

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**CAMPUS SÃO GABRIEL**

**ANANDA THOMAZETTI AZAMBUJA**

**CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE *co-I* DE *Varroa destructor* HAPLÓTIPO J: UM MÉTODO DE APOIO À CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

**São Gabriel**

**2016**

**ANANDA THOMAZETTI AZAMBUJA**

**CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE *co-I* DE *Varroa destructor* HAPLÓTIPO J: UM MÉTODO DE APOIO À CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação do Curso de Biotecnologia, na Universidade Federal do Pampa — Unipampa, *Campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Co-orientador: Rafael Hencke Tresbach

**São Gabriel**

**2016**

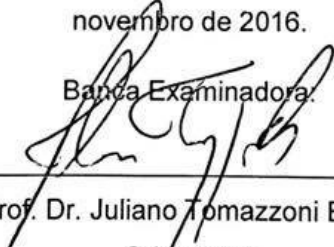
**ANANDA THOMAZETTI AZAMBUJA**

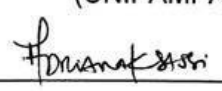
**CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE *co-I* DE *Varroa destructor* HAPLÓTIPO J: UM MÉTODO DE APOIO À CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação do Curso de Biotecnologia, na Universidade Federal do Pampa — Unipampa, *Campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 30 de novembro de 2016.

Banda Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo  
Orientador  
(UNIPAMPA)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.ª. Adriana Koslovski Sassi  
(UNIPAMPA)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa  
(UNIPAMPA)

Dedico este trabalho à minha família,  
sem eles eu não conseguiria chegar até  
aqui. Com vocês, por vocês e para  
vocês, sempre!

## AGRADECIMENTO

À Deus, que me concedeu a oportunidade de vir a este mundo, sou abençoada demais para reclamar, para Ele a palavra sempre será gratidão, para quem tem fé, a vida nunca tem fim.

À minha mãe, Cecília, por todo amor do mundo, por me mostrar o caminho e estar ao meu lado em todos os momentos. Tenho orgulho de dizer que além de mãe, eu tenho em ti uma amiga, que também é amiga dos meus amigos. Tu és meu espelho, meu exemplo de força, minha motivação, minha inspiração para nunca desistir e dar sempre o melhor de mim, em qualquer situação. Foi mãe em tempo integral, sei que fez o que possível e o impossível por nós, obrigada por tudo! Espero um dia poder retribuir tudo, te amo, incondicionalmente!

À meu pai, Rubem, sei que nosso relacionamento é complicado, talvez seja por sermos tão parecidos de gênio. Apesar desse jeitão duro, tem um coração de manteiga sempre pronto para ajudar, sei que posso contar contigo a qualquer momento. És um grande exemplo de sempre ajudar os outros sem esperar nada em troca, de que quando se trabalha no que se gosta, o trabalho é prazeroso. Tenho orgulho de ser tua filha, obrigada por tudo! Te amo!

À meu irmão/amigo, Rubinho, não tenho palavras para agradecer tudo que fez e faz por mim, sou privilegiada em te ter como irmão nessa vida. Somos tão diferentes e ao mesmo tempo tão parecidos. Obrigada pelo apoio, mesmo com a distância que nos separa, te sinto sempre do meu lado, te amo!

À meu namorado, Jerson, que sempre me incentivou apesar da distância e quis o meu melhor, essa vitória também é tua. Te amo!

À UNIPAMPA como um todo, aos professores, técnicos e funcionários, sempre dispostos a nos atender, ajudar, fazendo com que as coisas dessem certo.

À meu orientador, Juliano, que me recebeu de braços abertos em seu grupo de pesquisa, se dispondo a me orientar. Obrigada pela dedicação, confiança, ensinamentos e atenção que sempre teve conosco. O senhor é o cara, chefe!

À meu co-orientador, Rafael, não sei o que seria de mim se não fosse a tua ajuda dentro do laboratório. Obrigada por me ensinar, por acompanhar cada passo

meu, durante este trabalho, obrigada pela paciência e obrigada por ser incansável. Tenho grande consideração por ti, meu amigo!

Aos meus colegas e posso dizer hoje amigos, que fiz durante toda a graduação, por tudo que me proporcionaram e ensinaram, levo comigo um pedacinho de cada um de vocês. Em especial quero agradecer: a Nayara, minha companheira fiel neste trabalho e na vida, que com esse coração gigante me ensinou a ver as coisas de uma maneira mais leve e me incentivou em todos os momentos a seguir em frente, a Júlia, minha amiga/miss faca na bota, que sempre esteve por perto, ajudando e apoiando, a Bruna, que sempre esteve disposta a ajudar no que fosse preciso, teus resumos foram de suma importância para que eu chegasse até aqui e ao Luiz Fernando, que sempre me ajudou quando precisei, a pessoa mais humilde que já conheci, entramos juntos e vamos sair juntos, à vocês meu muito obrigada!

