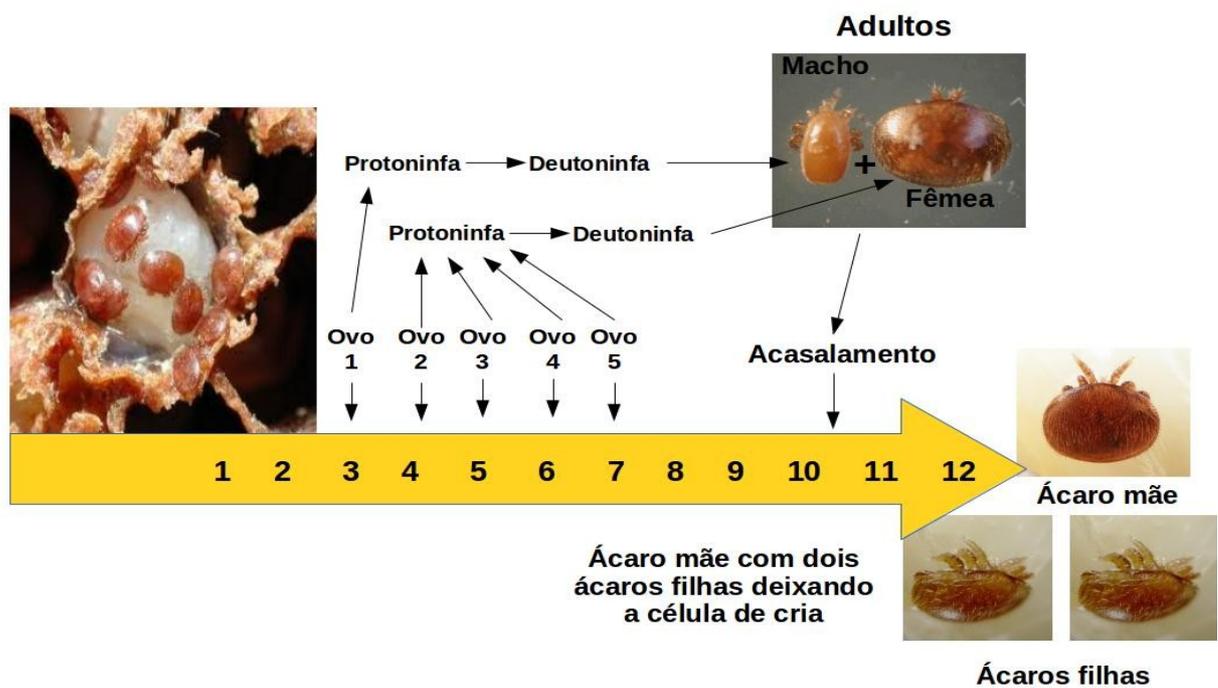


Figura 4- Ciclo reprodutivo de *Varroa destructor* dentro da célula de cria de uma operária, com a sequência de desenvolvimento do ácaro. Um ácaro fêmea entra na célula de cria pouco antes da operculação; aproximadamente 3 dias mais tarde, o primeiro ovo, o macho, é colocado seguido por até quatro ovos, as fêmeas. Dependendo do período, um ou dois ácaros filha maduros vão deixar a célula de cria, juntamente com o ácaro mãe e a abelha recém eclodida. Os números sobre a seta correspondem aos dias após célula ser operculada. Fonte: modificado de ROZENKRANZ et al., (2010).

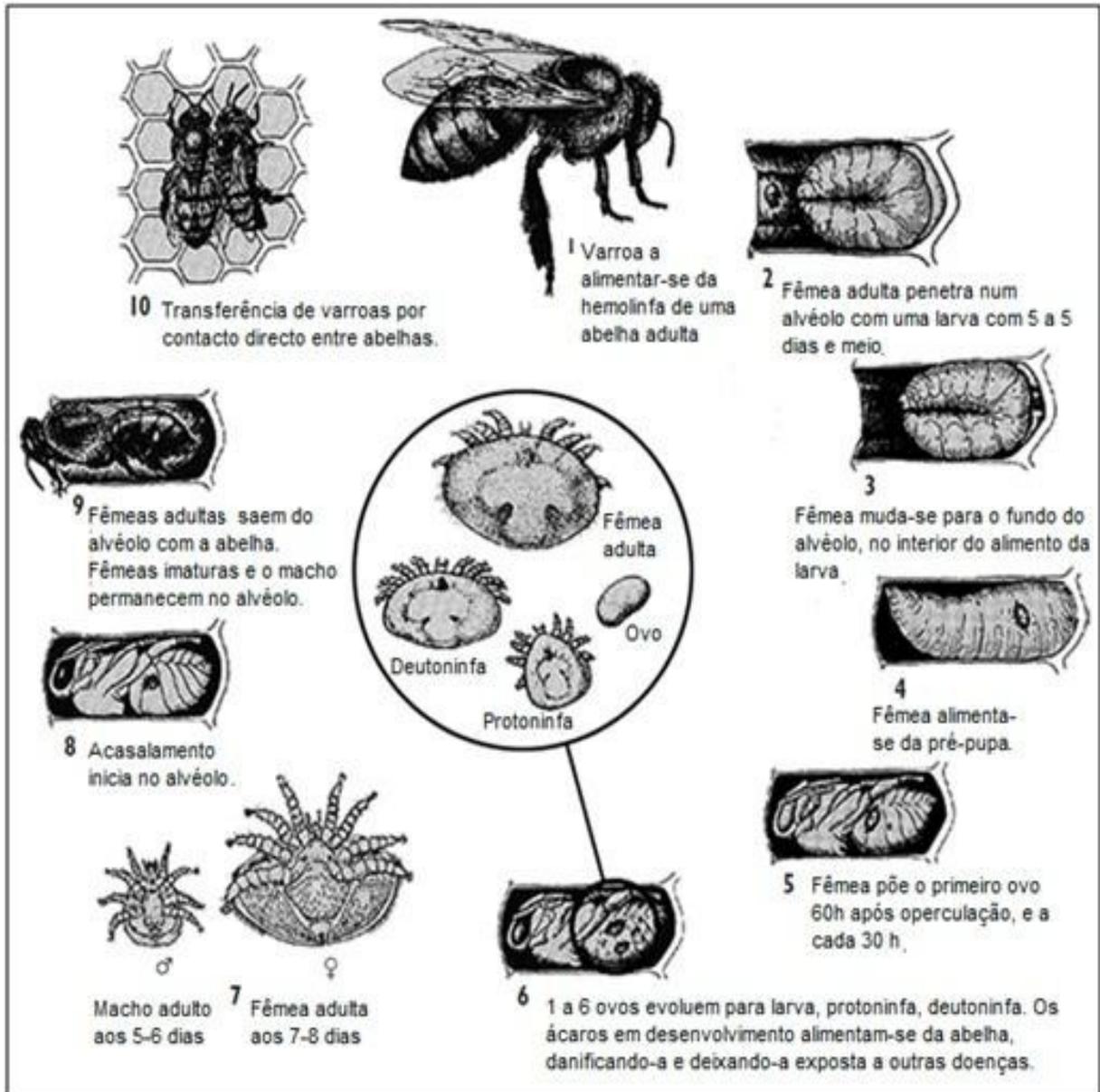


Figura 5- Ciclo de vida de *V. destructor*. Fonte: PASCOAL (2012).

Em ambas as fases do ciclo de vida, o ácaro alimenta-se da hemolinfa do hospedeiro, sugando aproximadamente 0,1 mg de hemolinfa a cada duas horas. O aparelho bucal das fêmeas consiste num dispositivo picador-sugador que permite perfurar o revestimento quitinoso das abelhas e sugar a hemolinfa, da qual retira as proteínas (LOPES, 2011; TAPIA, 2010). O ácaro fêmea tem preferência por abelhas

adultas nutrizes, ficando assim sempre próximo das células de cria, e por crias de zangões, as quais são maiores e alimentadas com maior frequência, além de possuírem um ciclo de desenvolvimento em células operculadas mais longo.

Os danos causados ao organismo parasitado são consideráveis, provocando uma intensa anemia nas abelhas adultas que durante seu estado larval foram parasitadas, assim como asas deformadas, menor peso corporal, dentre outros efeitos deletérios. Ou seja, crias infestadas são prejudicadas em seu desenvolvimento por terem seu conteúdo proteico diminuído durante o seu desenvolvimento, tornando-se abelhas mais fracas, menores, com a atividade de forrageamento comprometida e com longevidade reduzida (LOPES, 2011 ; TAPIA, 2010).

O parasitismo por *V. destructor* pode ter ação direta ou indireta sobre a colmeia (Figura 6). Os danos diretos podem ser exemplificados através da diminuição das proteínas da hemolinfa, levando a um desenvolvimento incompleto das larvas que muitas vezes eclodem deformadas; diminuição na longevidade das abelhas, onde uma abelha atacada por varroa tem seu tempo de vida reduzido em cerca de 50 %; eclosão de abelhas deficientes, com abdômen curto, tamanho reduzido, sem asas ou com asas deformadas, as quais não são aptas para as atividades da colmeia, sendo eliminadas (TAPIA, 2010).

Os danos indiretos causados pelo ácaro podem ser evidenciados através da diminuição da resistência aos agroquímicos, onde a carência de proteínas na hemolinfa diminui a resistência do organismo ante estes defensivos; inoculação de agentes patológicos, pois a perfuração causada por seu aparelho bucal ao sugar a hemolinfa torna-se uma porta de entrada para bactérias, vírus e fungos, transmitindo outras enfermidades: e por fim, a aparição de micoses também se caracteriza como

um dano indireto, não somente pela inoculação de fungos como o da cria-giz, mas pelo súbito despovoamento da colônia, onde a morte de abelhas forrageiras obriga as nutrizes a ocuparem precocemente tal função, abandonando os cuidados com as crias, as quais sofre um estresse térmico e nutricional, favorecendo o desenvolvimento da cria-giz (TAPIA, 2010).

