

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**RAFAEL HENCKE TRESBACH**

**Estabelecimento de um protocolo para detecção de *Nosema apis* e *Nosema ceranae* a partir de amostras de mel**

**São Gabriel  
2014**

**RAFAEL HENCKE TRESBACH**

**Estabelecimento de um protocolo para detecção de *Nosema apis* e *Nosema ceranae* a partir de amostras de mel**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

**São Gabriel  
2014**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

T796e Tresbach, Rafael Hencke

Estabelecimento de um protocolo para detecção de Nosema apis e Nosema ceranae a partir de amostras de mel / Rafael Hencke Tresbach.

46 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA, 2014.

"Orientação: Juliano Tomazzoni Boldo".

1. Nosema apis. 2. Nosema ceranae. 3. Mel. 4. Apis mellifera. 5. Detecção por PCR. I. Título.

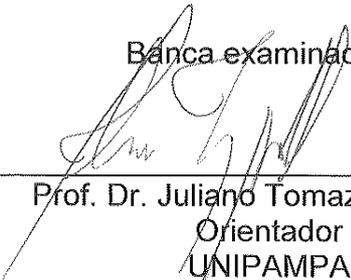
RAFAEL HENCKE TRESBACH

**Estabelecimento de um protocolo para detecção de *Nosema apis* e *Nosema ceranae* a partir de amostras de mel**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

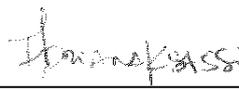
Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 22 de agosto de 2014.

Banca examinadora:



---

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo  
Orientador  
UNIPAMPA



---

Dr.ª. Adriana Koslovski Sassi  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo  
UNIPAMPA

Para aqueles que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos, meus pais Frederico e Patrícia. A alguém que é e sempre será um exemplo para mim, minha amiga Sarah. A vocês, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTO

Apesar de não ter tido o devido mérito, acredito que devemos muito sobre estudos acerca do DNA à Rosalind Franklin. Não fossem suas pesquisas, talvez não estivéssemos onde estamos no campo da biologia molecular atualmente. Graças à ela, sabemos que a estrutura do DNA é helicoidal. Aos outros pesquisadores e seus estudos acerca do DNA, seus padrões de herança, variação e organização, principalmente, devemos também agradecer. Cada um têm sua importância nos estudos desta molécula. Kary Mullis também merece um pouco de destaque pelos seus estudos sobre a reação em cadeia da polimerase, que é largamente utilizada neste trabalho. É, eu sei que sou confuso. Aos cientistas, o meu agradecimento por seus estudos e descobertas, que nos proporcionam oportunidades de realizarmos novos estudos e novas descobertas na Ciência!

Ao meu orientador, Professor Juliano, por ter aceitado me orientar na metade de outro trabalho que no final não deu certo. Por realmente desempenhar seu papel de orientador e não ficar apenas na parte burocrática, mas também ser parceiro de bancada. Por me tranquilizar nos momentos mais críticos, encorajar nas horas de desânimo e também seu incentivo em diversos momentos.

Ao Professor Andrés, por aceitar fazer parte da banca deste trabalho, fornecer material, e também pelas dicas durante o desenvolvimento deste.

À Dra. Adriana Sassi, por aceitar fazer parte da banca deste trabalho. Também tenho que lhe agradecer por ter sido quem me ensinou a trabalhar com o DNA, quem me ensinou a fazer PCRs, quem me ensinou muito do que sei atualmente sobre trabalhar com a genética e a biologia molecular. Também sou grato por tuas idéias e incentivos, por irradiar vontade e também manter o brilho nos olhos ao fazer procedimentos que tu deves ter feito várias vezes ao longo da tua carreira acadêmica e me contagiar com essa felicidade, principalmente a de ver o DNA pela primeira vez. Aqui fica registrado o meu muito obrigado!

À minha grande amiga Sarah Ramos Medeiros, que eu carinhosamente considero como uma “tia”, o meu muitíssimo obrigado de coração por me fazer descobrir mais sobre a Ciência e suas áreas, em especial às relacionadas com a biologia molecular. Por me falar sobre genômica e proteômica mesmo sem eu sequer entender o que raios significavam. Também por me incentivar em diversos momentos de dúvidas, me socorrer na hora do desespero, e por me incentivar a ir atrás da Biotecnologia quando não consegui cursar Biomedicina, me dizer que eu não iria me arrepender dessa escolha. E tu acertaste nessa. Tu és uma amiga que eu quero levar para toda a vida. E também à Debbie, porque se não fosse por ela, acho que eu não teria te conhecido.

À Professora Marília, que se mostrou um exemplo e me proporcionou algumas oportunidades que certamente levarei para a vida, o meu agradecimento.

À Professora Michele, por seu incentivo. Pelas conversas encorajadoras e sobretudo, por ser um exemplo a ser seguido! Ainda trabalharemos juntos!

Aos colegas de laboratório, em especial à Aline, à Mari (tu me socorreste nas mais diversas horas!), à Vivi, à Bruna e à Mônica.

Ao Professor Valdir, por emprestar material para este trabalho. Aos técnicos e ex-técnicos de laboratório da UNIPAMPA pelo auxílio nos mais diversos momentos de realização deste e de outros trabalhos. À Quelen e o pessoal da secretaria acadêmica por sempre responder minhas dúvidas sobre a UNIPAMPA e sobre o curso.

Aos Professores do curso de Biotecnologia (e também a alguns professores do curso de Gestão Ambiental), agradeço pela paciência e pelas aulas. Sei que não fui um bom aluno com alguns de vocês e tampouco fui fácil com outros.

À UNIPAMPA, pelas oportunidades que me proporcionou nestes quatro anos e alguns meses a mais de curso. E a quem de certa forma fez parte deste trabalho, seja direta ou indiretamente, mas não citei aqui, também agradeço.

Aos amigos de São Gabriel que levarei para sempre, agradeço pela parceria, companhia, força e amizade. Em especial para a Rose, a Mel, a Alessandra, a Luciéli, a Isis (que agora está por outras bandas...), ao Surikat, ao Daniel, a Carla e ao Danilo.

Aos amigos, simplesmente agradeço por sua amizade, paciência, e também ajudarem de alguma forma com este trabalho. E alguns sempre vão se destacar: Bruh, Wakko, João, Cintya, Cinara, Eve (que por pouco tempo ainda fui teu vovôterano! Hahaha), Lyse, Raul, Thiago, Marcello, LuB, Ketory, Marcia, Clarisse, Claudia, Marcos, Hemerson, Lisiane, Maurício, Matheus, Karina, Graziela, Fernando, Bibiane, Cid, Mist, Filipe, Zaira, Fernanda, Erika...

Aos familiares, pela paciência e apoio.

E finalmente, mas não menos merecedor, aos meus pais Frederico e Patrícia, por sempre me incentivarem, mesmo estando longe. Por acreditarem em mim, terem paciência comigo, me ensinarem boa parte do que eu sei, me apoiarem, me ouvirem falar muito sobre este trabalho, mesmo não compreendendo boa parte do que eu estou falando. E acima de tudo, por me mostrarem que, apesar de algumas qualidades diferentes, é preciso principalmente ir atrás dos nossos sonhos. Que independente de qualidades ou defeitos, basta ser forte, lutar pelo que queremos para conseguirmos, obedecendo ao tempo que for necessário. Que, sobretudo, quando queremos, vencemos as barreiras que a vida nos impõe, sejam elas físicas ou emocionais.

"Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought."

Albert von Szent-Györgyi (Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1937)

## RESUMO

As abelhas são a principal espécie responsável pela polinização e propagação de espécies vegetais. Além da polinização, produtos úteis aos seres humanos como mel, apitoxina, cera, geleia real e própolis são fornecidos pelas abelhas. Entretanto, patologias como a nosemose, que é uma das responsáveis pelo Distúrbio de Colapso de Colônias, podem levar a perdas de colmeias e declínio de produção e, conseqüentemente, perdas econômicas. O presente trabalho objetiva padronizar um método para a detecção dos microsporídios *Nosema apis* e *Nosema ceranae* em amostras de mel, visando fornecer uma alternativa rápida e confiável aos atuais métodos e utilizando o produto mais abundante da colmeia. Para este trabalho, utilizaram-se três protocolos de extração de DNA de forma a compará-los, sendo um protocolo com o uso de micro-ondas e outros dois com kits comerciais, sendo um para extração de DNA genômico de células animais e bacterianas e outro para extração de DNA genômico vegetal. Avaliamos 15 amostras de mel do estado do Rio Grande do Sul coletadas entre 2007 e 2008 e que foram consideradas positivas para presença de esporos de *Nosema* spp. por microscopia óptica, porém sem determinação de espécie. Dos três métodos que foram analisados neste trabalho, apenas o método utilizando o kit de extração de DNA genômico de plantas permitiu a amplificação de produtos dos tamanhos esperados. Das 15 amostras utilizadas, 14 mostraram amplificação para *N. apis* e 11 revelaram presença de *N. ceranae*. Com estes resultados, pudemos padronizar um método para identificação precoce das espécies de *Nosema* presentes em amostras de mel. O protocolo se mostrou rápido e eficiente e capaz de extrair DNA genômico de qualidade a partir de amostras de mel para identificação de *N. apis* e *N. ceranae* utilizando PCR.

Palavras-Chave: *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, Mel, *Apis mellifera*, Detecção por PCR.

## ABSTRACT

### **Establishment of a protocol for detection of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey samples**

Honey bee (*Apis mellifera*) is the main species responsible by pollination and vegetable propagation. Aside pollination, several products used by human beings, i. e. honey, apitoxin, wax, royal jelly and propolis are provided by honey bees. However, pathologies like nosemosis, which is one of the main causes of Colony Collapse Disorder, may be responsible for severe colony losses and overall production decline, leading to economic losses. This work aims to standardize a technique for detection of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey samples, providing a fast and reliable alternative for the current methods, using as sample the most abundant product of honey bees. For this work, three DNA extraction protocols were tested and compared. One protocol used a microwave to disrupt and further extract DNA from cells and two other protocols used commercial kits: a kit for genomic DNA extraction from animal tissue and bacteria cell samples and a kit for plant genomic DNA extraction. Fifteen honey samples collected in Rio Grande do Sul State in 2007 and 2008 were tested. *Nosema* spp. spores were previously detected using optic microscopy in the samples, but no species were reliably determined. Considering the three tested methods, only the method using the plant genomic DNA extraction kit presented was able to obtain the expected PCR products. Fourteen out of the 15 honey samples tested were positive for *N. apis* and 11 out of the 15 samples were positive for *N. ceranae*. Standardization of a technique for early detection of *Nosema* species in honey samples was possible. The developed protocol proved to be fast and efficient, allowing extraction of genomic DNA in appropriate quality from honey samples and suitable for *N. apis* and *N. ceranae* detection.