Às minhas amigas que ainda ficam na luta, Giane e Clariane, que foram minhas companheiras neste último semestre, talvez o mais desgastante para mim. Obrigada por acrescentaram tanto a minha vida. Gi, com esse coração enorme sempre pronta para tudo. Clari, com esse nervosismo a flor da pele, mas mesmo assim conseguiu me mostrar que querer é poder sim, quando se tem vontade. Tenho orgulho de vocês por sempre tentarem mais uma vez e nunca desistirem! Amo vocês!

À minha eterna melhor amiga, Melissa, que não está mais fisicamente presente neste plano, porém está sempre presente em minha vida e me acompanhando lá de cima. Entramos juntas na vida acadêmica, cada uma em seu respectivo curso e cidade, porém sempre unidas, tantos sonhos para quando acabássemos mais esta etapa de nossas vidas... Mas Ele tinha outros planos e precisou de ti mais cedo por aí. Essa conquista também é para ti, muito obrigada por ter me dado honra de ser tua amiga. Vou te amar eternamente, além da vida!

Enfim, obrigada à todos que não foram citados aqui, mas que de uma maneira ou de outra foram importantes neste caminho da graduação, contribuindo para que eu realizasse mais este grande sonho!

“Se você quiser alguém em quem confiar,  
confie em si mesmo. Quem acredita  
sempre alcança!”

Renato Russo

## RESUMO

As abelhas melíferas são insetos polinizadores fundamentais para os ecossistemas e relevantes economicamente. Através do seu manejo relativamente simples e barato, a exploração de seus produtos, principalmente o mel, torna a atividade apícola bastante rentável para o produtor rural. A redução das populações de *Apis mellifera* tem sido registrada em inúmeros países. Grande parte dos relatos tem sido associados ao fenômeno chamado *Colony Collapse Disorder* (CCD), um somatório de condições adversas que inclui patógenos, parasitos e doses sub-letais de agroquímicos, culminando com o abandono das colmeias. No Brasil, a CCD é menos observada e os relatos de perdas de colônias no país tem sido mais associados ao envenenamento acidental. Contudo, é preciso evidenciar a presença de tais patógenos e parasitos nas colmeias brasileiras. Um dos fatores relacionados ao desaparecimento das abelhas é o ectoparasito *Varroa destructor*. O parasito, além de ser vetor de patógenos, como bactérias e vírus, é um ácaro que também suga a hemolinfa de larvas e abelhas adultas, afetando seu desenvolvimento e diminuindo o tempo de vida. Em razão disso, o ácaro citado é considerado uma ameaça à apicultura mundial. Dessa forma, identificar os diferentes haplótipos, diretamente relacionados com o vigor reprodutivo da espécie de uma determinada região, é fundamental para a implementação de programas de controle. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo estabelecer, dentro do Grupo de Pesquisa APIPAMPA, o método para a identificação do haplótipo J de *V. destructor*. Para tal, foi realizada a clonagem e o sequenciamento parcial de um fragmento de 458 pb do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (co-I) de *V. destructor*. O fragmento foi amplificado por PCR, utilizando os *primers* COXF [5'GG(A/G)GG(A/T)GA(C/T)CC(A/T)ATT(C/T)T(A/T)TATCAAC3'] e COXR [5'GG(A/T)GACCTGT(A/TA(A/T)AATAGCAAATAC3'], purificado e clonado. Posteriormente à clonagem e transformação, o fragmento foi sequenciado. A sequência obtida foi depositada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob número de acesso KX458253. Os resultados do sequenciamento possibilitaram a confirmação da identidade do haplótipo J de *V. destructor* comparando o alinhamento da sequência nucleotídica obtida com sequências já publicadas por outros autores. Os dados alcançados no presente trabalho permitem aos próximos pesquisadores utilizarem um método adequado



para identificação do haplótipo J de *V. destructor* nos laboratórios do Grupo de Pesquisa APIPAMPA com uma maior precisão, possibilitando o acompanhamento da flutuação deste haplótipo em apiários infestados.