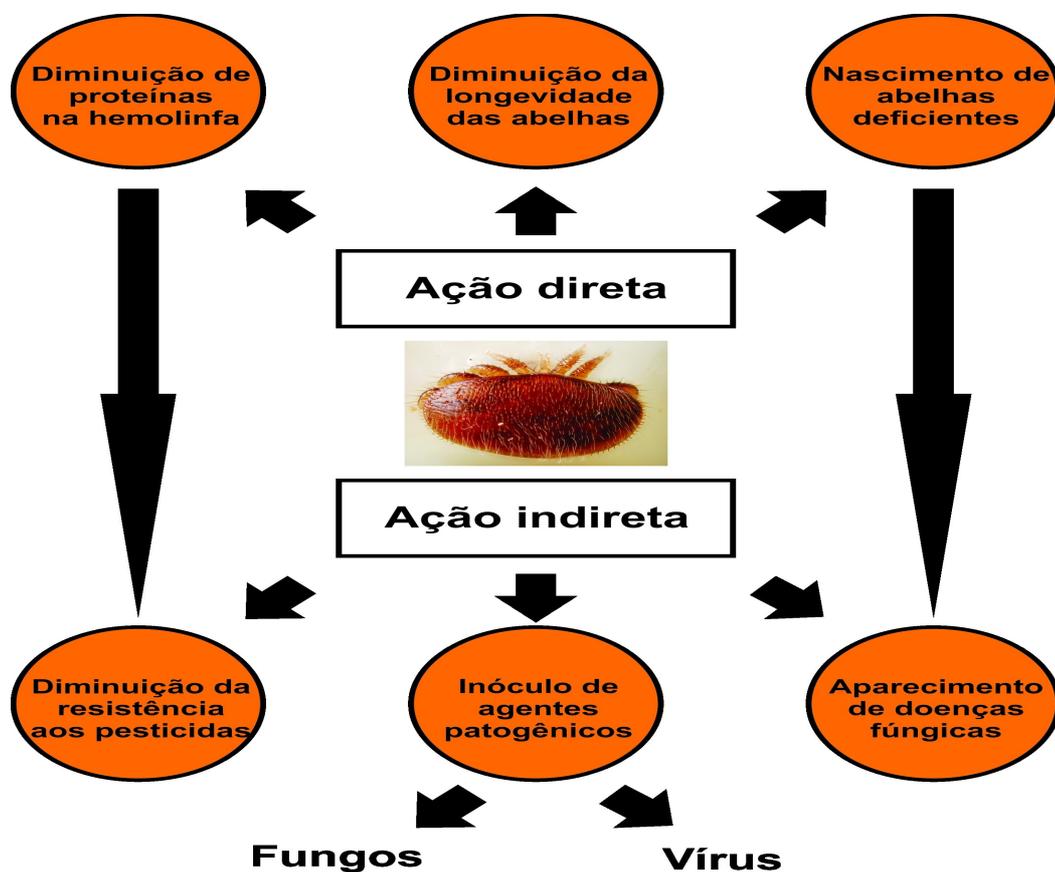


Figura 6- Danos diretos e indiretos causados por *V. destructor*. Fonte: adaptado de TAPIA (2010).

Entretanto, os prejuízos decorrentes da varroatose, doença causada por este ácaro, variam com a raça de abelhas e condições climáticas. No Brasil, a ação de *V. destructor* em colônias de abelhas africanizadas parece ser reduzido, não sendo necessárias medidas de controle, como o uso de acaricidas, e não sendo evidenciada perdas de colônias devido unicamente à presença do ácaro. Porém, em colônias de abelhas europeias, em muitos países da Europa, Ásia e América do Norte foi relatada grave mortalidade de colônias devido à ação de tal ácaro (ROCHA, 2012).

Embora a varroa cause poucos danos nas colônias de abelhas africanizadas no Brasil, a coexistência deste ectoparasita com determinados tipos virais pode comprometer seriamente a saúde da colônia, uma vez que para se alimentar o ácaro perfura a quitina da abelha, violando a barreira de proteção do inseto, deixando uma porta de entrada para diversos patógenos, dentre eles os vírus. Somado a isso, ao sugar a hemolinfa de uma abelha infectada por um vírus, o ácaro acaba se contaminando com tal vírus e, ao parasitar outra abelha, acaba transmitindo-o ao próximo inseto, servindo como vetor viral (TAPIA, 2010).

1.7 VÍRUS DE ABELHAS

As abelhas podem ser parasitadas por várias espécies de vírus, os quais geralmente persistem naturalmente nas colônias, em níveis baixos, não provocando sintomas visíveis na colônia, utilizando uma variedade de vias de transmissão (Figura 7). Porém, esse estado silencioso não é incompatível com efeitos

prejudiciais, uma vez que a acumulação de perturbações individuais pode, eventualmente, levar à morte de toda a colônia (AUBERT et al., 2008; DE MIRANDA et al., 2013).

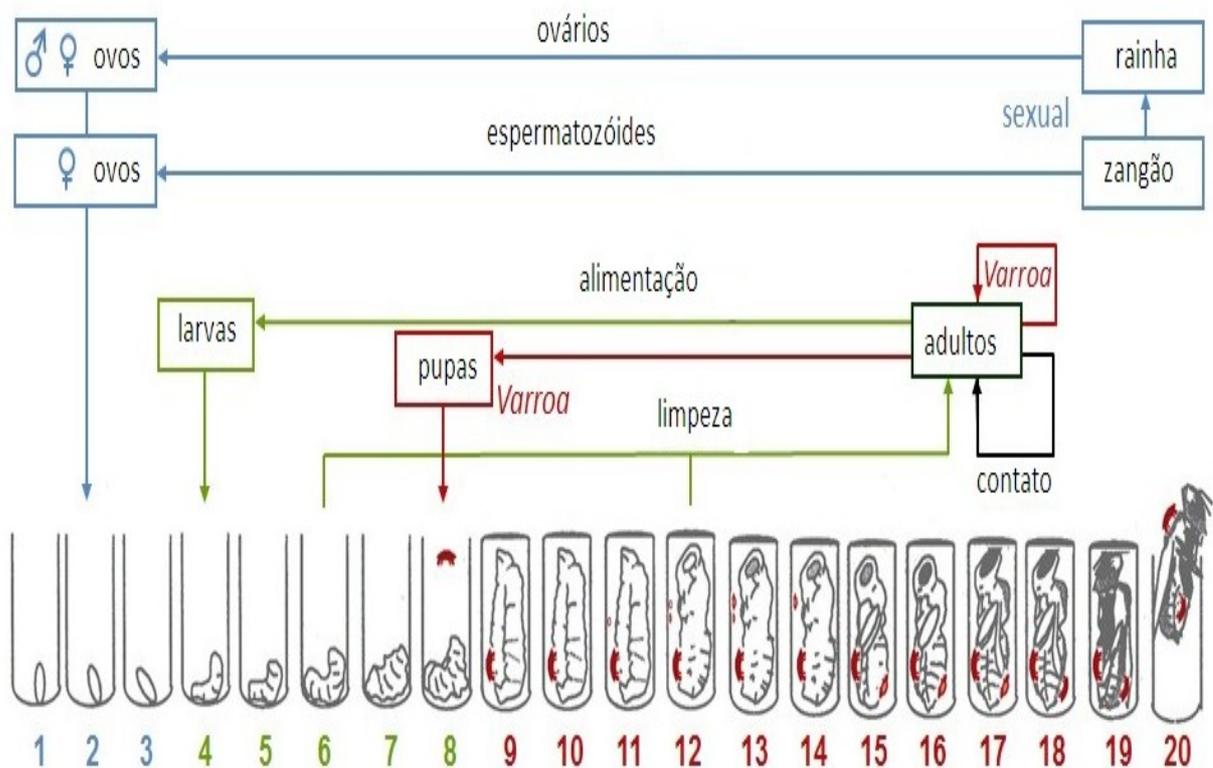


Figura 7- Diagrama descrevendo as possíveis vias de transmissão de vírus em abelhas. As setas azuis indicam transmissão vertical, através dos espermatozóides e/ou óvulos. As setas verdes representam transmissão horizontal através da alimentação e limpeza. As setas vermelhas indicam transmissão horizontal tendo o ácaro *V. destructor* como vetor viral, e a seta preta indica transmissão horizontal por contato corporal. Fonte: adaptado de De Miranda et al. (2013).

Dentre os vírus que vem causando impacto na apicultura mundial, 24 tipos já foram identificados (Tabela 1), tendo sido a maior parte destes vírus descrita entre

1960 e 1980. Devido à possível sobreposição entre os vírus tradicionalmente descritos e as sequências virais recém-descritas, além da estreita relação entre alguns deles, os quais são considerados membros de um único grupo complexo, como, por exemplo, o grupo composto pelo Vírus da Asa Deformada (*Deformed wing virus* – DWV) / Vírus Varroa destructor-1 (*Varroa destructor virus-1*-VDV-1) / Vírus Egípcio (*Egypt bee virus* – EBV); o grupo do Vírus da Paralisia Aguda (*Acute bee paralysis virus* - ABPV) / Vírus Caxemira (*Kashmir bee virus* - KBV) / Vírus Israelense da Paralisia Aguda (*Israeli acute paralysis virus* - IAPV); o grupo do Vírus da Cria Ensacada (*Sacbrood virus* - SBV) / Vírus da Cria Ensacada Tailandês/Chinês (*Thai/Chinese sacbrood virus* - TSBV); o grupo do Vírus X de Abelha (*Bee virus-X*-BVX) / Vírus Y de Abelha (*Bee virus-Y*-BVY) e, por fim, o grupo os vírus *Lake Sinai virus-1* (LSV-1) e *Lake Sinai virus-2* (LSV-2), se reduz para cerca de 16-18 vírus verdadeiramente únicos, os quais apresentam conteúdo genético composto por RNA, excetuando-se o Vírus Filamentoso *Apis mellifera* (AmFV) e Vírus *Apis Irisdescent* (AIV) que são vírus cujo conteúdo genético é DNA (DE MIRANDA et al., 2013).

Tabela 1- Propriedades físicas, tais como forma, tamanho, perfil das proteínas do cápsideo, tipo e tamanho do genoma e taxonomia, dos vírus de abelhas melíferas conhecidos atualmente. Fonte: adaptado de De Miranda et al. (2013).

VÍRUS		PROPRIEDADES FÍSICAS					
		Forma	Tamanho	Proteínas do capsídeo	Ácido Nucléico	Tamanho do Genoma	Taxonomia
Vírus da Paralisia Aguda	ABPV	Icosaedro	30nm	35-9-33-24KDa	ssRNA	~9.5Kb	Dicistroviridae
Vírus Caxemira	KBV	Icosaedro	30nm	37-6-34-25KDa	ssRNA	~9.5Kb	Dicistroviridae
Vírus Israelense da Paralisia Aguda	IAPV	Icosaedro	30nm	35-7-33-26KDa	ssRNA	~9.5Kb	Dicistroviridae
Vírus da Realeira Negra	BQCV	Icosaedro	30nm	31-14-29-30KDa	ssRNA	~9.5Kb	Dicistroviridae
<i>Aphid lethal paralysis virus</i>	ALPV	Icosaedro	30nm	25-7-32-28KDa*	ssRNA	~10Kb	Dicistroviridae
<i>Big Sioux River virus</i>	BSRV	Icosaedro	30nm	28-5-29-30KDa	ssRNA	~10Kb	Dicistroviridae
Vírus Deformador da Asa	DWV	Icosaedro	30nm	32-2-44-28KDa	ssRNA	~10Kb	Iflaviridae
Vírus <i>Varroa destructor</i> -1	VDV-1	Icosaedro	30nm	32-2-46-28KDa	ssRNA	~10Kb	Iflaviridae
Vírus Egípcio	EBV	Icosaedro	30nm	30-2-41-25KDa	ssRNA	NI	Iflaviridae
Vírus da Cria Ensacada	SBV	Icosaedro	30nm	31-2-32-30KDa	ssRNA	~9Kb	Iflaviridae
Vírus da Cria Ensacada Tailandês/Chinês	TSBV	Icosaedro	30nm	31-2-32-30KDa	ssRNA	~9Kb	Iflaviridae
<i>Slow bee paralysis virus</i>	SBPV	Icosaedro	30nm	27-2-46-29KDa	ssRNA	~9.5Kb	Iflaviridae
Vírus da Paralisia Crônica de Abelha	CBPV	anisométrico	30 ~ 60nm	23-(30/50/75?) KDa	ssRNA	~2.3Kb/ ~3.7Kb	Não classificado
<i>Chronic bee paralysis satellite virus</i>	CBPSV	Icosaedro	17nm	15KDa	ssRNA	(3x)~1.1Kb	satellite
<i>Cloudy wing virus</i>	CWV	Icosaedro	17nm	19KDa	ssRNA	~1.4Kb	NI
<i>Bee virus-X</i>	BVX	Icosaedro	35nm	52KDa	ssRNA	NI	NI
<i>Bee virus-y</i>	BVY	Icosaedro	35nm	50KDa	ssRNA	NI	NI
<i>Lake Sinai virus-1</i>	LSV-1	NI	NI	63KDa*	ssRNA	~5.5Kb	Não classificado
<i>Lake Sinai virus-2</i>	LSV-2	NI	NI	57KDa*	ssRNA	~5.5Kb	Não classificado
<i>Arkansas bee virus</i>	ABV	Icosaedro	30nm	43KDa	ssRNA	~5.6Kb	NI
<i>Berkeley bee picorna-like virus</i>	BBPV	Icosaedro	30nm	37-?-35-32KDa	ssRNA	~9Kb	NI
<i>Varroa destructor Macula-like virus</i>	VdMLV	Icosaedro	30nm	24KDa*	ssRNA	~7Kb	Tymoviridae
<i>Apis mellifera filamentous virus</i>	AmFV	linear	150x450nm	12x(13~70KDa)	dsDNA	NI	Baculoviridae
<i>Apis iridescent virus</i>	AIV	poliedro	150nm	NI	dsDNA	NI	Iridoviridae
* Genoma Predito		NI= Não Informado (incerto)					