Keywords: *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, Honey, *Apis mellifera*, PCR Detection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Observação de esporos em amostra de mel por microscopia óptica ....	30
Figura 2 – Análise da extração de DNA pelo método de micro-ondas utilizando PCR .....	31
Figura 3 – Análise da extração de DNA com o uso de kit para DNA genômico utilizando PCR.....	32
Figura 4 – Análise inicial da extração de DNA com o uso de kit para DNA genômico de plantas utilizando PCR, com <i>primers</i> para <i>N. apis</i> e <i>N. ceranae</i> .....	33
Figura 5 – Análise de extração de DNA com kit para DNA genômico de plantas utilizando PCR, com <i>primers</i> para <i>N. apis</i> .....	33
Figura 6 – Análise de extração de DNA com kit para DNA genômico de plantas utilizando PCR, com <i>primers</i> para <i>N. ceranae</i> .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras utilizadas no trabalho.....	25
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados para a detecção de <i>Nosema apis</i> e <i>Nosema ceranae</i> . .....	28
Tabela 3 – Relação da presença de <i>N. apis</i> e <i>N. ceranae</i> nas amostras utilizadas. .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – por cento

°C – Graus Celsius

CCD – *Colony Collapse Disorder*, ou Colapso de Desordem de Colônias

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*, ou Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – *deoxyribonucleotide triphosphates*, ou desoxirribonucleotídeos trifosfatados

dsDNA – *double-stranded DNA*, ou DNA dupla fita

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ou Ácido Etilenodiaminotetracético

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, ou Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

g – grama(s)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Kg – quilograma

M – molar

min – minuto(s)

mL – mililitro

mM – milimolar

ng – nanograma

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase in Chain Reaction*, ou Reação em Cadeia da Polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

pmol – picomolar

RNA – *Ribonucleic Acid*, ou Ácido Ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

s – segundo(s)

ssRNA – *single-stranded RNA*, ou RNA fita simples

t – tonelada

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

µL – microlitros

µm – micrômetros

µM – micromolar

W – Watts

X – vezes

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 Apicultura: panorama mundial e nacional .....	17
2.2 CCD .....	19
2.3 <i>Nosema spp.</i> .....	20
2.4 Nosemose .....	21
2.5 Identificação molecular de patógenos .....	23
3 OBJETIVOS .....	24
3.1 Objetivo Geral .....	24
3.2 Objetivos específicos .....	24
4 METODOLOGIA .....	25
4.1 Amostras .....	25
4.2 Metodologias de Extração de DNA Avaliadas .....	25
4.2.1 Extração utilizando micro-ondas .....	25
4.2.2 Extração com kit para extração de DNA genômico .....	26
4.2.3 Extração com kit para extração de DNA genômico de plantas .....	27
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	39
7 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	40
REFERÊNCIAS .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

A abelha (*Apis mellifera*) é a principal espécie responsável pela polinização, processo que atua como agente da propagação de espécies vegetais e da produção de frutos. Com isso, se ressalta a importância ecológica e econômica destes insetos. Além disso, as abelhas fornecem produtos como o mel, a geleia real, o própolis, a cera, a apitoxina, dentre outros, e tais produtos possuem aplicabilidades nutricionais, biotecnológicas, farmacêuticas e até cosméticas.

A atividade de criação de abelhas pode ser utilizada como uma forma de complementar a renda familiar e também auxiliar na produção de vegetais, através da polinização. Entretanto, a introdução de abelhas em habitat diferentes do natural pode trazer problemas diversos, como infecções parasitárias e exposição a agentes químicos, as quais podem levar a problemas diversos, em particular o Distúrbio de Colapso de Colônias (CCD), uma doença multifatorial que apresenta grande ameaça à apicultura mundial. Dentre alguns dos possíveis agentes etiológicos do distúrbio, podemos citar vírus, ácaros, pesticidas e até mesmo microsporídios, como *Nosema apis* e *Nosema ceranae*.

Os microsporídios do gênero *Nosema*, em particular *N. apis* e *N. ceranae*, são parasitas intracelulares obrigatórios, reproduzem-se através de esporos e se alojam no trato gastrointestinal das abelhas melíferas, levando à perda de produtos produzidos por abelhas, diminuição da polinização e, também, queda populacional e redução do ciclo de vida dos hospedeiros. Atualmente, *N. ceranae* aparece mais frequente em casos de nosemose quando comparada à *N. apis*. No entanto, a virulência do primeiro é menor em relação à do segundo e estudos de relações filogenéticas indicam proximidade entre ambas, sendo *N. apis* basal a *N. ceranae*.

Pettis e colaboradores (2013) relatam que a presença de pesticidas em amostras de pólen pode contribuir para o aumento do aparecimento de nosemose em abelhas, principalmente por alterar o sistema imune, deixando-o fraco para o combate à nosemose. Outros fatores que podem contribuir para o aparecimento de nosemose é a sazonalidade, a qual é responsável pela determinação da virulência do parasita, e também é diferente entre as duas espécies em estudo.

Fungos e bactérias esporuladas podem estar presentes em amostras de mel cuja colheita não tenha seguido boas práticas, bem como em casos de presença dos agentes epidemiológicos de abelhas. A detecção precoce dos patógenos presentes nas colmeias permite um melhor controle do dano que pode vir a ser causado e,

consequentemente, subsidia a gestão do risco caso não seja feito o controle a tempo. A detecção utilizando ferramentas moleculares permite maior acurácia na identificação da espécie, o que leva a um melhor controle epidemiológico e sanitário dos apiários e permite o uso ou desenvolvimento de produtos específicos para aquele patógeno, garantindo um controle eficiente do problema. A análise de abelhas individuais não garante eficácia na detecção dos patógenos, tendo em vista que nem todas as abelhas poderão estar infectadas e selecioná-las ao acaso para testes não garante que a seleção será apenas de abelhas infectadas.

Surge, portanto, a necessidade de detectar-se a presença de patógenos não apenas nos próprios indivíduos das colônias, mas também nos produtos de contato direto destes indivíduos. Tal metodologia, além de demonstrar o estado sanitário da colmeia, pode ser utilizada para atestar a qualidade do mel ou outro produto avaliado, especialmente em relação às boas práticas de extração.

Portanto, faz-se necessária a padronização de um protocolo de extração de DNA de amostras de mel para fins de controle sanitário dos apiários.

Posto isso, o presente trabalho tem como objetivo padronizar um protocolo para detectar a presença de *N. apis* e *N. ceranae* em amostras de mel visando à identificação precoce de esporos de *Nosema* para utilização em estudos epidemiológicos do parasita.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Apicultura: panorama mundial e nacional

As abelhas melíferas (*Apis mellifera*) apresentam grande importância econômica e ecológica no nível mundial por serem os principais organismos responsáveis pela polinização de plantas, permitindo sua propagação, sejam elas de cultivo humano ou selvagens (GOBLIRSCH, *et al.*, 2013; MUÑOZ, *et al.*, 2014).

Originárias da Europa, África e Ásia, as abelhas melíferas foram trazidas ao continente americano durante as primeiras imigrações. As abelhas quando introduzidas em ambientes diferentes do seu hábitat natural podem trazer benefícios, mas também podem expor-se a situações adversas, como o risco de infecções parasitárias e o surgimento de parasitas exóticos (KOJIMA, *et al.*, 2011) e tais situações podem levar à redução da qualidade de polinização (LI, *et al.*, 2012). As espécies de parasitas exóticas de abelhas são ameaças ambientais, afetando direta ou indiretamente os nichos ecológicos, causando problemas como degradação de ecossistemas, perdas econômicas e, também, mesmo custos no controle e contenção do problema, por vezes podendo ser elevados (KOJIMA, *et al.*, 2011).

Em algumas regiões brasileiras predomina a agricultura de subsistência, ou seja, aquela que garante a evolução socioeconômica das famílias rurais, mantida pelo pequeno produtor e seus familiares. Dentro deste meio de subsistência, a principal atividade realizada é a apicultura (BOTH, 2008). Os apicultores também utilizam a atividade como apoio para a produção de cultivos alimentares, principalmente no que tange à polinização (BOTH, 2008), e como forma de complementação de renda e atividade suplementar (VIEIRA, *et al.*, 2004).

Para a adaptação biológica das abelhas, duas características se destacam: a formação e a capacidade de controle de temperatura de colônias (colmeias). Com isso, elas são capazes de se adaptar a diversos ambientes, desde os tropicais, até os temperados (COLLET, 2004). A formação de colmeias resulta em uma sociedade organizada, com uma rainha, a qual irá gerir esta sociedade e também gerar descendentes, garantindo a manutenção da população; as operárias, as quais possuem atividades distintas, como o forrageamento e a produção de alimentos, como mel e pão de abelha, e definidas principalmente pelo desenvolvimento glandular de acordo com sua idade, e também conforme a necessidade da colônia; e

os zangões, que são responsáveis pela fecundação da rainha durante o voo nupcial (CARPES, 2008).

O mel é apenas um dos produtos que a apicultura provê como atividade, e também um dos principais, junto com a geleia real, a própolis, o pólen, a cera, a apitoxina e o aluguel da colmeia em períodos de floração para auxiliar na polinização – no Rio Grande do Sul, isso é feito com macieiras (BACANDRITSOS, *et al.*, 2010; CAIONE, *et al.*, 2011). A partir de 2001, o Brasil começou a exportar sua produção de mel, levando a um crescimento da atividade apícola (MOURA, 2010). De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, nos anos de 2002 e 2003 a produção brasileira de mel cresceu em 6.027.072 Kg, totalizando um aumento de R\$ 46.457.992,00 (IBGE, 2003, 2004) na comercialização de mel durante o período de um ano.

Dados do ano de 2011 apontam o Brasil como o quarto maior exportador de mel em quantidade e nos dois anos seguintes ele cai para a posição de décimo e décimo primeiro maior exportador, respectivamente (CUBA, 2014).

A produção mundial de mel no ano de 2010 foi de 1.547.216 t, no ano de 2011, foi de 1.573.028 t e no ano de 2012 foi de 1.592.701 t, segundo dados da FAO (2014), indicando um aumento na produção no período de dois anos. No ano de 2010, o Brasil foi responsável por 2,4 % da produção mundial e no ano de 2012, por 2,1%, indicando um decréscimo nestes valores.

Em 2010, segundo dados do IBGE (2011), a produção de mel no país foi de 38.017 t, sendo o Sul a maior região produtora com 16.532 t e, destas, 7.098 t são do Rio Grande do Sul, superando a produção dos estados do Paraná e de Santa Catarina.

Já no ano de 2011, o país produziu 41.578 t de mel, sendo destes 16.155 t na região Sul e 6.985 t no Rio Grande do Sul, ainda sendo o principal estado em produção (IBGE, 2012). Em comparação com os valores para o ano de 2010, o RS apresenta um decréscimo de 113 t e a região que dominou a produção nesse ano é a Nordeste, que produziu 16.911 t.

Em relação ao ano de 2012, houve também decréscimo da produção, com um total produzido de 33.574 t, segundo dados do IBGE (2013). O sul passa a ocupar a posição de maior produtor, com um aumento de produção para 16.659 t, mas no RS houve queda de produção para 6.774 t. A região Nordeste, no ano de 2012, produziu apenas 7.700 t, indicando uma queda de 45,5% de produção no período de um ano.