**Palavras-chave:** abelhas, *Apis mellifera*, caracterização, infestação, sanidade apícola.

## ABSTRACT

Honey bees are fundamental pollinator insects ecosystems and economically relevant. Through its relatively simple and inexpensive handling, the exploitation of its products, mainly honey, makes beekeeping quite profitable for the rural producer. Reduction of populations of *Apis mellifera* has been registered in many countries. Most of the reports have been associated with the phenomenon called Colony Collapse Disorder (CCD), a sum of adverse conditions including pathogens, parasites and sub-lethal doses of agrochemicals, culminating in the abandonment of hives. In Brazil, CCD is less observed and the reports of losses of colonies in the country have been more associated with accidental poisoning. However, is necessary evidence the presence of such pathogens and parasites in Brazilian hives. One of factors related to the disappearance of bees is the *Varroa destructor* ectoparasite. The parasite, besides being a vector of pathogens, such as bacteria and viruses, also sucks the hemolymph of adult bees and larvae, affecting its development and shortening life span. Because of this, the cited mite is considered a threat to worldwide beekeeping. In this way, identification of the different haplotypes, directly related to the reproductive vigor of species, from a given region is fundamental for implementation of control programs. Within this context, this work aimed to establish, within APIPAMPA Research Group, the method for identification of *V. destructor* J haplotype. To this end, cloning and partial sequencing of a 458 bp fragment of the mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase subunit I (*co-I*) from *V. destructor* was performed. The fragment was amplified by PCR, using the COXF primers [5'GG(A/G)GG(A/T)GA(C/T)CC(A/T)ATT(C/T)T(A/T)TATCAAC3'] and COXR [5'GG(A/T)GACCTGT(A/TA(A/T)AATAGCAAATAC3'], purified and cloned. Subsequent to cloning and transformation, the fragment was sequenced. Sequence obtained was deposited in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under accession number KX458253. Sequencing results enabled the confirmation of the identity of *V. destructor* J haplotype by comparing the alignment of nucleotide sequence obtained with sequences already published by other authors. The data obtained in the present work allow next researchers to use a suitable method to identify the *V. destructor* J haplotype in APIPAMPA Research Group

laboratories with greater accuracy, allowing the monitoring of the fluctuation of this haplotype in infested apiaries.

**Key-words:** bees, *Apis mellifera*, description, infestation, honey bee health.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do ácaro <i>Varroa destructor</i> .....	19
Figura 2 – Haplótipos do ácaro <i>Varroa destructor</i> .....	20
Figura 3 – Mapa do vetor pCR™2.1-TOPO® .....	26
Figura 4 – Visualização da amplificação parcial do gene <i>co-I</i> .....	28
Figura 5 – Purificação do fragmento amplificado do DNA de <i>Varroa destructor</i> .....	29
Figura 6 – Visualização da PCR de colônia .....	30
Figura 7 – Clivagem com a enzima de restrição <i>BamHI</i> .....	31
Figura 8 – Clivagem com a enzima de restrição <i>EcoRV</i> .....	31
Figura 9 – Alinhamento da sequência nucleotídica obtida do haplótipo J de <i>V. destructor</i> (KX458253) com as sequências publicadas do haplótipo J (AF106897) e o haplótipo K (KX458254), (AF106899) .....	33-34

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µl – Microlitros

% – Por cento

°C – Graus Celsius

ABEMEL – Associação Brasileira dos Exportadores de Mel

*Bam*HI – Enzima de restrição isolada de *Bacillus amyloliquefaciens*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* ou Ferramenta de Busca de Alinhamento Local

CCD – *Colony Collapse Disorder* ou Distúrbio do Colapso de Colônias

co-I – Citocromo C Oxidase Subunidade I

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* ou Ácido desoxirribonucleico

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

*Eco*RV – Enzima de restrição isolada de *Escherichia coli*

Haplótipo J – Haplótipo Japonês/Tailandês

Haplótipo K – Haplótipo Coreano

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LB – Meio de cultura Luria Bertani

min – Minuto(s)

mL – Mililitro

mm – Milímetros

mM - Milimolar

mtDNA - DNA mitocondrial

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

pb – Pares de bases

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

pmol – Picomol

RPM – Rotações por minuto

s – Segundo(s)

*Sac*I – Enzima de restrição isolada de *Streptomyces achromogenes*

SOC – *Super Optimal Broth with Catabolite Repression*

TBE – Tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA

UV– Luz Ultravioleta

X – Vezes

*Xho*I – Enzima de restrição isolada de *Xanthomonas holcicola*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Apicultura: Panorama Geral .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2. <i>Varroa destructor</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Obtenção da amostra .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Análise do haplótipo .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Clonagem molecular e crescimento bacteriano .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Extração do DNA plasmidial .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Clivagem com as enzimas de restrição <i>Bam</i>HI e <i>Eco</i>RV.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6. Sequenciamento e análise de dados .....</b>	<b>26</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Apicultura: Panorama Geral