Embora os vírus descritos sejam diversos, apenas sete são considerados como capazes de causar doenças graves em abelhas, conseqüentemente sendo estes vírus mais ativamente estudados. Entre os sete vírus mencionados encontram-se os Vírus da Paralisia Crônica (CBPV), Vírus da Paralisia Aguda (ABPV), Vírus Deformador da Asa (DWV), Vírus da Realeira Negra (BQCV), Vírus da Cria Ensacada (SBV), Vírus caxemira (KBV) e, mais recentemente, o Vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV). Alguns destes vírus foram identificados como estando envolvidos nas perdas de colônias, em diversas partes do mundo, como os vírus ABPV / KBV / IAPV, grupo de vírus relacionados ao vírus deformador da asa (DWV) (BACANDRITSOS et al., 2012).

Notavelmente, grande parte desses vírus são vetorialmente transmitidos por *V. destructor* (Tabela 2) e os vírus ABPV e DWV só se tornaram virulentos após *V. destructor* se estabelecer nas populações de *A. mellifera*. Assim, vários vírus considerados inofensivos por muitos anos, passaram a ser patogênicos após a introdução do ácaro *V. destructor* nas colônias de abelhas (AUBERT et al., 2008; SCHÖNING et al, 2012).

Tabela 2- Propriedades biológicas dos vírus de abelhas melíferas, tais como vias de transmissão, associação com *V. destructor* e principais estágios do ciclo de vida infectados. Estudo realizado em abelhas europeias. Fonte: adaptado de De Miranda et al. (2013).

VIRUS	TRANSMISSÃO						ASSOCIAÇÃO COM VARROA	ESTÁGIO			
	HORIZONTAL			VERTICAL				INFECÇÃO/SINTOMAS			
	Fecal- Oral	Contato Corporal	Ar	Varroa	Ovários	Sêmen		Ovos	Larva	Pupa	Adulto
ABPV	+	-	?	+	+	+	+	+/-	+/-	+/~	+/+
KBV	+	-	?	+	+	~	+	+/-	+/-	+/+	+/+
IAPV	+	-	?	+	+	~	+	+/-	+/-	+/~	+/+
BQCV	+	-	?	~	+	?	+	+/-	+/-	+/+	+/-
ALPV	?	?	?	?	?	?	?	?/?	?/?	-/-	+/?
BSRV	?	?	?	?	?	?	?	?/?	?/?	-/-	+/?
DWV	+	-	?	+	+	+	+	+/-	+/-	+/+	+/+
VDV-1	+	-	?	+	+	+	+	+/-	+/-	+/+	+/+
EBV	?	?	?	?	?	?	?	?/?	?/?	+/?	+/~
SBV	+	-	?	-	?	?	~	?/?	+/+	+/-	+/~
TSBV	+	?	?	?	?	?	?	?/?	+/+	+/-	+/~
SBPV	+	-	?	+	?	?	+	?/?	+/-	+/-	+/+
CBPV	+	+	?	-	?	?	~	-/-	+/-	+/-	+/+
CBPSV	?	?	?	?	?	?	?	?/?	?/?	?/?	+/?
CWV	?	~	~	-	?	?	~	-/-	-/-	-/-	+/+
BVX	+	?	?	?	?	?	?	-/-	-/-	-/-	+/+
BVY	+	?	?	?	?	?	?	-/-	-/-	-/-	+/+
LSV-1	?	?	?	?	?	?	?	?/?	?/?	+/?	+/?
LSV-2	?	?	?	?	?	?	?	?/?	?/?	~/?	+/?
ABV	?	?	?	?	?	?	?	?/?	?/?	~/?	+/?
BBPV	?	?	?	?	?	?	?	?/?	?/?	?/?	+/?
VdMLV	?	?	?	+	?	?	+	?/?	?/?	+/?	+/?
AmFV	?	?	?	?	?	?	?	-/-	-/-	-/-	+/+
AIV	?	?	~	?	?	?	?	-/-	-/-	-/-	+/+

+ PRESENTE ~ INCERTO ? DESCONHECIDO - AUSENTE

Estes relatos embasam o objetivo deste trabalho no que tange a verificação da relação entre o ácaro *V. destructor* e os vírus que acometem abelhas, uma vez que problemas sanitários da apicultura mundial vêm se agravando e torna-se necessária a adoção de medidas de maior proteção à saúde das abelhas. Diante da gravidade da associação do ácaro *Varroa destructor* com os vírus, este trabalho justifica-se visto que estudos relacionando *V. destructor* e vírus são amplamente realizados na Europa e nos Estados Unidos, com espécies de abelhas europeias, não tendo sido ainda realizados no Brasil, em abelhas africanizadas e, sendo o Rio Grande do Sul um notável exportador e produtor de mel, cabe ressaltar a necessidade de estudos nesta região de grande importância econômica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar em amostras do ácaro *Varroa destructor* a presença de vírus que acometem abelhas melíferas africanizadas em apiários do Rio Grande do Sul.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Coletar espécimes de varroas em oito municípios do estado do Rio Grande do Sul;

Padronizar uma técnica para o isolamento de RNA total em varroas;

Sintetizar DNA complementar a partir do RNA isolado;

Identificar a presença ou ausência de vírus que infectam abelhas *Apis mellifera* em *Varroa destructor*.

3 MÉTODOS

3.1 COLETA DE ESPÉCIMES DO ÁCARO *Varroa destructor*

Com o objetivo de analisar os níveis de infestação de *V. destructor* e padronizar uma técnica eficiente de coleta para as condições presentes nos apiários localizados nas regiões do estado do Rio Grande do Sul amostradas, realizou-se um estudo prévio da prevalência deste ácaro em um apiário fixo no município de São Gabriel-RS. O município de São Gabriel está situado entre as coordenadas de latitude 30° 20' 11" e longitude 54° 19' 12", a 114 m do nível do mar na região fisiográfica da Campanha Gaúcha, também denominado Pampa Gaúcho, com predomínio do bioma pampa. O clima é do tipo Cfa (clima temperado úmido com verão quente), conforme a classificação de Köppen-Geiger. A temperatura média mensal é de 19,5 °C (sendo 24,9 °C a média das temperaturas máximas e 14,2 °C a média das temperaturas mínimas), com precipitação média anual normal de 1.423,9 mm, com chuvas bem distribuídas ao longo do ano, com mínimo de 80,1 mm no mês de agosto e o máximo de 146,6 mm no mês de abril (ELTZ et al. 2013).

As coletas foram realizadas quinzenalmente, no período de 21 de junho a 23 de setembro de 2012. Para amostragem foram utilizadas 10 caixas contendo colônias de *A. mellífera* estabelecidas durante os meses prévios de primavera a partir de rainhas fecundadas naturalmente. As caixas foram devidamente numeradas e mantidas em local próximo à vegetação nativa e floresta plantada de *Eucalyptus* sp. Um número de cerca de 100 a 150 abelhas operárias foram coletadas

diretamente dos quadros de cria das colmeias, utilizando-se um recipiente contendo detergente neutro 1 % (v/v) diluído em água destilada. Após agitação por 1 minuto, a suspensão de abelhas e ácaros foi vertida em uma peneira adaptada, a qual permitia apenas a passagem do líquido da suspensão e dos espécimes do ácaro. Após a separação, as abelhas foram removidas e contadas. O líquido remanescente foi, então, filtrado em tecido de algodão branco para contagem e coleta dos ácaros. Determinou-se o índice de infestação de ácaros utilizando a equação $(n^{\circ} \text{ de ácaros} / n^{\circ} \text{ de abelhas}) \times 100$ (DEVLIN, 2001; TURCATO et al., 2012).

Realizado o estudo preliminar e padronizada a técnica de coleta, foram determinadas oito localidades (oito apiários), de duas regiões distintas do estado do Rio Grande do Sul, para análise da presença de vírus em *V. destructor*, sendo os municípios marcados como pontos de coleta. Na região do Pampa Gaúcho foram determinados sete pontos de coleta: 1- São Gabriel (30° 20' 11" S / 54° 19' 12" O), 2 -Vila Nova do Sul (30° 20' 38" S / 53° 52' 58" O), 3- Santa Margarida do Sul (30° 20' 19" S / 54° 04' 15" O), 4 – Bagé (31° 19' 53" S / 54° 06' 25" O), 5- Hulha Negra (31° 24' 15" S / 53° 52' 10" O), 6- Candiota (31° 33' 29" S / 53° 40' 21" O), 7- Dom Pedrito (30° 58' 58" S / 54° 40' 23" O). Na região Metropolitana de Porto Alegre, realizou-se coleta em um ponto: 8- Barão do Triunfo (30° 23' 18" S / 51° 44' 01" O) (Figura 8).



Figura 8- Pontos de coleta das amostras de *V. destructor*.

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR

Os ácaros coletados em cada ponto foram armazenados em tubos contendo 300 μ L de RNA later - Ambion[®], conservados em gelo desde a coleta até o processamento no laboratório, na Universidade Federal do Pampa – *Campus* São Gabriel-RS. Procedeu-se a extração do RNA total das amostras, utilizando-se o kit de extração ReliaPrep[™] RNA Tissue Miniprep System (Promega). Após a extração, o RNA total foi quantificado em ng. μ L⁻¹ no espectrofotômetro NanoVue[™] Plus (GE Healthcare Life Sciences) e o eluído (15 μ L) armazenado a – 80 °C. Com base nos resultados da quantificação, as amostras tiveram suas concentrações padronizadas

e foram submetidas à reação de síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se oligonucleotídeo poli dT como primer e MMLV (Invitrogen™) como transcriptase reversa.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS VÍRUS PRESENTES EM *V. destructor*

O cDNA sintetizado foi submetido à Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) utilizando-se 10 pares de *primers* em reações individuais, onde 9 pares eram específicos para vírus e 1 par para amplificação de gene endógeno, sendo estes: vírus da paralisia aguda (ABPV), da realeira negra (BQCV), da paralisia crônica (CBPV), *Slow bee paralysis virus* (SBPV), da asa deformada (DWV), o vírus israelense da paralisia aguda (IAPV), o vírus caxemira (KBV), vírus *Varroa destructor* -1 (VDV-1), da cria ensacada (SBV), multi-vírus VP1a (DWV / VDV-1 e Kakugo – KV) e actina de *V. destructor* (controle endógeno) (Tabela 3). Cada reação teve um volume final de 25 µL, contendo 1 U de enzima Taq-polimerase (Invitrogen™). As condições de ciclagem para a reação de PCR, no caso de *primers* previamente publicados, seguiram as recomendadas da publicação. Para os oligonucleotídeos desenhados para este trabalho foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 50 segundos; hibridização a 58 °C durante 1 minuto e 22 extensão a 72 °C por 1 minuto. Findada a ciclagem, a reação concluiu-se com uma fase de extensão final durante 6 minutos a uma temperatura de 72 °C. Após a

amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, coradas com GelRed (Biotium) e analisadas sob luz UV.