A atividade apícola da região Nordeste, apesar de fazer uso de uma diversidade de flora apícola abundante, é bastante prejudicada pela seca, a qual leva à escassez de alimento e água para as abelhas. Isso causa o abandono dos apiários na busca de novas floradas apícolas ou a mortandade das populações que, conseqüentemente, trazem prejuízo para os apicultores. Com isso, a safra seguinte de mel fica comprometida e dependente do reestabelecimento e fortalecimento de novas colmeias quando as condições para a prática apícola tornam-se mais favoráveis. A falta de treinamento e investimento também leva os apicultores a não suplementarem suas colmeias com alimentação, que poderia resolver parte da perda de colmeias no período de seca (PEREIRA, *et al.*, 2006).

De fato, as causas que podem levar à queda de produção são várias, dentre as quais podemos citar secas (PEREIRA, *et al.*, 2006), patogenias e o Colapso de Desordem de Colônias (CCD), um problema que ocorre a nível mundial, sendo que estes problemas levam a perdas de colônias de abelhas, bem como, perdas de produção (VANENGELSDORP, *et al.*, 2009).

## 2.2 CCD

O CCD, sigla em inglês para Colapso de Desordem de Colônias (*Colony Collapse Disorder*), é um fenômeno que leva à redução drástica no número de colônias de abelhas, ameaçando a apicultura (CHEN, *et al.*, 2008; FONTBONNE, *et al.*, 2013; VANENGELSDORP, *et al.*, 2009; WHITAKER, *et al.*, 2010).

Esta doença tem diversas causas, não havendo atualmente um único agente etiológico responsável (DAINAT, *et al.*, 2012; KHOURY, *et al.*, 2011) e alguns autores afirmam tratar-se de uma doença multifatorial, com vários agentes etiológicos, podendo também ser reflexo do acúmulo de estresse nas colmeias (CORNMAN, *et al.*, 2009; KHOURY, *et al.*, 2011). Dentre os possíveis agentes, destacam-se os vírus, como o DWV (*Deformed Wing Virus*), o IAPV (*Israeli Acute Paralysis Virus*), ambos da ordem *Picornavirales* (vírus com genomas contendo ssRNA) e há relatos de vírus da família *Iridoviridae* (vírus com genomas contendo dsDNA) também atuarem como agentes causadores da CCD. Além dos vírus, ácaros do gênero *Varroa spp.*, pesticidas agrícolas e microsporídios do gênero *Nosema spp.*, em particular o *N. apis* e o *N. ceranae*, fazem parte do rol de responsáveis pelo CCD (TOKARZ, *et al.*, 2011; WHITAKER, *et al.*, 2010).

O CCD leva ao fenômeno do desaparecimento de abelhas das colônias (MUÑOZ, *et al.*, 2014; TEIXEIRA, *et al.*, 2013). A combinação de fatores como a

dieta, parasitas, doenças e pesticidas podem interagir e levar a um quadro de CCD com efeitos negativos nas colônias (PETTIS, *et al.*, 2013).

Os pesticidas agrícolas individuais ou combinados podem afetar a saúde das colmeias, causando alterações em cascatas de sinalização celular, levando as abelhas a efeitos sub-letais, tais como alterações no sexo da progênie, no desenvolvimento em geral, no comportamento reprodutivo, na mobilidade, na orientação espacial, no comportamento alimentar, no aprendizado e no sistema imune (PETTIS, *et al.*, 2013).

Em casos extremos de CCD nem sempre é possível determinar claramente o agente etiológico causador do problema, principalmente devido ao fato de que há o despovoamento rápido da colônia, restando apenas alimentos e progênes mortas, bem como nenhuma ou poucas abelhas adultas (KHOURY, *et al.*, 2011).

Fries (2010) observou que *N. ceranae* é um parasita virulento a nível de colônia e infecções causadas por esta espécie normalmente levam ao colapso de colônias caso não sejam controladas.

### **2.3 *Nosema spp.***

Os microsporídios são parasitas intracelulares membros do filo Microsporidia, o qual faz parte do reino Fungi. Inicialmente, *N. apis* e *N. ceranae* foram considerados protozoários (SAMMATARO, *et al.*, 2000). Como é característico em parasitas intracelulares obrigatórios, os genomas destes são reduzidos, carregando apenas os genes imprescindíveis para o parasitismo (CORNMANN, *et al.*, 2009; LI, *et al.*, 2012; ROUDEL, *et al.*, 2013). As infecções por *Nosema spp.* em abelhas iniciaram com *N. apis*, sendo principalmente um agente parasitológico para *A. mellifera*. Contudo, outras espécies de *Nosema* infectam também *A. mellifera*, como, por exemplo, *N. ceranae*, considerada o principal parasita para *Apis cerana*. Segundo Li e colaboradores (2012), *N. ceranae* está substituindo *N. apis* nas infecções por microsporídios em abelhas, sendo o principal parasita encontrado atualmente. Há também relatos de que a infecção por *N. ceranae* apresenta menor virulência em relação à infecção por *N. apis* (LI, *et al.*, 2012; MEDICI, *et al.*, 2012).

Os agentes parasitários do gênero *Nosema spp.* apresentam esporos, os quais são utilizados para se dispersarem entre os hospedeiros, resistirem a condições adversas do ambiente e apresentam também estruturas específicas para invasão celular (FRIES, 2010). Fries (2010) também relata que a infectividade de *N. ceranae* em *A. mellifera* ocorre porque os microsporídios em geral apresentam a capacidade de explorar múltiplos hospedeiros.

A presença de *N. ceranae* é uma problemática para os apicultores principalmente devido ao clima. *N. apis* apresenta uma sazonalidade diferente e a maioria dos problemas causados por *N. ceranae* são visíveis em meses de verão e climas quentes (BOURGEOIS, *et al.*, 2010; MARTÍN-HERNÁNDEZ, *et al.*, 2007).

A análise da subunidade 16S do gene de rRNA de *N. ceranae* sugere que *N. apis* não está filogeneticamente próximo de *N. ceranae*, mas sim de *Nosema bombi* (CHEN, *et al.*, 2009; FRIES, 2010). Entretanto, conforme descreve o mesmo autor, há relatos que afirmam a proximidade entre *N. apis* e *N. ceranae*, e também há relatos de que *N. apis* é mais próxima de *N. bombi* em relação a *N. ceranae* (VOSSBRINK e DEBRUNNER-VOSSBRINCK, 2005). Um estudo concluiu que *N. ceranae* é uma espécie irmã de *N. bombi* e que *N. apis* é o membro basal do clado (MEDICI, *et al.*, 2012; SHAFER, *et al.*, 2009).

Pan e colaboradores (2013) relatam que análises genômicas revelaram variações entre os genomas de *Nosema antheraeae*, *Nosema bombycis* e *N. ceranae*. Apesar de compartilharem a maioria dos genes, essas espécies possuem 8% de genes específicos de *N. antheraeae*, 15,7% de genes específicos de *N. bombycis* e 30,5% de genes específicos de *N. ceranae*. Relativo ao tamanho do genoma, *N. ceranae* possui um genoma menor que *N. bombycis* e maior que *N. antheraeae*. Os autores relatam terem observado duplicação gênica em *N. bombycis*, mas não observaram o mesmo em *N. antheraeae* e em *N. ceranae* e a explicação para isso é a proliferação de elementos transponíveis derivados do hospedeiro, genes que foram horizontalmente transferidos de procaríotos e a produção de duplicações em segmentos e em *tandem* (PAN, *et al.*, 2013).

Independentemente da espécie, o gênero *Nosema* é o agente causador da patologia denominada nosemose, a qual afeta abelhas e é uma das causadoras do CCD, podendo levar a perda de colmeias caso não seja devidamente controlada (CHEN, *et al.*, 2009).

## 2.4 Nosemose

A nosemose é a doença contagiosa causada por microsporídios do gênero *Nosema* que afeta abelhas e que pode levar ao enfraquecimento de colônias (em especial *N. apis*, *N. ceranae* e *N. bombis* para as abelhas do gênero *Apis*). A transmissão desse microsporídio ocorre por via fecal-oral, sendo disseminada através de esporos. A nosemose causa desordens no trato digestivo, redução no ciclo de vida das abelhas, diminuição no tamanho populacional das colônias, bem como a redução de produtos produzidos por abelhas e também da polinização

(CARLETTO, *et al.*, 2013; CHEN, *et al.*, 2008; CHEN, *et al.*, 2009; FONTBONNE, *et al.*, 2013).

Bourgeois e colaboradores (2010) relatam que os sintomas de nosemose causada por *N. apis* são mais evidentes em relação aos sintomas cujo agente patológico é *N. ceranae*. Dentre os sintomas, podemos citar um grande número de abelhas mortas, evidências de distúrbios digestivos, como diarreia, nas colmeias. Já em *N. ceranae*, os sintomas de infecção são menos evidentes, sendo o sintoma primário o baixo crescimento e a diminuição do número de indivíduos da colônia.

Para compreender a epidemiologia de agentes patológicos, como descreve Fries (2010), é necessário analisar em nível de indivíduo e em nível de colônia. Em nível individual, as doenças larvais podem ser altamente virulentas em relação ao nível de colônia, podendo levar à morte mais facilmente no primeiro caso do que no segundo. Observa-se um padrão sazonal de prevalência do agente patológico, e isso sugere que há diferenças entre parâmetros epidemiológicos, como rotas e taxas de transmissão de *N. apis* e *N. ceranae* (FRIES, 2010).

Os esporos do grupo de parasitas *Nosema spp.* são ingeridos pelas abelhas no processo de limpeza (quando elas removem os membros doentes ou mortos da colmeia), através da água ou também através de abelhas infectadas que acabaram morrendo (CHEN, *et al.*, 2009), se alojando no trato gástrico, para então germinarem nas células epiteliais, onde vão se reproduzir e esporos maduros serão lançados com as fezes, contaminando a colônia inteira. Este processo leva à inibição de processos de transcrição envolvidos com a resposta imune, bem como a indução de um estresse energético (ROUDEL, *et al.*, 2013; TEIXEIRA, *et al.*, 2013).

A nosemose, quando iniciada no outono, torna a hibernação deficitária e, conseqüentemente, afeta o desempenho das abelhas na próxima primavera (PETTIS, *et al.*, 2013). Casos de nosemose podem ser agravados pela presença de pesticidas no pólen, os quais podem, conforme mencionado anteriormente, levar a efeitos sub-letais em abelhas. Conforme publicado no trabalho de Pettis e colaboradores (2013), 22,9% dos pesticidas estudados podem agravar a infecção por *Nosema spp.*, levando a prevalência de nosemose nas colônias. Os autores também observaram que dois fungicidas e dois acaricidas utilizados para controlar a infestação de *Varroa spp.* nas colmeias resultaram em alterações no sistema imune das abelhas.