As imagens foram obtidas em fotodocumentador, onde a presença ou ausência de bandas denotou a presença ou ausência de determinado tipo viral, respectivamente. Para verificar a eficiência do cDNA sintetizado, ou seja, como controle positivo, realizou-se a reação de PCR utilizando-se um par de *primers* específico para actina de varroa.

Tabela 3. Primers utilizados na reação de PCR.

Vírus	Primers (5' → 3' sequência) ²	Número de Acesso do GenBank	Tamanho do Fragmento (pb)	Referência
ABPV	ABPV-F (5'-TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA-3') ABPV-R (5'-GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT-3')	AF150629	900	CHEN et al.,2006
BQCV	BQCV-F (5'-TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC-3') BQCV-R (5'-GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC-3')	JN542437 JN542438 JN542439	494	CHOE et al.,2012
CBPV	CBPV-F (5'-TCAGACACCGAATCTGATTATTG-3') CBPV-R (5'- ACTACTAGAAACTCGTCGCTTCG-3')	AB682799	335	BLANCHARD et al., 2007; 2009
IAPV	IAPV-F (5'-CGATGAACAACGGAAGTTT-3') IAPV-R (5'- ATCGGCTAAGGGGTTTGT-3')	NC-009025	767	COX-FOSTER et al.,2007; BLANCHARD et al.,2008; PALACIOS et al. 2008.
KBV	KBV-F (5'- GATGAACGTCGACCTATTGA-3') KBV-R (5'- CAGTTAAGGGGTGTTGTTGC-3')	JN-542433 JN-542434 JN-542435	276	CHOE et al.,2012
VDV1	VDV1-F (5'-CGAAACGAAGAGAGCATGTAT-3') VDV1-R (5'-CGACTCTTCCCCAGCTAAG-3')	KC-786222	1129	**
SBV	SBV-F (5'-ACCAACCGATTCTCAGTAG-3') SBV-R (5'-TCTTCGTCCACTCTCTCATCAC-3')	JN-542440 JN-542441 JN-542442	128	CHOE et al.,2012
SBPV	SBPV-F (5'- AGCGCTTTAGTTCAATTGCC-3') SBPV-R (5'- AGACATCATCATTTTCAGGCTGC-3')	NIGU-938761	623	* *
V_destructor_Actin *	Actin-F (5'-ATGACTCCATGCCGATGAAT-3') Actin-R (5'-GCCGTGCTTTCTCTATACGC-3')	AB-242568.1	254	* *
DWV / VDV1 / KV (Multi-virus VP1a)	DWV VP1 a-F (5'-CTCGTCATTTTGTCCCGACT-3') DWV VP1a-R (5'-TGCAAAGATGCTGTCAAACC-3')		424	WILLIAMS et al. 2009
* controle endógeno ** Desenhados pelo grupo de pesquisa de sanidade apícola				

4 RESULTADOS

O estudo prévio da prevalência de *V. destructor* no apiário localizado em São Gabriel-RS, no período de 21 de junho a 23 de setembro de 2012, demonstrou que os níveis de infestação foram relativamente baixos e estáveis, não atingindo 10 %, sendo o nível médio de infestação de 4 % (Figura 9).

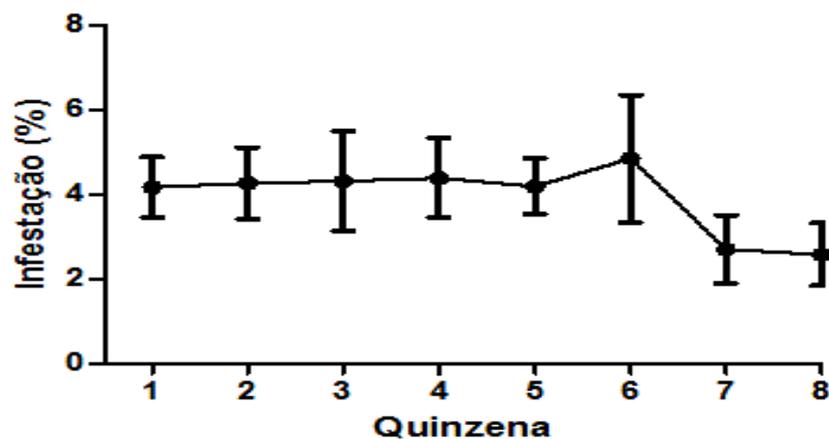


Figura 9- Estimativa de infestação de *V. destructor* em apiário localizado em São Gabriel. De 21 de junho a 23 de setembro de 2012. Método proposto por Devlin (2001) com modificações.

O índice de infestação nos apiários no momento da coleta variou entre 1,86 % e 5,79 %, sendo o índice médio de infestação de 3,41 %. O apiário da cidade de São

Gabriel apresentou menor índice de infestação, contrapondo-se ao município de Hulha Negra, que apresentou maior índice (Figura 10).

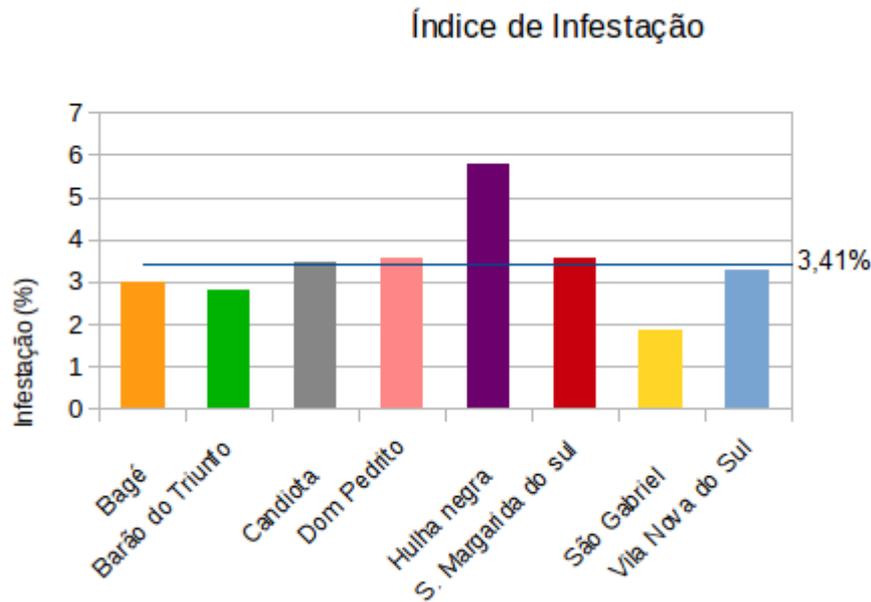


Figura 10- Estimativa de infestação de *V. destructor* nos apiários no momento da coleta.

Quanto às amostras de *V. destructor* analisadas, em somente três municípios pode-se confirmar a presença de vírus. No município de São Gabriel obteve-se *amplicons* com o *primer* multi-vírus VP1a, o qual pode amplificar sequências dos vírus VDV-1, DWV e KV. Foram realizadas reações de PCR com *primers* para o vírus VDV, obtendo-se *amplicons*. Sendo assim, as amostras de varroas do apiário gabrielense apresentaram o vírus VDV, o que não exclui a possibilidade de uma co-infecção com os vírus DWV ou KV, uma vez que a presença dos mesmos não foi testada. As amostras dos municípios de Bagé e Barão do Triunfo apresentaram

amplicons para o vírus SBV. Nas demais amostras analisadas, por meio da metodologia utilizada, não obteve-se *amplicons* ou estes apresentavam-se abaixo do nível de detecção (Figura 11).

PONTO	ABPV	BQCV	CBPV	MULTI VIRUS VP1a	IAPV	KBV	SBPV	SBV	C+ (β -actina)
Bagé	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Barão do Triunfo	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Candiota	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Dom Pedrito	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hulha Negra	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Santa Margarida do Sul	-	-	-	-	-	-	-	-	+
São Gabriel	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Vila Nova do Sul	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C- (sem DNA molde)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 11. Análise da presença dos vírus ABPV, BQCV, CBPV, Multi- Vírus VP1a, IAPV, KBV, SBPV, SBV e VDV-1 em amostras de *V. destructor* coletadas em 8 municípios gaúchos. cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído dos espécimes de *V. destructor* e submetido à reação de PCR com primers específicos. C+ (controle endógeno) - β - actina de *V. destructor*; C- (controle negativo)- ausência de DNA molde.

5 DISCUSSÃO

Tanto no estudo prévio da prevalência de *V. destructor*, no apiário de São Gabriel - RS, como no momento da coleta das amostras do ácaro nos apiários das demais cidades, o índice de infestação apresentou-se inferior à 10 %, o que não deixa de ser alarmante, uma vez que estes dados referem-se apenas às varroas em estágio forético, ou seja, aquelas que estão parasitando abelhas adultas.

Segundo Tapia (2010), em estudos com abelhas europeias, apenas 30 a 40 % do total das varroas que parasitam uma colmeia encontram-se nas abelhas adultas, estando o grande foco de infestação, 60 a 70 % das varroas, nas células de crias. Baseado na teoria do autor anteriormente citado, considerando apenas o potencial reprodutivo do ácaro, um índice de infestação de 5,79 % (maior índice encontrado), considerando 414 abelhas e 24 varroas pode ser considerado grave uma vez que, este número de ácaros corresponde a apenas 30 % do total, sendo o índice de infestação real, neste caso, de aproximadamente 20 %. Se somado a vírus, o potencial de causar possíveis danos é aumentado. Entretanto, Vandame et al. (2002) não relaciona o índice de infestação à fertilidade da varroa e sim, que este pode estar associado à genética do ácaro, mais especificamente ao tipo de haplótipo.

Se considerarmos que uma fêmea de varroa durante sua vida pode realizar de 2 a 3 ciclos reprodutivos e, em cada ciclo originar de 1 a 2 varroas filhas reprodutivamente viáveis em células de cria de operárias e de 2 a 4 filhas viáveis em células de zangões, considerando, que este ciclo apresenta característica exponencial e tendo cada varroa filha o potencial reprodutivo descrito acima,

pode-se dizer, então, que um índice de infestação relativamente baixo como de 1,86 % (menor índice encontrado) pode ser preocupante, no longo prazo, ainda mais se considerarmos tal ácaro como possível vetor viral.