O fungicida clorotalonil e o pesticida piraclostrobina, bem como os acaricidas 2,4-dimetilfenil formamida e fluvalinato são os que aumentaram a suscetibilidade à

nosemose em abelhas, levando à conclusão de que alguns fungicidas podem afetar mais o sistema imune de abelhas em relação a outros pesticidas (PETTIS, *et al.*, 2013). Apesar de alterarem vias de sinalização celular do sistema imune, esses pesticidas também podem ser letais para as abelhas, dependendo da dose administrada, bem como, levar elas à susceptibilidade de outras doenças que compõem as causas da CCD (PETTIS, *et al.*, 2013).

## 2.5 Identificação molecular de patógenos

Como visto anteriormente, a infecção por *Nosema* spp. pode levar à perda de colônias, principalmente pelas vias de contaminação já salientadas. A identificação precoce do agente etiológico auxilia no controle sanitário da colmeia e a evitar a disseminação do patógeno, que pode levar à perda total da colmeia.

No mel pode haver a presença de micro-organismos, dentre eles leveduras, fungos filamentosos e bactérias formadoras de esporos e este produto pode ser contaminado antes, durante ou após a colheita pelo apicultor (PIRES, 2011).

A presença de micro-organismos em amostras de mel pode ser um fator de transmissão destes para a colmeia, levando a propagação da doença dentro desta e também a outras colmeias.

Um dos parâmetros da qualidade do mel é a presença de micro-organismos (PIRES, 2011). Conseqüentemente, a presença de esporos de *Nosema* pode diminuir a qualidade deste produto e métodos de detecção da presença de esporos são indispensáveis não só para garantir a qualidade final do produto, mas também a sanidade dos apiários.

Michalczyk e colaboradores (2011) realizaram experimento de detecção de *Nosema* através de microscopia óptica e compararam os resultados com a detecção através de métodos moleculares. Os autores observaram que as técnicas moleculares apresentaram maior nível de acurácia na detecção em comparação com análises por microscopia, principalmente na detecção da espécie do patógeno, a qual é crucial para a escolha de uma forma de prevenção mais precisa.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Padronização de um protocolo de extração de DNA a partir de amostras de mel provenientes de apiários do Estado do Rio Grande do Sul, visando à detecção de *Nosema apis* e *Nosema ceranae* por PCR.

#### **3.2 Objetivos específicos**

**3.2.1** Padronizar um protocolo para a extração de DNA de amostras de mel provenientes de apiários do Estado do Rio Grande do Sul;

**3.2.2** Padronizar condições para detecção de *Nosema apis* e *Nosema ceranae* por PCR.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram amostras de méis extraídos por apicultores nos anos de 2007 e 2008 gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Aroni Sattler (UFRGS). A partir destas amostras, identificamos esporos por meio de microscopia óptica (Olympus IX71, Olympus Corporation, Japão) cuja morfologia permitiu a identificação do gênero *Nosema*. Foram utilizadas 15 amostras totais para este trabalho, conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação de amostras e suas respectivas localidades no Estado do Rio Grande do Sul.

Número	Localização	Data de coleta
1	General Câmara	11/04/2008
2	Maquiné	10/01/2007
3	Palmares do Sul	15/05/2007
4	Pântano Grande	20/03/2008
5	Pântano Grande	19/08/2008
6	Roca Sales	19/08/2007
7	São Luiz Gonzaga	11/08/2008
8	Taquara	20/06/2008
9	Taquara	05/12/2008
10	Viamão	07/01/2008
11	Viamão	12/03/2008
12	Viamão	09/04/2008
13	Viamão	11/08/2008
14	Desconhecida	2008
15	Desconhecida	2008

Fonte: Rafael Hencke Tresbach (2014).

### 4.2 Metodologias de Extração de DNA Avaliadas

#### 4.2.1 Extração utilizando micro-ondas

A extração de DNA por micro-ondas foi inicialmente descrita por Goodwin e Lee (1993) para células em geral, incluindo fungos. Abaixo, está descrito o protocolo avaliado, com alterações em relação ao descrito pelos autores.

Para a extração utilizando micro-ondas, diluiu-se em um microtubo 200  $\mu$ L de mel em 1 mL de água ultrapura. O microtubo foi agitado em um vórtex para a dissolução do mel e depois centrifugado a 6.000 RPM por 7 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente 1 mL de

água ultrapura. O microtubo foi submetido à agitação por vórtex novamente e depois centrifugado a 6.000 RPM por 7 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE (Tris 100 mM : EDTA 10 mM). O *pellet* foi agitado com o auxílio de um vórtex para eluir ao tampão TE e os microtubos foram colocados abertos no micro-ondas (Panasonic Style NN-ST652W, 900 W, Brasil) em potência máxima por 20 minutos. No micro-ondas também foi colocado um béquer contendo 500 mL de água destilada. Após, o material foi centrifugado a 6.000 RPM por 7 min e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a – 20°C até o momento de uso.

#### 4.2.2 Extração com kit para extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, utilizou-se o kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, EUA), com modificações no protocolo recomendado pelo fabricante, as quais são descritas a seguir.

Diluiu-se em um microtubo 200 µL de mel em 1 mL de água ultrapura. O microtubo foi agitado em um vórtex para a dissolução do mel e depois centrifugado a 6.000 RPM por 7 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente 1 mL de água ultrapura. O microtubo foi submetido à agitação por vórtex e depois centrifugado a 6.000 RPM por 7 min. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µg de microesferas de vidro com 10-100 µm de diâmetro e 50 µL de água ultrapura. O material foi submetido ao rompimento mecânico das células no equipamento PowerLyser™ 24 (MoBio Laboratories, Inc., EUA), com três ciclos de 1 min de agitação e 30 s de intervalo, na velocidade de 3.000 RPM a 20 °C. Após, o microtubo foi centrifugado a 6.000 RPM por 7 min e o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo e diluído em 200 µL de água ultrapura, 200 µL de *Genomic Lysis / Binding Buffer* e 200 µL de etanol 99,5%, os quais foram adicionados nesta ordem. O tubo foi incubado por 3 min a – 20°C e depois foi transferido para uma coluna de purificação. Centrifugou-se o material a 10.000 RPM por 1 min e a fração coletora foi descartada. Adicionou-se 500 µL de *Wash Buffer 2* e o microtubo foi novamente centrifugado a 10.000 RPM por 3 min e o coletor foi descartado. A coluna foi colocada em um microtubo de 1,5 mL e 200 µL de *Elution Buffer* foi adicionado. A mesma foi mantida em repouso por 1 min e depois centrifugada a 10.000 RPM por 1 min. Adicionou-se 50 µL de *Elution Buffer* e centrifugou-se a coluna a 10.000 RPM por 1 min. O material foi armazenado a – 20°C até o momento de uso.

#### 4.2.3 Extração com kit para extração de DNA genômico de plantas

A extração de DNA foi feita utilizando o kit comercial DNeasy Mini Plant (QIAGEN, Alemanha), com modificações no protocolo recomendado pelo fabricante, conforme descritas a seguir.

Para a extração de DNA, foi diluído em um microtubo 200 µL de mel em 1 mL de água ultrapura. O microtubo foi agitado em um vórtex para a dissolução do mele depois centrifugado a 6.000 RPM por 7 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente 1 mL de água ultrapura. O microtubo foi submetido à agitação por vórtex e depois centrifugado a 6.000 RPM por 7 min. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µg de microesferas de vidro com 10-100 µm de diâmetro e 100 µL de água ultrapura. O material foi submetido ao rompimento mecânico das células com três ciclos de 1 min e 30 s de agitação com intervalos de 30 s de espera, na velocidade de 3.000 RPM a 20 °C no equipamento PowerLyser™ 24 (MoBio Laboratories, Inc., EUA). Após o rompimento mecânico, o microtubo foi submetido à centrifugação a 6.000 RPM por 7 minutos. O sobrenadante foi recolhido para um novo microtubo e o microtubo com as microesferas foi descartado.

Adicionou-se 400 µL de *Buffer AP1* e 4 µL de RNase A no microtubo e este foi agitado no vórtex e incubado em banho-maria a 65 °C por 15 min. A cada 5 min, inverteu-se o microtubo. Após, adicionou-se 130 µL de *Buffer P3* e incubou-se a amostra por 5 minutos a – 20 °C. O material foi centrifugado a 14.000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para a coluna *QIAshredder Mini Spin* acoplado a um tubo coletor de 2 mL e este foi centrifugado a 14.000 RPM por 2 min. A fração coletora foi transferida para um novo microtubo de 2 mL sem perturbar o *pellet*. No microtubo, foi adicionado 1,5 volumes de *Buffer AW1* e agitou-se vigorosamente o tubo.

O material, inclusive qualquer precipitado formado, foi transferido para a coluna *DNeasy Mini Spin* acoplada a um tubo coletor de 2 mL e estes foram centrifugados a 8.000 RPM por 1 min. A fração coletora foi descartada. O procedimento foi repetido até que todo o líquido passasse pela coluna. O tubo coletor foi substituído por um novo e foi adicionado 500 µL de *Buffer AW2*. A coluna foi centrifugada a 8.000 RPM por 1 min e a fração coletora foi descartada. Novamente, adicionou-se 500 µL de *Buffer AW2* e a coluna foi centrifugada a 14.000 RPM por 2 min. O coletor foi descartado com cuidado para evitar que a fração coletora entrasse em contato com a coluna e a mesma foi colocada em um microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 100 µL

de *Buffer AE* na coluna e incubou-se a coluna à temperatura ambiente por 5 min. Após, centrifugou-se a coluna a 8.000 RPM por 1 minuto. O passo anterior foi repetido e a coluna foi descartada. A solução foi armazenada a – 20 °C até o momento do uso.

### 4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Singapura) com os *primers* para *N. apis* e *N. ceranae* descritos em Martín-Hernández e colaboradores (2007). As sequências dos *primers* e o tamanho dos *amplicons* encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Relação de *primers* utilizados para identificação da espécie de *Nosema* presente nas amostras de mel. Caudas de GC adicionadas aos marcadores estão sublinhadas.

Espécie	Primer	Tamanho do amplicon
<i>Nosema apis</i>	Direto: 5' <u>CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA</u> 3'	321 pb
	Reverso: 5' <u>CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG</u> 3'	
<i>Nosema ceranae</i>	Direto: 5' <u>GGGGGCATGTCTTTGACGTA</u> CTATGTA 3'	218 pb
	Reverso: 5' <u>GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACA</u> ACTATG 3'	

Fonte: MARTÍN-HERNANDEZ, *et al.*, 2007.

A reação foi realizada utilizando a enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen, Brasil), nas condições de 1X de *buffer*, 7,5 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de cada *primere* e 1 unidade de enzima *Taq DNA Polimerase*.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada sob as seguintes condições, para *N. apis*: 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 60 °C por 40 s e 72 °C por 60 s, com um passo de extensão final de 7 min a 72 °C. Para *N. ceranae*, utilizou-se 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 94 °C por 40 s, 60 °C por 40 s e 72 °C por 60 s, com um passo de extensão final de 7 min a 72 °C.

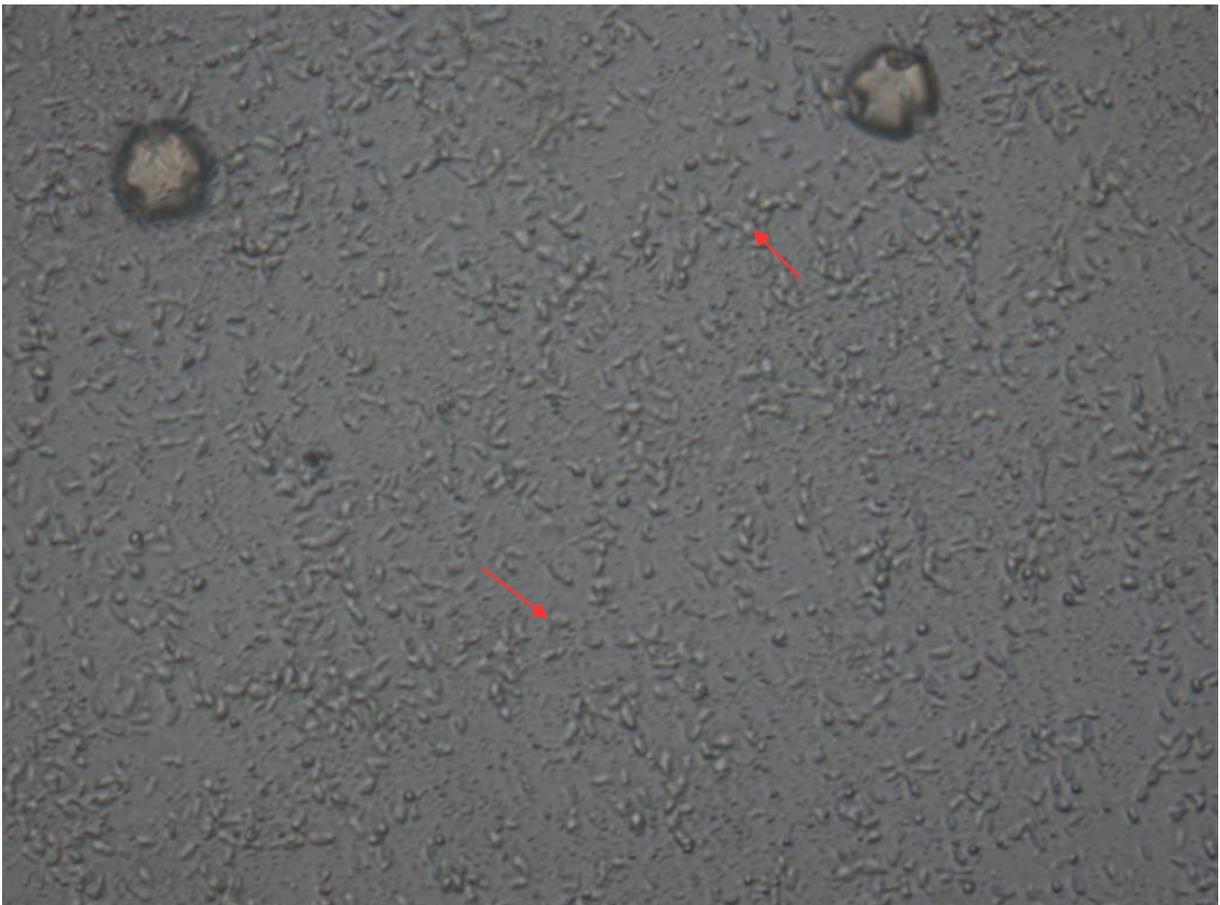
As amostras de *N. apis* e *N. ceranae* utilizadas como controle positivo foram gentilmente cedidas pela Dr<sup>a</sup>. Érica Weinstein Teixeira (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo).

Para visualizar os produtos gerados a partir da amplificação das amostras de DNA extraídas e determinar a presença ou não de *Nosema spp.*, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e para a visualização dos

*amplicons* utilizou-se o corante Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, EUA). Para análise dos fragmentos, utilizou-se como marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix 100 pb (Thermo Scientific, EUA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

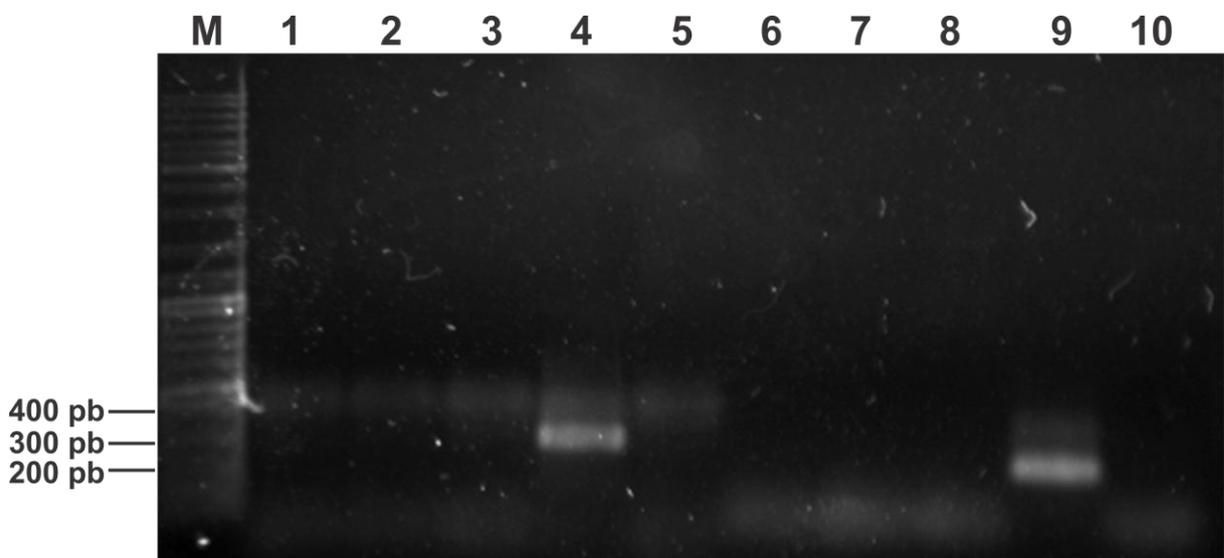
A análise por microscopia óptica nos mostrou a presença de grande quantidade de esporos nas amostras utilizadas (Figura 1). Entretanto, conforme apontado por Pires (2011), o mel apresenta micro-organismos como fungos e bactérias esporuladas e conseqüentemente, não é possível identificar-se com alto grau de certeza se os esporos observados por microscopia óptica são de *Nosema* ou de outro gênero. Outro ponto a ser destacado é a identificação não só do gênero, mas também da espécie do fungo a que esses esporos pertencem. Michalczyk e colaboradores (2011) realizaram experimentos de identificação de *N. apis* e *N. ceranae* por microscopia óptica e por PCR. Os autores observaram que a microscopia pode levar a erros de identificação, tendo em vista que o esporo é a expressão do genótipo, ou seja, sofre influência do ambiente. A identificação a nível molecular é, portanto, detentora de maior precisão e confiabilidade.



**Figura 1.** Esporos observados em amostra de mel. As setas indicam a localização dos esporos provavelmente pertencentes ao gênero *Nosema*. Aumento: 400X. Fonte: Andrés Delgado Cañedo e Rafael Hencke Tresbach (2014).

Sendo o objetivo do trabalho a identificação das espécies de *Nosema* em amostras de mel de forma rápida e confiável, procedemos com a padronização da técnica de extração de DNA genômico e amplificação por PCR utilizando *primers* específicos para ambas as espécies do gênero *Nosema* aqui avaliadas. É importante salientar que o mel foi escolhido por ser o produto da colmeia mais comercializado, ser mais suscetível a conter partículas fúngicas e de outros organismos, além de manter-se por mais tempo estável sem condições especiais de armazenamento. Neste trabalho, avaliamos três técnicas de extração de DNA de forma a verificar qual destas apresenta melhores resultados visando à detecção precoce do estado sanitário das colmeias.

A técnica de extração de DNA por meio de micro-ondas mostrou-se ineficaz para a extração de esporos de *Nosema*, apesar do que foi descrito por Goodwin e Lee (1993). Orsini e Romano-Spica (2001) também relatam a obtenção de DNA de alta qualidade com o uso de micro-ondas na extração de DNA. O uso de micro-ondas na extração de DNA é descrito como uma técnica rápida para isolamento de DNA total e o micro-ondas, uma vez que promove a ruptura da parede celular e membrana plasmática da célula, permite que o conteúdo citoplasmático seja eluído no tampão de trabalho. Neste trabalho, foi observada a amplificação de fragmentos com peso molecular diferente do esperado em comparação com o controle positivo (Figura 2).

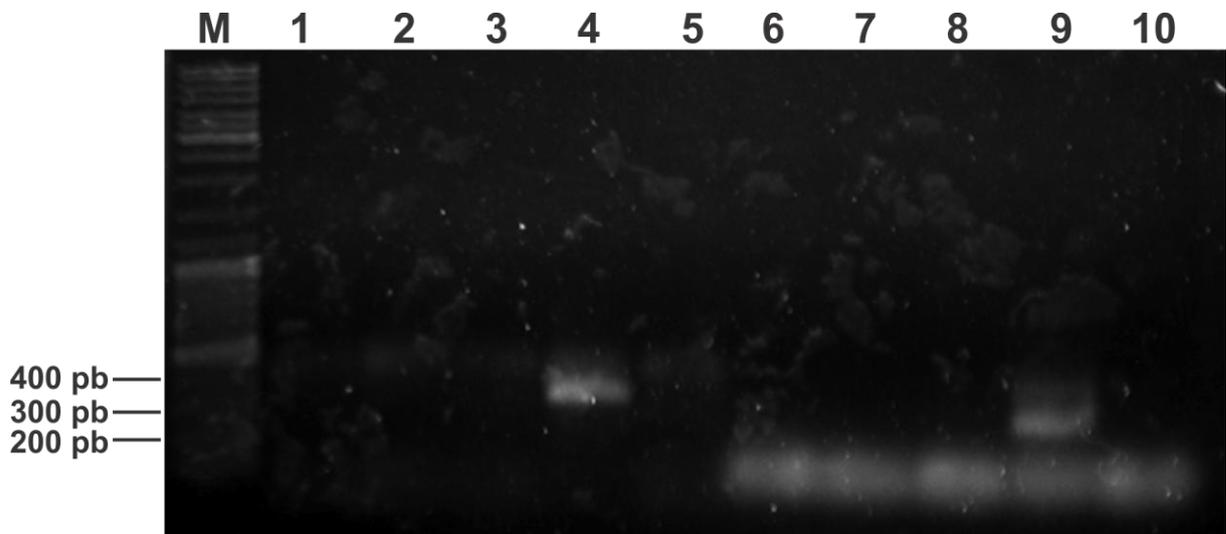


**Figura 2.** PCR de amostras de DNA extraídas a partir do mel utilizando micro-ondas. As amostras não apresentaram amplificação utilizando *primers* para *N. apis* ou *N. ceranae*, indicando que o método de extração não foi eficiente. Para fins comparativos, utilizou-se controles positivos para *N. apis* e *N. ceranae*, os quais estão nas canaletas 4 e 9, respectivamente. Os números das amostras aqui referenciados correspondem aos números descritos na Tabela 1. O grupo de amostras 1 a 5 corresponde aos *primers* para *N. apis* e o grupo 6 a 10, para *N. ceranae*. As amostras nas canaletas 1 e 6 correspondem à amostra 6; as amostras nas canaletas 2 e 7 correspondem à amostra 9; e as