Embora a varroatose seja uma parasitose de importância mundial, as abelhas africanizadas apresentam maior resistência a este ácaro, demonstrando um certo equilíbrio entre parasita-hospedeiro, não havendo a necessidade, ao menos no estado do Rio Grande do Sul, do uso de acaricidas químicos, uma vez que o uso de tais produtos não permite às abelhas criar resistência ao ácaro, além de contaminar os produtos da colmeia, sendo o uso de medidas básicas de sanidade e o manejo adequado suficientes para manter baixos os índices de infestação pelo ácaro, minimizando os efeitos prejudiciais à colmeia.

Em relação à análise viral, verificou-se a presença de vírus nas amostras de *V. destructor* coletadas nos apiários de apenas três cidades. Na cidade de São Gabriel, obteve-se *amplicons* somente na reação de PCR utilizando os *primers* multi-vírus VP1-a (DWV / KV / VDV-1) e os *primers* VDV-1, não obtendo-se *amplicons* para os demais vírus em estudo, embora existam relatos informais de apicultores que observaram sintomas de infecção por vírus SBV em suas colmeias (Machado, com. pessoal, 2013). A presença de *amplicons* em reações com os *primers* multi-vírus VP1-a ressalta a possibilidade de uma infecção múltipla, ou co-infecção viral, uma vez que o par de *primers* utilizado tem a capacidade de reconhecer uma sequência de bases nitrogenadas comum aos três vírus em questão.

No momento da coleta, as abelhas não apresentavam agressividade excessiva, sintoma característico da infecção por vírus Kakugo – KV. Porém, a hipótese de infecção por KV não pode ser descartada, uma vez que, não foi

realizado reação de PCR com *primer* específicos para o vírus Kakugo. Entretanto, algumas abelhas do apiário gabrielense apresentavam asas deformadas, sintoma clássico de infecção por vírus DWV, fato este que pode reforçar a hipótese de co-infecção viral. Tanto o vírus Kakugo, como o DWV, terão sua presença, ou ausência, comprovadas através do sequenciamento dos *amplicons* obtidos através da reação de PCR com *primers* multi-virus VP1a. Em contrapartida, a presença do vírus VDV-1 foi testada individualmente, obtendo-se *amplicons* nas reações de PCR com *primers* específicos para vírus VDV-1, sendo este resultado esperado, uma vez que o vírus já havia sido detectado nas abelhas de tal apiário (COSTA, 2013).

O vírus VDV-1 foi primeiramente isolado no ácaro *V. destructor*, o que explica sua nomenclatura, e está geneticamente relacionado com o vírus DWV. Embora alguns autores acreditem que tanto o vírus VDV-1, como o vírus DWV, possa se replicar tanto em abelhas melíferas como no ácaro, ainda não existe um acordo sobre isto. Entretanto, tanto o vírus VDV-1 como o DWV tem o ácaro *V. destructor* como vetor viral, o que já foi comprovado por Shen et. al (2005), através de um experimento com o vírus DWV em colônias de *A. mellifera* infestadas propositalmente pelo ácaro *V. destructor*.

Nos apiários das cidades de Bagé e Barão do Triunfo obteve-se *amplicons* somente para o Vírus da Cria Ensacada (*Sacbrood virus* – SBV), embora De Miranda et al. (2013), tenha relacionado como negativa a transmissão do SBV por *V. destructor*, em estudos com abelhas europeias. O vírus SBV foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1917, por G. F. White, sendo a Cria Ensacada a primeira doença de abelhas atribuída a um vírus (AUBERT et al., 2008; TAPIA, 2010). O vírus SBV ingressa no corpo das larvas menores de 4 dias através da alimentação fornecida pelas abelhas nutrizas e, ao atingir o trato digestório da larva

através do alimento, o vírus começa a circular pela hemolinfa e passa a parasitar as células secretoras da enzima hialuronidase. Como resultado da ação viral, ocorre a formação de um líquido entre os tecidos larvais, criando uma bolsa, característica da doença, e tal líquido pressiona a larva levando-a à morte. Embora a infecção por SBV seja primariamente larval, tal vírus também pode infectar abelhas adultas, sendo neste caso assintomático, mas diminuindo o tempo de vida do inseto (AUBERT et al., 2008; TAPIA, 2010).

Nas cidades de Candiota, Dom Pedrito, Hulha Negra, Santa Margarida do Sul e Vila Nova do Sul, onde também foram coletadas amostras de *V. destructor*, não foi detectada a presença de nenhum dos vírus em estudo, ou seja, não obteve-se *amplicons* nas reações de PCR com *primers* específicos para os tipos virais em estudo, através da metodologia utilizada.

Embora não se tenha obtido *amplicons* nas amostras analisadas para os vírus BQCV (Vírus da Realeira Negra), SBPV (*Slow bee paralysis virus*), CBPV (vírus da Paralisia Crônica), ABPV (Vírus da Paralisia Aguda), KBV (Vírus Caxemira) e IAPV (Vírus Israelense da Paralisia Aguda), cabe salientar a importância de tais vírus, uma vez que muitos destes podem ser letais quando associados ao ácaro *V. destructor* como por exemplo, os vírus ABPV, KBV e IAPV, sendo tal ácaro vetor ativo destes vírus (DE MIRANDA et al., 2013).

Tanto o vírus CBPV como o ABPV são agentes causadores da paralisia em abelhas, onde o vírus CBPV infecta apenas abelhas adultas e o ABPV infecta tanto o estágio larval como adultos, tendo uma evolução muito rápida. Estes vírus encontra-se sobre as abelhas e no pólen depositado nos alvéolos, sendo necessário para o desenvolvimento da doença que o vírus penetre no corpo do inseto através da alimentação ou através de pequenos cortes na cutícula, passando a circular na

hemolinfa e depositando-se nos tecidos internos (TAPIA, 2010). Antes do surgimento de *V. destructor*, o vírus ABPV nunca havia sido detectado diretamente por sorologia em abelha adultas mortas ou em crias, persistindo em baixas concentrações, como uma infecção assintomática, o que sugere que o ácaro *V. destructor* contribui significativamente na transmissão viral. Em infecções por CBPV, não há relatos da associação de tal vírus com varroa, não tendo sido este vírus detectado em tal ácaro, o que sugere que a contribuição de *V. destructor* como vetor na transmissão viral, se houver, é pequena (AUBERT et al., 2008).

O Vírus Israelense da Paralisia Aguda – IAPV é um patógeno emergente, que foi primeiramente isolado de abelhas em Israel, o que justifica sua denominação, sendo um vírus do qual pouco se sabe sobre suas vias de transmissão, tendo sido observado que cerca de 80 % das abelhas adultas infectadas por via oral morrem em cerca de uma semana (BACANDRITSOS et. al, 2012). Esta enfermidade acomete tanto os estágios larvais como o indivíduo adulto, tendo o ácaro *V. destructor* como vetor da transmissão viral (DE MIRANDA et. al, 2013).

Na década de 70, na região da Caxemira, foi observada a presença de um tipo viral, até então desconhecido, em colmeias de *A. cerana*, o qual foi denominado Vírus Caxemira (KBV), sendo também relatada a presença de tal vírus, anos mais tarde, na Austrália. O vírus KBV pode matar tanto larvas como abelhas adultas, sendo que as larvas infectadas possuem aparência vítrea e líquida, semelhante à cria ensacada (vírus SBV), morrendo antes da operculação (TAPIA, 2010). Em testes laboratoriais, o vírus Caxemira parece ser o mais virulento de todos os vírus de abelhas conhecidos, sendo necessárias poucas partículas virais para infecção tanto de pupas como de abelhas adultas, nas quais o vírus se multiplica rapidamente

causando a morte em poucos dias, sendo a replicação viral estimulada pela inoculação de proteínas estranhas. Os testes laboratoriais explicam a existência de abelhas assintomáticas, em condições naturais e, sugerem um possível papel de *V. destructor* no estímulo da replicação do vírus KBV pela introdução de proteínas estranhas durante a alimentação ou por interromper os mecanismos imunossupressores do inseto (AUBERT et al., 2008). Sendo assim, além de ser vetor do vírus KBV, o que já foi comprovado por Chen et. al (2004), o ácaro estimula a replicação viral.

Outros vírus que merecem atenção são os Vírus da Realeira Negra (BQCV) e o *Slow bee paralysis virus* (SBPV). O vírus BQCV provoca sintomas evidentes nos estágios imaturos (larvais) de abelhas rainhas, quando estas ainda estão operculadas. Tal vírus tem incidência sazonal, ocorrendo principalmente na primavera e no verão, matando a pupa, a qual fica escura, criando uma película negra nas paredes da realeira, sintoma este que dá nome ao vírus (TAPIA, 2010). O vírus BQCV só consegue infectar abelhas operárias, tanto em laboratório como na natureza, quando associado ao protozoário *Nosema apis* (parasita intestinal de abelhas causador da nosebose), sendo assintomático nos adultos e podendo ser transmitido verticalmente pela rainha através da postura de ovos, tendo sido detectado no intestino e ovários da rainha, mas não na hemolinfa, espermateca, cabeça ou corpo eviscerado. Assim, transmissão do vírus BQCV é, em grande parte, independente do ácaro *V. destructor*, o que exclui a possibilidade deste ácaro servir como vetor viral (AUBERT et al., 2008).

Por fim, cabe ressaltar o *Slow bee paralysis virus* (SBPV), também relacionado à paralisia e intitulado como vírus lento da paralisia pois, em comparação com os vírus CBPV e ABPV, possui ação mais lenta. O vírus SBPV

parece persistir nas colônias de abelhas de forma assintomática, porém, na presença do ácaro *V. destructor*, tem sua replicação viral ativada durante a alimentação deste parasita, o qual também pode servir como vetor viral (AUBERT et al., 2008; DE MIRANDA et. al, 2013).

Assim, vários surtos de doenças virais têm sido documentados após a associação destes vírus com o ácaro *Varroa destructor*, o que causa grande preocupação em pesquisadores e principalmente em apicultores.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os índices de infestação de *V. destructor* sejam relativamente baixos nos apiários do Rio Grande do Sul e, o uso de acaricidas não seja necessário, é de fundamental importância o monitoramento das colmeias, uma vez que a associação deste ácaro com vírus patogênicos pode levar à enfermidades graves e perda das colônias.

Neste trabalho pode-se detectar a presença de dois tipos virais associados ao ácaro parasita *V. destructor* em apiários do Rio Grande do Sul, dados estes inéditos, uma vez que estudos semelhantes nunca foram realizados no Brasil ou, em abelhas africanizadas, sendo tais resultados o primeiro passo para a determinação do estado sanitário dos apiários gaúchos.

Assim, ao término deste estudo, sugere-se a criação de um plano de controle de varroas local, no qual os apicultores serão orientados e instruídos em relação à gravidade de tal doença e da necessidade de medidas sanitárias preventivas a fim de se manter a saúde das colmeias e de técnicas de manejo adequadas, visando evitar a contaminação ou recontaminação dos apiários.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar o sequenciamento das amostras amplificadas utilizando o par de primers multi-virus VP1a, afim de se confirmar a identidade da sequência amplificada neste trabalho;

Ampliar os pontos de coleta, obtendo-se amostras de ácaro *Varroa destructor* em outras regiões do estado e, analisar a presença de vírus associados;

Realizar a identificação de outros tipos virais não avaliados neste trabalho;

Realizar estudos de transmissão viral utilizando *V. destructor* como vetor.

REFERÊNCIAS

ABEMEL. Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. Maio/2014. Disponível em: http://www.beebrazil.com/inteligencia_comercial_abemel_abril.pdf. Acesso em 20 de jun. 2014.

ALLSOPP, M. **Analysis of Varroa destructor infestation of southern African honeybee populations**. 2006. 302 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de Pretoria.

ALMEIDA, L. de O. **Infecção Viral em *Apis mellifera*: Detecção molecular, expressão de AmToll-1 e proteoma diferencial**. 2011. 103 f. Tese (doutorado). Universidade Federal de Uberlândia

Anderson, D.L & J.W.H Trueman, (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24: 165-189.

ANEFA. Revista da Associação Nacional de Empresas Florestais, Agrícolas e do Ambiente. Nº17. Trimestral. Julho/agosto/setembro 2012. Lisboa: Litografia coimbra S.A, 2012. 4-5p.

AUBERT, M. et al **Virology and the Honey Bee**. Luxembourg: European Commission, 2008. 462 p.

BACANDRITSOS et al; The important honey bee viruses: A short descriptive review enhanced with recent data. **Nova Science Publishers**, 2012.

BIESMEIJER, J. C. et al. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 240-258, 2006.

BLANCHARD, P. et al. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. **Journal of virological methods**, v. 141, n. 1, p. 7-13, 2007.

BLANCHARD, P. et al. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of invertebrate pathology**, v. 99, n. 3, p. 348-350, 2008.

BLANCHARD, P. et al. Phylogenetic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the Chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographic regions. **Virus research**, v. 144, n. 1, p. 334-338, 2009.

BOECKING, O.; SPIVAK, M. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie**, v. 30, n. 2-3, p. 141-158, 1999.

CAP- Departamento Técnico. **Manual de sanidade apícola**. Federação Nacional dos Apicultores de Portugal. 2007.

CemetRS- Centro Estadual de Meteorologia. Disponível em: http://www.cemet.rs.gov.br/conteudo/154/?Conhe%C3%A7a_o_CemetRS. Acesso em 15 jan. 2014.

CHEN, Y. P. et al. Prevalence and transmission of honeybee viruses. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 1, p. 606-611, 2006.

CHOE, S. E. et al. Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 330-333, 2012.

COSTA-MAIA, F. M. LOURENÇO, D. A. L.; TOLEDO, V. A. A. **Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas**. Sistemas de Produção Agropecuária-(Ciências Agrárias, Animais e Florestais). Dois Vizinhos (PR): UTFPR, p. 45-67, 2010.

COSTA. M. F. **Avaliação sanitária de apiários do pampa para vírus da família Iflaviridae**. 2013. 35 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pampa.

COX-FOSTER, D. L. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007.

DAINAT, B.; NEUMANN, P. Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. **Journal of invertebrate pathology**,

v.112, n.3, p. 278-280, 2012.

DE MIRANDA, J. R. et al. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, 2013.

DEVLIN, S. M.. **Comparative Analyses of Sampling Methods for Varroa**. 2001. 61 f. Tese (Doutorado em Manejo de Pragas). SIMON FRASER UNIVERSITY.

ELTZ, F. L. et al. Potencial erosivo e características das chuvas de São Gabriel, RS, de 1963 a 1993. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental - Agriambi**, v. 17, n. 6, 2013.

EMBRAPA. **Desordem do Colapso das Colônias (DCC)**. Embrapa Meio-Norte. 2012. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/desordemColapso.php>. Acesso em 25 jan. 2014.

FUJIYUKI, T. et al. Kakugo virus from brains of aggressive worker honeybees. **Advances in virus research**, v. 65, p. 1, 2005.

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

GUIMARÃES, N. P. **Apicultura, a ciência da longa vida**. Belo Horizonte: Itatiaia, p. 60-80, 1989.

IBGE. **Produção brasileira de mel 2010** – IBGE. Disponível em:http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab26.pdf. Acesso em 10 jan. 2014.

LIMA, S. A. M. **A apicultura como alternativa social, econômica e ambiental para a XI mesorregião do noroeste do Paraná**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná.

LOCKE, B. et al. Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. **Ecology and evolution**, v. 2, n. 6, p. 1144-1150, 2012.

LOPES, M. T. do R. et al. Alternative apiaries shading. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 3, p. 299-305, 2011.

Maxim, L. and Arnold, G. Pesticides and bees. **EMBO reports**, 15:4. DOI: 10.1002/embr. 201338218, 2014.

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, 2005.

MORETTO, G. et al. The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud infestations in Brazil. **Apidologie**, v. 22, n. 3, p. 197-203, 1991.

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.

PASCOAL, M. A. **Avaliação da eficácia de nova estratégia de combate à varroose da abelha (*Apis mellifera*) em Portugal: tratamento combinado de acaricidas homologados**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Técnica de Lisboa.

PEREIRA, F. de M., LOPES, M. T. do R., CAMARGO, R. C. R. de, VILELA, S. L. de O. **Sistema de Produção de Mel**. Embrapa Meio-Norte. Jul/2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMe>. Acesso em 15 jan. 2014.

PEREIRA, R. A. **Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas relacionadas ao comportamento higiênico**. 2008. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo.

PETTIS, J. S. et al. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PloS one**, v. 8, n. 7, 2013.

PORTAL BRASIL. **Produção de Mel Cresce 30 % em 2010**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/governo/2011/03/producao-de-mel-cresce-30-em-2010>. Acesso em 10 jan. 2014.

RAMOS, J. M. ; CARVALHO, N. C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 6, n. 10, 2007.

ROCHA, MCLSA. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Brasília: Ibama, 2012. 81 p.

ROSENKRANZ, P. ; AUMEIER, P. ; ZIEGELMANN, B. Biology and control of *Varroa destructor*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, p. S96-S119, 2010.

SCHÖNING, C. et al. Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor*-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of experimental biology**, v. 215, n. 2, p. 264-271, 2012.

SHEN, M. et al. 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.

TAPIA, C. E. **Un nuevo concepto en Sanidad Apícola**. Buenos Aires: Editorial Dunken, 2010. 176 p.

TURCATTO, A. P. et al. Infestação pelo Ácaro *Varroa destructor* (Anderson & Trueman) (Mesostigmata: Varroidae) em Operárias Adultas e em Células de Cria de Abelhas Africanizadas *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) na Região de Franca-SP. **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 3, p. 198-203, 2012.

VANDAME, R. et al. Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. **Apidologie**, v. 33, n. 5, p. 433-446, 2002.

VIDAL, M.F. **Efeito da Seca de 2012 Sobre a Apicultura Nordestina**. Informe Rural. ETENE. Banco do Nordeste do Brasil / SA. Ano VII, n. 2, 2013.

WIELEWSKI, Priscila; DOS SANTOS, E. A. Níveis de Infestação do Ácaro *Varroa destructor* em Colônias Africanizadas Submetidas à Produção de Geleia Real e Rainhas. **Magistra**. Cruz das Almas-BA, v. 25, n. 1, p. 14-23, jan./mar. 2013.

WILLIAMS, G. R. et al. Deformed wing virus in western honey bees (*Apis mellifera*) from Atlantic Canada and the first description of an overtly-infected emerging queen. **Journal of invertebrate pathology**, v. 101, n. 1, p. 77-79, 2009.

WILLIAMS, G. R. et al. Colony Collapse Disorder in context. **Bioessays**, v. 32, n. 10, p. 845, 2010.

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Porto Alegre: Magister, 2003. 276 p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Artigo a ser submetido à Revista Ciência Rural - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria.

Identificação de Vírus que Afetam *Apis mellifera* Associados ao Ácaro Ectoparasita *Varroa destructor* em Apiários do Rio Grande do Sul

Identification of Viruses Affecting *Apis mellifera* Associated with *Varroa destructor* mite Ectoparasite Apiaries in Rio Grande do Sul

Fernanda Wiesel Garcia,¹ Camila dos Santos Hengen,³ Clarissa de Lima Barcelos,² Leoncio Batista,² Andrés Cañedo Delgado,¹ Juliano Tomazzoni Boldo.¹

1-Programa de Pós – Graduação em Ciências Biológicas - Unipampa- Campus São Gabriel ;
2- Universidade Federal do Pampa Campus São Gabriel.
fernandawiesel@bol.com.br; julianoboldo@unipampa.edu.br

Resumo

A apicultura é uma atividade de importância econômica e ambiental. Entretanto, as abelhas são suscetíveis a uma variedade de doenças. Vários são os patógenos que podem acometer abelhas melíferas, como fungos, vírus e ectoparasitas. Além disso, alguns parasitas, como ácaros, podem ser utilizados como vetores por diversos tipos virais. Tais patógenos podem causar poucos danos até o abandono total da colmeias. Assim, este trabalho objetiva verificar a existência de vírus associados ao ácaro *V. destructor* em espécimes coletados em apiários de

diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Foram realizadas coletas de ácaros em apiários localizados em oito municípios gaúchos. A partir das amostras coletadas, foi realizada extração de RNA total e síntese de cDNA. O cDNA sintetizado foi submetido à PCR utilizando-se pares de *primers* específicos para oito tipos virais que afetam abelhas, além de um par multi-específico três tipos. Pode-se identificar a presença de dois tipos virais associados ao ácaro *V. destructor*, SBV e VDV-1. Estes dados são inéditos, uma vez que estudos semelhantes nunca foram realizados no Brasil ou, em abelhas africanizadas e poderão servir de base no desenvolvimento de programas de controle deste parasita.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. *Varroa destructor*. Vírus.

Abstract

Beekeeping is an activity that has both economic and environmental importance. However, bees are susceptible to a variety of diseases that may threaten apiculture. Several pathogens that can affect honeybees, such as bacteria, fungus, viruses e parasites. Parasites, like the *Varroa destructor* mite, may serve as virus vector. These associations can cause more damage than the isolated pathogens. Within this context the objective of this work was to verify the existence of viruses associated with *V. destructor* mite specimens collected in apiaries in different regions of Rio Grande do Sul. Collections were made in apiaries located in eight cities in the state. Total RNA was extracted and cDNA synthesis was performed. The synthesized cDNA was subjected to PCR using specific primers to eight types of viruses and a multi-specific primer pair, which assesses three viral types at the same time. According to our findings, there are two viral types associated with *V. destructor* mite. in the assayed apiaries. The obtained data are novel, since similar studies have never been conducted before in Brazil or using infested Africanized bee colonies, and could be used as basis in the development of

control strategies of this parasite.

Keywords: *Apis mellifera*. *Varroa destructor*. Viruses.

Introdução

A atividade apícola é comprovadamente rentável, podendo ser desenvolvida, em praticamente, todo o espaço geográfico (LIMA, 2005). O Brasil apresenta um excelente potencial apícola conferido por seu clima e flora bastante diversificada e pela presença de abelhas africanizadas, polihíbridas resultantes do cruzamento entre abelhas africanas e abelhas europeias (PEREIRA et al., 2003).

As abelhas polihíbridas são mais agressivas, porém apresentam alta capacidade de adaptação a ambientes inóspitos (PEREIRA et al., 2003). A maior resistência a doenças é uma característica marcante destas abelhas, estando amplamente relacionada ao comportamento de *grooming e selfgrooming* e ao comportamento higiênico, o qual, é um dos principais mecanismos comportamentais de resistência ou tolerância a doenças (BOECKING et al., 1999; MONDRAGÓN et al., 2005; PEREIRA, 2008).