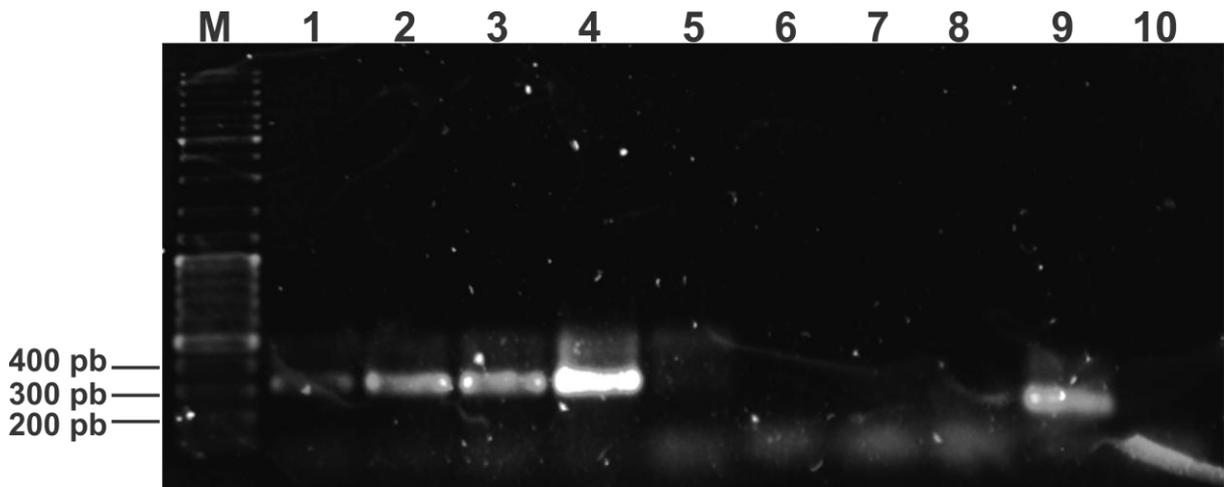
amostras nas canaletas 3 e 8 correspondem à amostra 15. As amostras 5 e 10 correspondem ao controle negativo (sem DNA molde) da PCR. Marcador de peso molecular (M): 100 pb. Eletroforese em gel de agarose 1 %. Fonte: Rafael Hencke Tresbach (2014).

O método de extração utilizando o kit comercial da Invitrogen também não demonstrou resultados satisfatórios para a detecção precoce de *Nosema* em amostras de mel, mesmo com a utilização de lise celular mecânica (Figura 3).

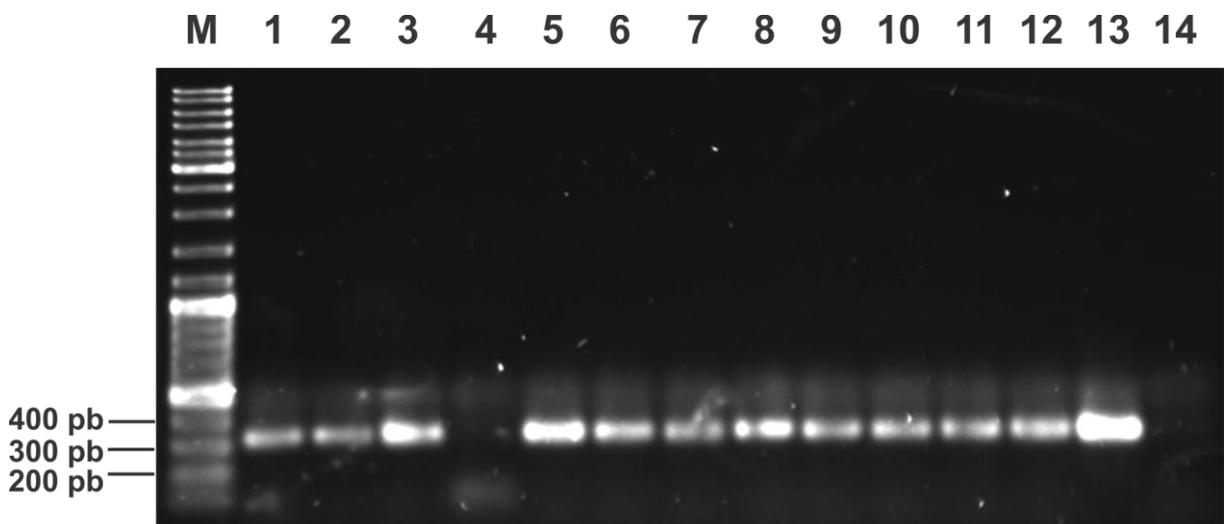
O método de extração utilizando o kit comercial para plantas da empresa QIAGEN se mostrou o método mais eficaz de extração de DNA genômico de *Nosema* spp.; a partir das amostras de mel, comparando-se as amostras com o controle positivo. Das 15 amostras testadas, 14 mostraram amplificação para os *primers* de *N. apis*, como pode ser observado nas Figuras 4 e 5. Para os *primers* de *N. ceranae*, observamos 11 amostras positivas das 15 experimentais, conforme Figuras 4 e 6.



**Figura 3.** PCR de amostras de DNA extraídas a partir do mel utilizando o o kit comercial para DNA genômico (Invitrogen, Brasil). As amostras não apresentaram amplificação utilizando *primers* para *N. apis* ou *N. ceranae*, indicando que o método de extração não foi eficiente. Para fins comparativos, utilizou-se controles positivos para *N. apis* e *N. ceranae*, os quais estão nas canaletas 4 e 9, respectivamente. Os números das amostras aqui referenciados correspondem aos números descritos na tabela 1. O grupo de amostras 1 a 5 corresponde aos *primers* para *N. apis* e o grupo 6 a 10, para *N. ceranae*. As amostras nas canaletas 1 e 6 correspondem à amostra 6; as amostras nas canaletas 2 e 7 correspondem à amostra 9; e as amostras nas canaletas 3 e 8 correspondem à amostra 15. As amostras 5 e 10 correspondem ao controle negativo da PCR. Marcador de peso molecular (M): 100 pb. Eletroforese em gel de agarose 1 %. Fonte: Rafael Hencke Tresbach (2014).



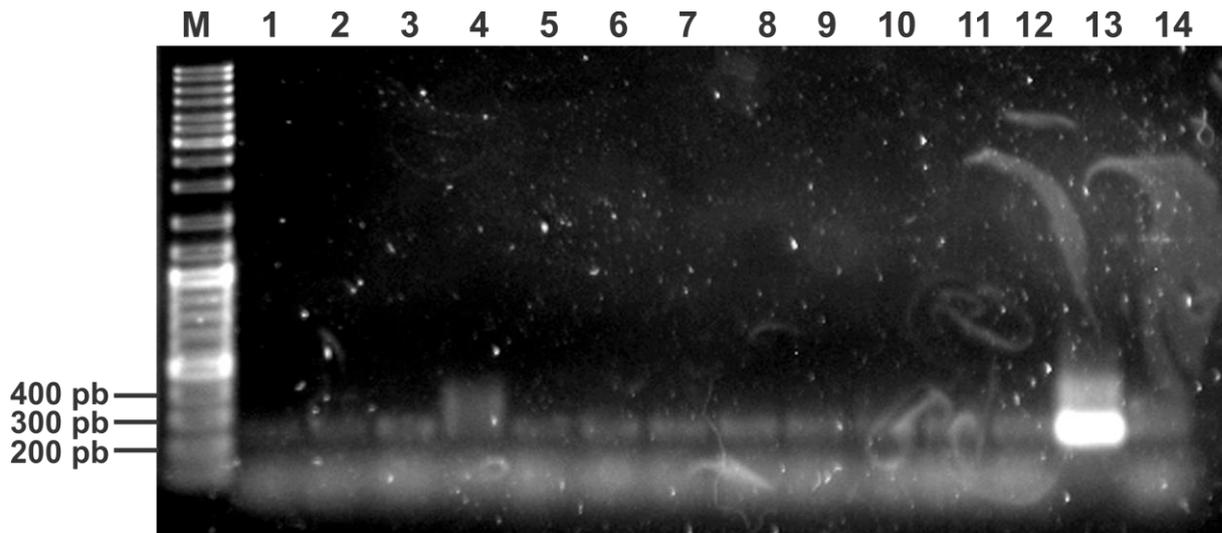
**Figura 4.** PCR de amostras de DNA extraídas a partir do mel utilizando o o kit comercial para DNA genômico de plantas (QIAGEN, Alemanha). As amostras apresentaram amplificação utilizando *primers* para *N. apis* apenas, não apresentando amplificação para *N. ceranae*. O método de extração se mostrou eficaz para a detecção de *N. apis*. Para fins comparativos, utilizou-se controles positivos para *N. apis* e *N. ceranae*, os quais estão nas canaletas 4 e 9, respectivamente. Os números das amostras aqui referenciados correspondem aos números descritos na tabela 1. O grupo de amostras 1 a 5 corresponde aos *primers* para *N. apis* e o grupo 6 a 10, para *N. ceranae*. As amostras nas canaletas 1 e 6 correspondem à amostra 6; as amostras nas canaletas 2 e 7 correspondem à amostra 9; e as amostras nas canaletas 3 e 8 correspondem à amostra 15. As amostras 5 e 10 correspondem ao controle negativo da PCR. Marcador de peso molecular (M): 100 pb. Eletroforese em gel de agarose 1 %. Fonte: Rafael Hencke Tresbach (2014).



**Figura 5.** PCR de amostras de DNA extraídas a partir do mel utilizando o o kit comercial para DNA genômico de plantas (QIAGEN, Alemanha) e *primers* para *N. apis*. As amostras apresentaram amplificação utilizando *primers* para *N. apis* e o método de extração se mostrou eficaz para a detecção de *N. apis*. Para fins comparativos, utilizou-se controle positivo para *N. apis*, o qual está na canaleta 13. Os números das amostras aqui referenciados correspondem aos números descritos na tabela 1. A amostra da canaleta 1 corresponde à amostra 14; a amostra da canaleta 2 corresponde à amostra 5; a amostra da canaleta 3 corresponde à amostra 12; a amostra da canaleta 4, à amostra 11; a amostra da canaleta 5, à amostra 4; a amostra da canaleta 6, à amostra 2; a amostra da canaleta 7, à amostra 8; a amostra da canaleta 8, à amostra 10; a amostra da canaleta 9, à amostra 1; a amostra da canaleta 10, à amostra 3; a amostra da canaleta 11, à amostra 13; e a amostra da canaleta 12, à amostra 7. A

amostra 14 corresponde ao controle negativo da PCR. Marcador de peso molecular (M): 100 pb. Eletroforese em gel de agarose 1 %. Fonte: Rafael Hencke Tresbach (2014).