Independente de espécie ou raça, as abelhas são suscetíveis a uma variedade de doenças e ameaças ambientais, algumas das quais tem aumentado significativamente ao longo dos últimos 5 a 10 anos (GENERSCH, 2010). É impossível identificar um único fator responsável pelas perdas de colônias em todas as regiões do mundo. Sabe-se que fatores biológicos e ambientais, atuando isoladamente ou em conjunto, tem o potencial de causar a morte prematura das colônias. Dentre estes fatores, algumas doenças desempenham um papel significativo tanto no aumento da mortalidade dos indivíduos da colônia, como no colapso da mesma (EMBRAPA, 2012; COSTA-MAIA et al., 2010; COX-FOSTER et. al, 2007).

Existem vários organismos que podem causar danos às abelhas, tanto na fase de larva quanto na fase adulta (RAMOS et al., 2007). Recentemente, o fenômeno Desordem do Colapso de Colônias (do inglês *Colony Collapse Disorder*, CCD) vem sendo relatado e caracterizado. O CCD se refere à dizimação em massa de populações de abelhas, sendo caracterizada pela ausência de abelhas vivas ou mortas na colônia. Esta síndrome foi primeiramente relatada nos Estados Unidos no inverno de 2006, já acometeu colmeias em vários países da Europa e vem se espalhando pelo mundo (EMBRAPA, 2012 ; COSTA-MAIA et al., 2010).

Embora não exista um consenso sobre as causas do declínio das colônias e as patologias sejam diversas, o ácaro *V. destructor* e patógenos associados, segundo a literatura, tem claramente um papel central, infestando praticamente todas as colônia de abelhas, sendo tal ácaro um patógeno endêmico.

V. destructor é um ectoparasita da família Varroidae e e tem seu ciclo de vida associado ao da abelha melífera (para uma completa revisão, veja ROSENKRANZ et al., 2010). Os danos causados ao organismo parasitado são consideráveis, provocando uma intensa anemia nas abelhas adultas que durante seu estado larval foram parasitadas, assim como asas deformadas, menor peso corporal, dentre outros efeitos deletérios. Ou seja, crias infestadas são prejudicadas em seu desenvolvimento por terem seu conteúdo proteico diminuído durante o seu desenvolvimento, tornando-se abelhas mais fracas, menores, com a atividade de forrageamento comprometida e com longevidade reduzida (LOPES, 2011; TAPIA, 2010).

Entretanto, os prejuízos decorrentes da varroatose, doença causada por este ácaro, variam com a raça de abelhas e condições climáticas. No Brasil, a ação de *V. destructor* em colônias de abelhas africanizadas parece ser reduzido, não sendo necessárias medidas de controle, como o uso de acaricidas, e não sendo evidenciada perdas de colônias devido

unicamente à presença do ácaro. Porém, nas colônias de abelhas europeias, em muitos países da Europa, Ásia e América do Norte foi relatada grave mortalidade de colônias devido à ação de tal ácaro (ROCHA, 2012).

Embora a varroa cause poucos danos nas colônias de abelhas africanizadas no Brasil, a coexistência deste ectoparasita com determinados tipos virais pode comprometer seriamente a saúde da colônia, uma vez que, para se alimentar, o ácaro perfura a quitina da abelha, violando a barreira de proteção do inseto, permitindo a entrada para diversos patógenos, dentre eles os vírus. Somado a isso, ao sugar a hemolinfa de uma abelha infectada por um vírus, o ácaro acaba se contaminando com tal vírus e, ao parasitar outra abelha, acaba transmitindo-o ao próximo inseto, servindo como vetor viral (TAPIA, 2010).

As abelhas podem ser parasitadas por várias espécies de vírus, os quais geralmente persistem naturalmente nas colônias, em níveis baixos, não provocando sintomas visíveis na colônia, utilizando uma variedade de vias de transmissão. Porém, esse estado silencioso não é incompatível com efeitos prejudiciais, uma vez que a acumulação de perturbações individuais pode, eventualmente, levar a morte de toda a colônia (AUBERT et al., 2008; DE MIRANDA et al., 2013).

Dentre os vírus que vem causando impacto na apicultura mundial, 24 tipos já foram identificados, tendo sido a maior parte destes vírus descrita entre 1960 e 1980. Devido à possível sobreposição entre os vírus tradicionalmente descritos e as sequências virais recém-descritas, além da estreita relação entre alguns deles, os quais são considerados membros de um único grupo complexo, se reduz para cerca de 16-18 vírus verdadeiramente únicos, os quais apresentam conteúdo genético composto por RNA, excetuando-se o Vírus Filamentoso *Apis mellifera* (AmFV) e Vírus *Apis Irisdescent* (AIV) que são vírus cujo conteúdo genético é DNA (DE MIRANDA et al., 2013).

Embora os vírus descritos sejam diversos, apenas sete são considerados como capazes

de causar doenças graves em abelhas, conseqüentemente sendo estes vírus mais ativamente estudados. Entre os sete vírus mencionados encontram-se os Vírus da Paralisia Crônica (CBPV), Vírus da Paralisia Aguda (ABPV), Vírus Deformador da Asa (DWV), Vírus da Realeira Negra (BQCV), Vírus da Cria Ensacada (SBV), Vírus caxemira (KBV) e, mais recentemente, o Vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV). Notavelmente, grande parte desses vírus são vetorialmente transmitidos por *V. destructor* e os vírus ABPV e DWV só se tornaram virulentos após *V. destructor* se estabelecer nas populações de *A. mellifera*. Assim, vários vírus considerados inofensivos por muitos anos, passaram a ser patogênicos após a introdução do ácaro *V. destructor* nas colônias de abelhas (AUBERT et al., 2008; SCHÖNING et al, 2012).

Assim, estes relatos embasam o objetivo deste trabalho no que tange a verificação da relação entre o ácaro *V. destructor* e os vírus que acometem abelhas. Tais estudos relacionando *V. destructor* e vírus são amplamente realizados na Europa e nos Estados Unidos, com espécies de abelhas europeias, não tendo sido ainda realizados no Brasil, especialmente em abelhas africanizadas.

Métodos

As coletas de ácaros da espécie *V. destructor* foram realizadas em apiários de oito municípios do Rio Grande do Sul: São Gabriel, Vila Nova do Sul, Santa Margarida do Sul, Bagé, Hulha Negra, Candiota, Dom Pedrito e Barão do Triunfo. Foram escolhidas aleatoriamente cinco caixas por apiário, de onde as abelhas operárias foram coletadas diretamente dos quadros de cria das colmeias, conforme método proposto por DEVLIN (2001) e TURCATO et al. (2012).

Procedeu-se a extração do RNA total das amostras de ácaros coletados utilizando-se o

kit de extração ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega). Após a extração de RNA total, as amostras foram submetidas à reação de síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando oligo d(T) como *primer* e MML-V como transcriptase reversa. O cDNA sintetizado foi submetido à Reação em Cadeia de Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) utilizando-se dez pares de *primers* em reações individuais, onde nove pares eram específicos para vírus e um par para controle positivo (Tabela 1). Cada reação teve um volume final de 25 µL, contendo 1 U de enzima Taq-polimerase (Invitrogen™). Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, coradas com GelRed (Biotium) e analisadas sob luz UV, onde a presença ou ausência de bandas denotou a presença ou ausência de determinado tipo viral, respectivamente.

Resultado e Discussão

Em relação à análise viral, verificou-se a presença de vírus nas amostras de *V. destructor* coletadas nos apiários de apenas três cidades (Figura 1). Na cidade de São Gabriel, obteve-se *amplicons* somente na reação de PCR utilizando os *primers* multi-vírus VP1-a (DWV / KV / VDV-1) e os *primers* VDV-1, não obtendo-se *amplicons* para os demais vírus em estudo. A presença de *amplicons* em reações com os *primers* multi-vírus VP1-a ressalta a possibilidade de uma infecção múltipla, ou co-infecção viral, uma vez que o par de *primers* utilizado tem a capacidade de reconhecer uma sequência de bases nitrogenadas comum aos três vírus indicados.

No momento da coleta, as abelhas não apresentavam agressividade excessiva, sintoma característico da infecção por vírus Kakugo – KV. Porém, a hipótese de infecção por KV não pode ser descartada, uma vez que, não foi realizada reação de PCR com *primer* específicos para o vírus Kakugo. Entretanto, algumas abelhas do apiário localizado na cidade de São

Gabriel apresentavam asas deformadas, sintoma clássico de infecção por vírus DWV, fato este que pode reforçar a hipótese de co-infecção viral. Em contrapartida, a presença do vírus VDV-1 foi testada individualmente, obtendo-se *amplicons* nas reações de PCR com *primers* específicos para vírus VDV-1, sendo este resultado esperado, uma vez que o vírus já havia sido detectado nas abelhas de tal apiário (COSTA, 2013).

O vírus VDV-1 foi primeiramente isolado no ácaro *V. destructor*, o que explica sua nomenclatura, e está geneticamente relacionado com o vírus DWV. Embora alguns autores acreditem que tanto o vírus VDV-1, como o vírus DWV, possa se replicar tanto em abelhas melíferas como no ácaro, ainda não existe um acordo sobre isto. Entretanto, tanto o vírus VDV-1 como o DWV tem o ácaro *V. destructor* como vetor viral, o que já foi comprovado por Shen *et. al* em 2005, através de um experimento com o vírus DWV em colônias de *A. mellifera* infestadas propositalmente pelo ácaro *V. destructor*.

Nos apiários das cidades de Bagé e Barão do Triunfo obteve-se *amplicons* somente para o Vírus da Cria Ensacada (*Sacbrood virus* – SBV), o qual foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1917, por G. F. White, sendo a Cria Ensacada a primeira doença de abelhas atribuída a vírus (AUBERT *et al.*, 2008; TAPIA, 2010). O vírus SBV ingressa no corpo das larvas menores de 4 dias através da alimentação fornecida pelas abelhas nutrizes e, ao atingir o trato digestório da larva através do alimento, o vírus começa a circular pela hemolinfa e passa a parasitar as células secretoras da enzima hialuronidase. Como resultado da ação viral, ocorre a formação de um líquido entre os tecidos larvais, criando uma bolsa, característica da doença, e tal líquido pressiona a larva levando-a à morte. Embora a infecção por SBV seja primariamente larval, tal vírus também pode infectar abelhas adultas, sendo neste caso assintomático, mas diminuindo o tempo de vida do inseto (AUBERT *et al.*, 2008; TAPIA, 2010).

Nas cidades de Candiota, Dom Pedrito, Hulha Negra, Santa Margarida do Sul e Vila

Nova do Sul, onde também foram coletadas amostras de *V. destructor*, não foi detectada a presença de nenhum dos vírus em estudo, através da metodologia utilizada.

Embora não se tenha obtido *amplicons* nas amostras analisadas para os vírus BQCV (Vírus da Realeira Negra), SBPV (*Slow bee paralysis virus*), CBPV (vírus da Paralisia Crônica), ABPV (Vírus da Paralisia Aguda), KBV (Vírus Caxemira) e IAPV (Vírus Israelense da Paralisia Aguda), cabe salientar a importância de tais vírus, uma vez que muitos destes podem ser letais quando associados ao ácaro *V. destructor* como por exemplo, os vírus ABPV, KBV e IAPV, sendo tal ácaro vetor ativo destes vírus (DE MIRANDA et al., 2013).