Dean e colaboradores (2004) comentam que a PCR se torna complexa pela presença de inibidores nas amostras e kits comerciais visam remover esses inibidores, bem como diminuir o tempo de trabalho, com a sistematização e uso de reagentes e colunas para acelerar algumas etapas.



**Figura 6.** PCR de amostras de DNA extraídas a partir do mel utilizando o o kit comercial para DNA genômico de plantas (QIAGEN, Alemanha) e *primers* para *N. ceranae*. As amostras apresentaram amplificação utilizando *primers* para *N. ceranae* e o método de extração se mostrou eficaz para a detecção de *N. ceranae*. Para fins comparativos, utilizou-se controle positivo para *N. ceranae*, o qual está na canaleta 13. Os números das amostras aqui referenciados correspondem aos números descritos na tabela 1. A amostra da canaleta 1 corresponde à amostra 14; a amostra da canaleta 2 corresponde à amostra 5; a amostra da canaleta 3 corresponde à amostra 12; a amostra da canaleta 4, à amostra 11; a amostra da canaleta 5, à amostra 4; a amostra da canaleta 6, à amostra 2; a amostra da canaleta 7, à amostra 8; a amostra da canaleta 8, à amostra 10; a amostra da canaleta 9, à amostra 1; a amostra da canaleta 10, à amostra 3; a amostra da canaleta 11, à amostra 13; e a amostra da canaleta 12, à amostra 7. A amostra 14 corresponde ao controle negativo da PCR. Marcador de peso molecular (M): 100 pb. Eletroforese em gel de agarose 1 %. Fonte: Rafael Hencke Tresbach (2014).

González-Mendoza e colaboradores (2010) destacam que a extração de DNA de fungos de importância agrônômica pode se tornar laboriosa pela presença de parede celular que pode ser difícil de ser lisada, exigindo um passo de quebra de parede celular e membrana plasmática mais abrasivo. Por esse motivo e também pelo kit da empresa QIAGEN ser próprio para plantas, que possuem parede celular, este pode ter apresentado maior eficiência em relação aos outros dois métodos utilizados neste trabalho.

Karakousis e colaboradores (2006) destacam que um passo essencial na detecção de fungos patogênicos por meio da PCR é uma extração eficiente de DNA e isto é extremamente importante para detectar pequenas quantidades de fungos em material biológico.

Outro problema encontrado, de acordo com Karakousis e colaboradores (2006), é a complexidade da célula fúngica em relação à célula de mamíferos, a qual também é destacada por Tapia-Tussel e colaboradores (2006). As células de fungo apresentam quitina, glicanos, lipídios, peptídeos e também uma camada superficial de melanina para proteção, criando uma resistência contra digestão enzimática, quebras químicas e até mesmo luz ultravioleta. Em comparação, a célula animal apresenta basicamente uma bicamada lipídica e proteínas transmembrana. Conseqüentemente, uma quebra celular mais abrasiva se faz necessária para que se possa romper ou enfraquecer tais barreiras de proteção da célula fúngica e liberar o conteúdo citoplasmático.

Tapia-Tussel e colaboradores (2006) também destacam que normalmente são combinadas quebra mecânica e digestão enzimática ou uso de produtos químicos para a ruptura da célula, e microesferas de vidro submetidas a agitação intensa é o método usado com maior frequência para fragmentação mecânica das estruturas que protegem a célula fúngica.

O método de micro-ondas, apesar de ser utilizado para fungos em geral, conforme descrito por Goodwin e Lee (1993), não foi suficiente para a ruptura dos esporos de *Nosema* spp., sendo necessários outros passos para que a ruptura ocorra, sejam eles mecânicos ou químicos, visando enfraquecer ou romper a camada externa da célula. A ausência de etapas de purificação também pode ser um fator negativo para a PCR, tendo em vista que a presença de contaminantes que possam inibir a reação no mel não será eliminada.

O princípio da extração por micro-ondas consiste na evaporação rápida da água da célula, tornando-a frágil. No caso dos esporos presentes no mel, uma das hipóteses para que este método não tenha funcionado é a provável ocorrência de osmose, ou seja, a perda de água presente no interior do esporo em contato com o mel, um meio hipertônico.

Pela complexidade da célula fúngica, podem ser necessárias etapas extras para a ruptura das estruturas que protegem a célula e posterior exposição do núcleo celular. Conseqüentemente, um método de ruptura ou enfraquecimento de estruturas celulares que compõem a camada protetora mais abrasivo é necessário e

as plantas também apresentam similaridades em suas células, principalmente com a presença de parede celular, a qual também deverá ser rompida para a exposição do material nuclear.

O kit para extração de DNA genômico da marca Invitrogen é específico para células e tecidos animais e células bacterianas. Outras células podem necessitar de passos extras para que a camada externa da célula seja rompida, ou seja, a quebra mecânica apenas pode não ser capaz de romper ou enfraquecer a estrutura externa da célula dos esporos de *Nosema*, sendo necessários passos extras utilizando enzimas ou substâncias químicas para que essa ruptura ocorra.

Já o kit para extração de DNA genômico de plantas da marca QIAGEN foi desenhado visando à ruptura de parede celular, estrutura comum em plantas. Outro ponto positivo encontrado na utilização deste kit é a diminuição da laboriosidade na extração, permitindo a obtenção de um grande número de amostras em um período de tempo curto, bem como, a realização da PCR logo após a extração de amostras. Pode-se destacar também que a quantidade de DNA extraída foi suficiente para a reação de PCR (Figura 4), considerando a quantidade inicial de 200 µL de mel e a quantidade final de DNA extraído, em 200 µL de tampão de eluição.

A detecção de *Nosema* em abelhas melíferas até o presente momento é efetuada através de maceração de abelhas (MUÑOZ, *et al.*, 2014; TEIXEIRA, *et al.*, 2014) ou de homogenatos de abdômen de abelhas (CARLETTO, *et al.*, 2013; KLEE, *et al.*, 2007) e a problemática deste método é que as abelhas deverão ser selecionadas ao acaso para que a análise possa ser aplicada, presumindo-se a existência de patologia na colmeia ou então após a instalação do patógeno e detecção dos sintomas, não sendo um método eficiente para a detecção precoce ou que abra vias para a prevenção e o controle da patologia.

A extração de DNA de amostras de mel abre portas para detecção de outras patologias que podem acometer abelhas e levar ao CCD antes do avanço destas, levando à prevenção e diminuindo perdas de colmeias causadas por agentes etiológicos diversos. Outros fungos, bactérias, ácaros e até vírus podem estar presentes em amostras de mel, permitindo a identificação e uma avaliação do estado sanitário da colmeia, sem a necessidade da avaliação individual de abelhas, as quais deverão ser selecionadas ao acaso e nem sempre podem mostrar um panorama do estado sanitário da colmeia como um todo. O mel se mostrou um excelente meio de preservação do material ali presente, tendo em vista que as amostras utilizadas neste trabalho têm entre 6 e 7 anos. Isso pode nos fornecer

dados para a montagem de um panorama epidemiológico ao longo dos anos em abelhas, bem como, observar a evolução dos agentes patológicos, se eles permanecem o mesmo ou em algum momento há uma substituição destes.

**Tabela 3.** Correlação entre as amostras descritas na Tabela 1 e a presença de *Nosema apis* e *Nosema ceranae*.

Amostra	<i>Nosema apis</i>	<i>Nosema ceranae</i>
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	-
7	+	+
8	+	+
9	+	-
10	+	+
11	-	-
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	-

Fonte: Rafael Hencke Tresbach (2014).

Neste trabalho, esperava-se detectar *N. ceranae* em maior quantidade de acordo com dados já encontrados em amostras brasileiras (TEIXEIRA, *et al.*, 2013) e de acordo com Li e colaboradores (2012), que relatam a substituição do parasita causador da nosemose, de *N. apis* para *N. ceranae*, sendo este último o principal agente etiológico causador da patologia denominada nosemose atualmente. Entretanto, nossas análises (Tabela 3) revelaram maior presença de *N. apis*, indicando que este parasita ainda predomina em algumas regiões do país. Isso pode ser preocupante para a apicultura, já que as infecções por *N. apis* costumam ser mais virulenta em relação às infecções por *N. ceranae* (LI, *et al.*, 2012; MEDICI, *et al.*, 2012).

Teixeira e colaboradores (2013) destacam que apesar do descrito por Klee e colaboradores (2007), que afirmam que a primeira detecção de *N. ceranae* no Brasil foi em amostras de 2006, encontraram a presença deste parasita em uma amostra de zangão preservada em etanol datada de 1974. A primeira detecção de *N. apis* no

Brasil foi realizada em uma amostra do ano de 1997, sendo o primeiro relato formal da distribuição deste parasita realizado em 1993.

Klee e colaboradores (2007) também relatam a troca de hospedeiro do parasita *N. ceranae*, de *Apis cerana* para *A. mellifera*, indicando uma possível transferência horizontal de hospedeiros e como consequência a possibilidade da existência de estruturas para o início do processo de infecção e hospedagem do parasita com similaridades entre *N. apis* e *N. ceranae*. Isso pode nos fornecer padrões de amplificação cruzada, tendo em vista que há a possibilidade da existência de homologia entre os genomas de ambos os parasitas em estudo.

Teixeira e colaboradores (2013), em análises de amostras do Brasil, encontraram a presença de *N. apis* e *N. ceranae*, sendo o segundo em maior quantidade, ao contrário do encontrado neste trabalho. Apesar disso, a presença de ambos foi detectada, levando a concluir que há esporos de ambos os agentes etiológicos em amostras de abelhas que os autores analisaram e também nas amostras de mel analisadas neste trabalho.

A amplificação apresentada para o marcador de *N. apis* que também apresentou amplificação em menor intensidade para o marcador para *N. ceranae* nos deixa com a hipótese de haver a presença de ambas as espécies de *Nosema*. Entretanto, conforme descrito na revisão de literatura, *N. apis* é o membro basal do clado em que *N. ceranae* faz parte (MEDICI, *et al.*, 2012; SHAFER, *et al.*, 2009). Estudos evolutivos colocam ambas as espécies com proximidade, ou seja, há a possibilidade de haver semelhanças genéticas entre ambas as espécies e consequentemente, amplificação cruzada do marcador para *N. ceranae*, levando a uma especulação da presença desta espécie, mesmo não estando presente.

Entretanto, a sazonalidade da infecção de *N. apis* e *N. ceranae* é diferente, conforme é descrito por Fries (2010). *N. apis* tem baixa prevalência durante o verão e o outono, mas é na primavera que este agente patológico prevalece, com o aumento se iniciando durante o inverno. Entretanto, conforme Martín-Hernandez e colaboradores (2007) *apud* Fries (2010), a sazonalidade de *Nosema spp.* ainda não está bem clara. Se analisarmos tal padrão de sazonalidade para *N. apis*, a maioria das amostras utilizadas foram coletadas entre o verão e o outono (7 amostras), 5 amostras coletadas no inverno e 1 amostra coletada na primavera e, pelo observado através da microscopia óptica, há grande quantidade de esporos e a PCR indica que *N. apis* está presente em maior quantidade em relação a *N. ceranae*, discordando com o descrito sobre a sazonalidade para *N. apis*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi padronizada uma técnica de extração de DNA de esporos armazenados em mel. Apesar de terem sido avaliadas três técnicas, apenas uma delas se mostrou viável, conforme observado nos resultados. A técnica em estudo abre portas para análises do estado sanitário de colmeias, bem como estudos de prevalência de parasitas a partir de amostras que são trabalhadas por boa parte das abelhas que compõem a colmeia, levando a uma análise que pode ser considerada global, ou seja, aplicada a toda a população daquela colmeia.