Conclusão

Neste trabalho pode-se detectar a presença de dois tipos virais associados ao ácaro parasita *V. destructor* em apiários do Rio Grande do Sul, dados estes inéditos, uma vez que estudos semelhantes nunca foram realizados no Brasil ou, em abelhas africanizadas, sendo tais resultados fundamentais para a determinação do estado sanitário dos apiários gaúchos. Diante disto, ao término deste estudo, sugere-se a criação de um plano de controle de varroas local, no qual os apicultores serão orientados e instruídos em relação à gravidade de tal doença e da necessidade de medidas sanitárias preventivas a fim de se manter a saúde das colmeias e de técnicas de manejo adequadas, visando evitar a contaminação ou recontaminação dos apiários.

Figura 1. Análise da presença viral em amostras de *V. destructor*.

PONTO	ABPV	BQCV	CBPV	MULTI VIRUS VP1a	IAPV	KBV	SBPV	SBV	C+ (β -actina)
Bagé	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Barão do Triunfo	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Candiota	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Dom Pedrito	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hulha Negra	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Santa Margarida do Sul	-	-	-	-	-	-	-	-	+
São Gabriel	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Vila Nova do Sul	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C- (sem DNA molde)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 1. Análise da presença dos vírus ABPV, BQCV, CBPV, Multi- Virus VP1a, IAPV, KBV, SBPV, SBV e VDV-1 em amostras de *V. destructor* coletadas em 8 municípios gaúchos. cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído dos espécimes de *V. destructor* e submetido à reação de PCR com primers específicos. C+ (controle endógeno) - β - actina de *V. destructor*; C- (controle negativo)- ausência de DNA molde.

Tabela 1. Primers utilizados na reação de PCR.

Vírus	Primers (5' → 3' sequência) ^d	Número de Acesso do GenBank	Tamanho do Fragmento (pb)	Referência
ABPV	ABPV-F (5'-TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA-3') ABPV-R (5'-GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT-3')	AF150629	900	CHEN et al.,2006
BQCV	BQCV-F (5'-TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC-3') BQCV-R (5'-GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC-3')	JN542437 JN542438 JN542439	494	CHOE et al.,2012
CBPV	CBPV-F (5'-TCAGACACCGAATCTGATTATTG-3') CBPV-R (5'- ACTACTAGAAACTCGTCGCTTCG-3')	AB682799	335	BLANCHARD et al., 2007; 2009
IAPV	IAPV-F (5'-CGATGAACAACGGAAGGTTT-3') IAPV-R (5'- ATCGGCTAAGGGGTTTGT-3')	NC-009025	767	COX-FOSTER et al.,2007; BLANCHARD et al.,2008; PALACIOS et al. 2008.
KBV	KBV-F (5'- GATGAACGTCGACCTATTGA-3') KBV-R (5'- CAGTTAAGGGGTGTTGTTGC-3')	JN-542433 JN-542434 JN-542435	276	CHOE et al.,2012
VDV1	VDV1-F (5'-CGAAACGAAGAGAGCATGTAT-3') VDV1-R (5'-CGACTCTTCCCCAGCTAAG-3')	KC-786222	1129	**
SBV	SBV-F (5'-ACCAACCGATTCTCAGTAG-3') SBV-R (5'-TCTTCGTCCACTCTCTCATCAC-3')	JN-542440 JN-542441 JN-542442	128	CHOE et al.,2012
SBPV	SBPV-F (5'- AGCGCTTTAGTCAATTGCC-3') SBPV-R (5'- AGACATCATCATTCAGGCTGC-3')	NIGU-938761	623	* *
V_destructor_Actin *	Actin-F (5'-ATGACTCCATGCCGATGAAT-3') Actin-R (5'-GCCGTGCTTTCTCTATAACGC-3')	AB-242568.1	254	* *
DWV / VDV1 / KV (Multi-virus VP1a)	DWV VP1 a-F (5'-CTCGTCATTTGTCCCGACT-3') DWV VP1a-R (5'-TGCAAAGATGCTGCAAACC-3')		424	WILLIAMS et al. 2009
* Controle endógeno ** Desenhados pelo grupo de pesquisa de sanidade apícola				

Referências

ALLSOPP, M. **Analysis of Varroa destructor infestation of southern African honeybee populations**. 2006. 302 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de Pretoria.

AUBERT, M. et al. **Virology and the Honey Bee**. Luxembourg: European Commission, 2008. 462 p.

BLANCHARD, P. et al. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. **Journal of virological methods**, v. 141, n. 1, p. 7-13, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.021>. Acesso em: 15 jan. 2014. DOI:10.1016/j.jviromet.2006.11.021.

BLANCHARD, P. et al. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of invertebrate pathology**, v. 99, n. 3, p. 348-350, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.07.006>. Acesso em: 15 jan. 2014. DOI: 10.1016/j.jip.2008.07.006.

BLANCHARD, P. et al. Phylogenetic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the Chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographic regions. **Virus research**, v. 144, n. 1, p. 334-338, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2009.04.025>. Acesso em 15 jan. 2014. DOI: 10.1016/virusres.2009.04.025.

BOECKING, O.; SPIVAK, M.. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie**, v. 30, n. 2-3, p. 141-158, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19990205>. Acesso em 10 jan. 2014. DOI: 10.1051/apido:19990205.

CHEN, Y. P. et al. Prevalence and transmission of honeybee viruses. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 1, p. 606-611, 2006. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/72/1/606#ref-list-1>. Acesso em 10 fev. 2014. DOI: 10.1128/AEM.72.1.606-611.2006.

CHOE, Se Eun et al. Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 3, p. 330-333, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201112000067>. Acesso em 10 fev. 2014. DOI:10.1016/j.jip.2012.01.003.

COSTA-MAIA, F. M. et al. Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. **Sistemas de Produção Agropecuária-(Ciências Agrárias, Animais e Florestais)**. Dois Vizinhos (PR): UTFPR, p. 45-67, 2010.

COSTA. M. F. **Avaliação sanitária de apiários do pampa para vírus da família Iflaviridae**. 2013. 35 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pampa.

COX-FOSTER, D. L. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse

disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/content/318/5848/283.short>. Acesso em 15 fev. 2014. DOI: 10.1126/science.1146498

DE MIRANDA, J. R. et al. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, 2013. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.22.

DEVLIN, S. M. **Comparative Analyses of Sampling Methods for Varroa**. 2001. 61 f. Tese (Doutorado em Manejo de Pragas). Universidade Simon Fraser.

EMBRAPA. **Desordem do Colapso das Colônias (DCC)**. Embrapa Meio-Norte. 2012. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/desordemColapso.php>. Acesso em 25 jan. 2014.

GENERSCH, E. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 87-97, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-010-2573-8#page-1>. Acesso em 15 fev. 2014. DOI: 10.1007/s00253-010-2573-8.

LIMA, S. A. M. de. **A apicultura como alternativa social, econômica e ambiental para a XI mesorregião do noroeste do Paraná**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná.

LOPES, M. T. do R. et al. Alternative apiaries shading. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 3, p. 299-305, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1983-40632011000300008&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em 20 jan. 2014. DOI: 10.5216/pat.v41i3.8919.

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, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2005022>. Acesso em 22 jan 2014. DOI: 10.1051/apido:2005022.

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. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/82/13/6209.full.pdf+html>. Acesso em 22 jan. 2014. DOI: 10.1128/JVI.00251-08.

PEREIRA, F. de M., LOPES, M. T. do R., CAMARGO, R. C. R. de, VILELA, S. L. de O. **Sistema de Produção de Mel**. Embrapa Meio-Norte. Jul/2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMe>. (Acesso em 15 de janeiro de 2014).

PEREIRA, F. de M. **Desordem do Colapso das Colônias (DCC)**.Embrapa Meio-Norte. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/desordemColapso.php>. Acesso em 25 jan. 2014.

PEREIRA, R. A. **Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas relacionadas ao comportamento higiênico**. 2008. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências).

Universidade de São Paulo.

RAMOS, J. M. ; CARVALHO, N. C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 6, n. 10, 2007.

ROCHA, MCLSA. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Brasília: Ibama, 2012. 81p.

ROSENKRANZ, P. ; AUMEIER, P. ; ZIEGELMANN, B. Biology and control of Varroa destructor. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, p. S96-S119, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>. Acesso em 05 jan. 2014. DOI: 10.1016/j.jip.2009.07.016.

SCHÖNING, C. et al. Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards Varroa destructor-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of experimental biology**, v. 215, n. 2, p. 264-271, 2012. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/content/215/2/264.short>. Acesso em 05 jan. 2014. DOI:10.1242/jeb.062562.

TAPIA, C. E. **Un nuevo concepto en Sanidad Apícola**. Buenos Aires: Editorial Dunken, 2010. 176 p.

TURCATTO, A. P. et al. Infestação pelo Ácaro Varroa destructor (Anderson & Trueman) (Mesostigmata: Varroidae) em Operárias Adultas e em Células de Cria de Abelhas Africanizadas *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) na Região de Franca-SP. **EntomoBrasilis**, v. 5, n.3, p. 198-203, 2012. 6p. Disponível em: <http://www.ebras.bio.br/periodico/ojs/index.php/ebras/article/viewArticle/ebrasilis.v5i3.195>. Acesso em 20 jan 2014.

VIDAL, M.F. **Efeito da Seca de 2012 Sobre a Apicultura Nordestina**. Informe Rural. ETENE. Banco do Nordeste do Brasil / SA. Ano VII, n. 2, 2013.

WILLIAMS, G. R. et al. Deformed wing virus in western honey bees (*Apis mellifera*) from Atlantic Canada and the first description of an overtly-infected emerging queen. **Journal of invertebrate pathology**, v. 101, n. 1, p. 77-79, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.01.004>. Acesso em 15 jan. 2014. DOI: 10.1016/j.jip.2009.01.004.

APÊNDICE 2: Tabela de Prevalência de Varroa no momento da coleta

MUNICÍPIO	NÚMERO DE ABELHAS	NÚMERO DE VARROAS	DATA DA COLETA	ÍNDICE DE INFESTAÇÃO	
SÃO GABRIEL	909	22	19.09.13	2,42	MÉDIA 1,86
	1367	18	26.09.13	1,31	
BAGÉ	431	13	23.10.13	3,01	
B. do TRIUNFO	430	12	22.10.13	2,79	
HULHA NEGRA	414	24	28.11.13	5,79	
CANDIOTA	718	25	28.11.13	3,48	
VILA NOVA	456	15	06.12.13	3,28	
SANTA MARGARIDA	475	17	06.12.13	3,57	
DOM PEDRITO	700	25	20.12.13	3,57	

APÊNDICE 3: Tabela de Reagentes da Reação de PCR

REAGENTE	QUANTIDADE (1 amostra)
Taq-Polimerase (Invitrogen™)	0,2 µL
H ₂ O	17 µL
Tampão 10X (MgSO ₄)	2,5 µL
Mg ²⁺	2 µL
dntp	1 µL
<i>Primer</i> (R)	1 µL
<i>Primer</i> (F)	1 µL
cDNA	1 µL
Volume total: 25 µL	