A detecção precoce de nosemose em amostras de mel é uma forma de prevenir um problema antes que ele atinja proporções graves, levando a perdas maiores, bem como, pode auxiliar em estudos sobre o gênero *Nosema* no Brasil, especialmente sobre a prevalência de agentes etiológicos, visando identificar o agente etiológico que prevalece na maior parte do país, bem como montar um estudo sobre *Nosema spp.*, sua epidemiologia e prevalência em diferentes regiões do país.

Tendo em vista a presença de *N. apis* em maior quantidade com indicativos de *N. ceranae*, fazem-se necessárias mais análises nestas amostras, com comparação de *amplicons* encontrados em relação aos disponíveis em bancos de dados públicos e os descritos na literatura.

Apesar da detecção de parasitas associados com o desaparecimento de abelhas, bem como, perdas de colônias na Europa e América do Norte em amostras brasileiras, faz-se necessário maiores estudos para se verificar se há uma correlação destes agentes etiológicos e a queda de produção de mel no país.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

7.1 Estudo epidemiológico de *Nosema* em amostras de mel recentes e antigas do Rio Grande do Sul;

7.2 Sequenciamento e análise das amostras amplificadas para confirmar a identificação das espécies.

## REFERÊNCIAS

BACANDRITSOS, N.; GRANATO, A.; BUDGE, G. PAPANASTASIOU, I.; ROINIOTI, E.; CALDON, M.; FALCARO, C.; GALLINA, A.; MUTINELLI, F. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 335-340, 2010.

BOTH, J.P.C.L. **Mel na composição familiar da renda em unidades de produção familiar no município de Capitão Poço, Pará, Brasil**. Belém: Universidade Federal do Pará, 2008, 106p.

BOURGEOIS, A.L.; RINDERER, T.E.; BEAMAN, L.D.; DANKA, R.G. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 53-58, 2010.

CAIONE, G.; CAIONE, W.; SILVA, A.F.; LIMA, M.G. Avaliação econômica da atividade apícola em Alta Floresta, MT: um estudo de caso. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 9, n.1, p. 59-69, 2011.

CARLETTO, J.; BLANCHARD, P.; GAUTHIER, A.; SCHURR, F.; CHAUZAT, M-P.; RIBIÈRE, M. Improving molecular discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 52-55, 2013.

CARPES, S.T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2008, 255p.

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

CHEN, Y.P.; EVANS, J.D.; MURPHY, C.; GUTELL, R.; ZUKER, M.; GUNDENSEN-RINDAL, D.; PETTIS, J.S. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 142-147, 2009.

COLLET, T. **Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil e Uruguai determinada por meio de polimorfismos do DNA mitocondrial**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2004, 80p.

CORNMAN, R.S.; CHEN, Y.P.; SCHATZ, M.C.; STREET, C.; ZHAO, Y.; DESANY, B.; EGHOLM, M.; HUTCHINSON, S.; PETTIS, J.S.; LIPKIN, W.I.; EVANS, J.D. Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.

CUBA, G. **Dados das Exportações de Mel**. In: Mensagem Doce, APACAME, n. 127, p. 6-9, 2014.

DAINAT, B.; EVANS, J.D.; CHEN, Y.P.; GAUTHIER, L.; NEUMANN, P. Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

DEAN, T.R.; BETANCOURT, D.; MENETREZ, M.Y. A rapid DNA extraction method for PCR identification of fungal indoor air contaminants. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 431-434, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx>>. Acesso em: 10 jun. 2014, 10:43:20.

FONTBONNE, R.; GARNERY, L.; VIDAU, C.; AUFAUVRE, J.; TEXIER, C.; TCHAMITCHIAN, S.; ALAOU, H.E.; BRUNET, J-L.; DELBAC, F.; BIRRON, D.G. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 188-194, 2013.

FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. S73-S79, 2010.

GOBLIRSCH, M.; HUANG, Z.Y.; SPIVAK, M. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

GOODWIN, D.C.; LEE, S.B. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 438-440, 1993.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D.; ARGUMEDO-DELIRA, R.; MORALES-TREJO, A.; PULIDO-HERRERA, A.; CERVANTES-DÍAZ, L.; GRIMALDO-JUAREZ, O.; ALARCÓN, A. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 162-166, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. [Rio de Janeiro?], [2003?]. Disponível em:

<[http://servicodados.ibge.gov.br/Download/Download.ashx?u=ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2002/brasil\\_uf\\_grandesregioes/brasil\\_uf\\_grandesregioes.zip](http://servicodados.ibge.gov.br/Download/Download.ashx?u=ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2002/brasil_uf_grandesregioes/brasil_uf_grandesregioes.zip)>. Acesso em: 29 jul. 2014, 15:59:50.

\_\_\_\_\_. **Produção da Pecuária Municipal**. [Rio de Janeiro?], [2004?]. Disponível em:

<[http://servicodados.ibge.gov.br/Download/Download.ashx?u=ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2003/brasil.zip](http://servicodados.ibge.gov.br/Download/Download.ashx?u=ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2003/brasil.zip)>. Acesso em: 29 jul. 2014, 16:00:10.

\_\_\_\_\_. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 38, p. 1-65, 2011.

\_\_\_\_\_. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 39, p. 1-60, 2012.

\_\_\_\_\_. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 40, p. 1-68, 2013.

KARAKOUSIS, A.; TAN, L.; ELLIS, D.; ALEXIOU, H.; WORMALD, P.J. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, p. 38-48, 2006.

KHOURY, D.S.; MYERSCOUGH, M.R.; BARRON, A.B. A Quantitative Model of Honey Bee Colony Population Dynamics. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

KLEE, J.; BESANA, A.M.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; NANETTI, A.; TAM, D.Q.; CHINH, T.X.; PUERTA, F.; RUZ, J.M.; KRYGER, P.; MESSAGE, D.; HATJINA, F.; KORPELA, S.; FRIES, I.; PAXTON, R.J. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 1-10, 2007.

KOJIMA, Y.; TOKI, T.; MORIMOTO, T.; YOSHIYAMA, M.; KIMURA, K.; KADOWAKI, T. Infestation of Japanese Native Honey Bees by Tracheal Mite and Virus from Non-native European Honey Bees in Japan. **Invertebrate Microbiology**, v. 62, p. 895-906, 2011.

LI, J.; CHEN, W.; WU, J.; PENG, W.; AN, J.; SCHMID-HEMPEL, P.; SCHMID-HEMPEL, R. Diversity of *Nosema* associated with bumblebees (*Bombus spp.*) from China. **International Journal for Parasitology**, v. 42, p. 49-61, 2012.

MARTÍN-HERNANDEZ, R.; MEANA, A.; PRIETO, L.; SALVADOR, A.M.; GARRIDO-BAILÓN, E.; HIGES, M. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema*

*ceranae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6331-6338, 2007.

MEDICI, S.K.; SARLO, E.G.; PORRINI, M.P.; BRAUNSTEIN, M.; EGUARAS, M.J. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. **Parasitology Research**, v. 110, p. 859-864, 2012.

MICHALCZYK, M.; SOKÓŁ, R.; SZCZERBA-TUREK, A.; BANCERZ-KISIEL, A. A comparison of the effectiveness of the microscopic method and the multiplex PCR method in identifying and discriminating the species of *Nosema spp.* spores in worker bees (*Apis mellifera*) from winter hive debris. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 3, p. 385-391, 2011.

MOURA, S.G. **Boas práticas apícolas e a qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758**. Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2010, 76p.

MUÑOZ, I.; CEPERO, A.; PINTO, M.A.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; HIGES, M.; RÚA, P. D. Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 162-168, 2014.

PAN, G.; XU, J.; LI, T.; XIA, Q.; LIU, S-L.; ZHANG, G.; LI, S.; LI, C.; LIU, H.; YANG, L.; LIU, T.; ZHANG, X.; WU, Z.; FAN, W.; DANG, X.; XIANG, H.; TAO, M.; LI, Y.; HU, J.; LI, Z.; LIN, L.; LUO, J.; GENG, L.; WANG, L.; LONG, M.; WAN, Y.; HE, N.; ZHANG, Z.; LU, C.; KEELING, P.J.; WANG, J.; XIANG, W.; ZHOU, Z. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. **BMC Genomics**, v. 14, n. 186, 2013.

ORSINI, M.; ROMANO-SPICA, V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 17-20, 2001.

PEREIRA, F.M.; FREITAS, B.M.; NETO, J.M.V.; LOPES, M.T.R.; BARBOSA, A.L.; CAMARGO, R.C.R. Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2006.

PETTIS, J.S.; LICHTENBERG, E.M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANENGELSDORP, D. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PLOS One**, v. 8, n. 7, 2013.

PIRES, R.M.C. Qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 produzido no Piauí. Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2011, 94p.

ROUDEL, M.; AUFAUVRE, J.; CORBARA, B.; DELBAC, F.; BLOT, N. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. **Parasitology**, v. 140, p. 1346-1356, 2013.

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

SHAFER, A.B.A.; WILLIAMS, G.R.; SHUTLER, D.; ROGERS, R.E.L.; STEWART, D.T. Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and bees (Hymenoptera: Apidae) suggests both cospeciation and host-switch. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 198-203.

TAPIA-RUSSEL, R.; LAPPE, P.; ULLOA, M.; QUIJANO-RAMAYO, A.; CÁRCERES-FARFÁN, M.; LARQUÉ-SAAVEDRA, A.; PEREZ-BRITO, D. A Rapid and Simple Method for DNA Extraction From Yeasts and Fungi Isolated From *Agave fourcroydes*. **Molecular Biotechnology**, v. 33, p. 67-70, 2006.

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

TOKARZ, R.; FIRTH, C.; STREET, C.; COX-FOSTER, D.L.; LIPKIN, W.I. Lack of Evidence for an Association between *Iridovirus* and Colony Collapse Disorder. **PLOS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

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

VIEIRA, G.H.C; da SILVA, R.F.R.; GRANDE, J.P. Uso da Apicultura como Fonte Alternativa de Renda para Pequenos e Médios Produtores da Região do Bolsão, MS. IN: ANAIS DO 2º CONGRESSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2004, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2004. Disponível em: <<https://www.ufmg.br/congrent/Desen/Desen29.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2014, 14:18:22.

VOSSBRINK, C.R.; DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B.A. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. **Folia Parasitologica**, v. 52, p. 131-142, 2005.

WHITAKER, J.; SZLANSKI, A.L.; KENCE, M. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. **Apidologie**, v. 42, n. 2, p. 174-180, 2010.