A apicultura é a atividade humana que explora a forma de vida de abelhas da espécie *Apis mellifera*. A atividade destaca-se por ser uma prática geradora de baixos impactos ambientais e que contribui para polinização de plantas nativas e de cultivares (PEROSA et al., 2004). Acredita-se que em torno de 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo sejam polinizadas por alguma espécie de abelhas (FAO, 2004). A maior parte das plantas agrícolas e espécies vegetais silvestres necessitam da polinização por insetos para produzir sementes e frutos (FREITAS; FONSECA, 2005). O desempenho dessa prática é capaz de causar efeitos positivos na população, tanto sociais quanto econômicos, além de contribuir para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes. O Brasil apresenta características especiais de clima e flora que, aliadas às características genotípicas e fenotípicas das abelhas melíferas presentes no país, criam um enorme potencial para a atividade apícola (EMBRAPA, 2003). Esta atividade tem provado ser uma ótima possibilidade para o acréscimo de renda do produtor rural, visto que sua realização, geralmente, não compete em recursos de produção com as ações que já existem na área rural (INABA; PASIN, 1998).

Os principais produtos gerados a partir da atividade apícola são o mel, geleia real, própolis, pólen, cera e apitoxina (EMBRAPA, 2002). O produto mais conhecido e de mais simples extração e utilização é o mel que, além de exercer papel na alimentação, também é utilizado para fins farmacêuticos, apresentando grande atividade antioxidante, em cosméticos e por ter ação terapêutica (FREITAS, 2004; CRUZ et al., 2014).

Atualmente, o Brasil ocupa a 8ª posição no ranking dos maiores exportadores mundiais de mel (ABEMEL, 2016). O Rio Grande do Sul, é líder de produção entre os estados da região, sendo autor de 5,99 das 38,47 mil toneladas produzidas em todo Brasil (IBGE, 2014).

No Brasil, a atividade apícola economicamente contabilizada trabalha somente com abelhas da espécie *A. mellifera* que é criada em larga proporção (DE JONG, 1996). As abelhas encontradas no território brasileiro são ditas “africanizadas”, pois são um híbrido das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e/ou *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana (*Apis mellifera scutellata*) (EMBRAPA, 2003). Apesar de possuírem



comportamento medianamente agressivo e uma enorme facilidade de enxamear, estes híbridos possuem alta produtividade de mel, tolerância a doenças, elevado comportamento higiênico e de *grooming* (método em que o grupo ajuda a retirar parasitos uns dos outros) e adapta-se a climas frios, exercendo o trabalho mesmo que em baixas temperaturas, diferentemente das europeias, que tendem a hibernar em períodos de frio (GRAMACHO; JESUS, 2009).

Recentemente, estudos tem apresentado uma queda nas populações de polinizadores domesticados e silvestres, com declínios registrados nos serviços de polinização e no número de espécies de polinizadores em diversas regiões do mundo (POTTS et al., 2010). Dentre as mais diversas causas deste desaparecimento, a síndrome chamada *Colony Collapse Disorder* (CCD) ou Distúrbio do Colapso das Colônias, que é caracterizado pelo rápido desaparecimento de abelhas em condições bastante específicas, é uma das responsáveis (VANENGELSDORP et al., 2009). Além da CCD, a incidência de pragas, patógenos e parasitos, exposição acidental a agrotóxicos e a destruição de habitats, com a consecutiva redução de regiões de nidificação e forrageamento, também são causas relevantes (POTTS et al., 2010).

As abelhas estão vulneráveis a muitas doenças e inimigos naturais, que levam ao declínio da população, resultando na diminuição da produção, em perdas econômicas e podem levar as colônias à morte (BOECKING; GENERSCH, 2008; ROSENKRANZ; AUMEIER; ZIEGELMANN, 2010). Um dos agentes centrais na disseminação de patógenos e pivô central da CCD é o ácaro *Varroa destructor* (FONSECA, 2010). Este ácaro ectoparasito tem importante papel como vetor na rota de transmissão de vírus (SUMPTER; MARTIN 2004). A acariose, mais conhecida como varroatose, é uma doença que vem originando preocupação aos apicultores e a principal ameaça à apicultura mundial (PEGORARO, 2003; BOECKING; GENERSCH, 2008; ROSENKRANZ; AUMEIER; ZIEGELMANN, 2010).

## **1.2. *Varroa destructor***

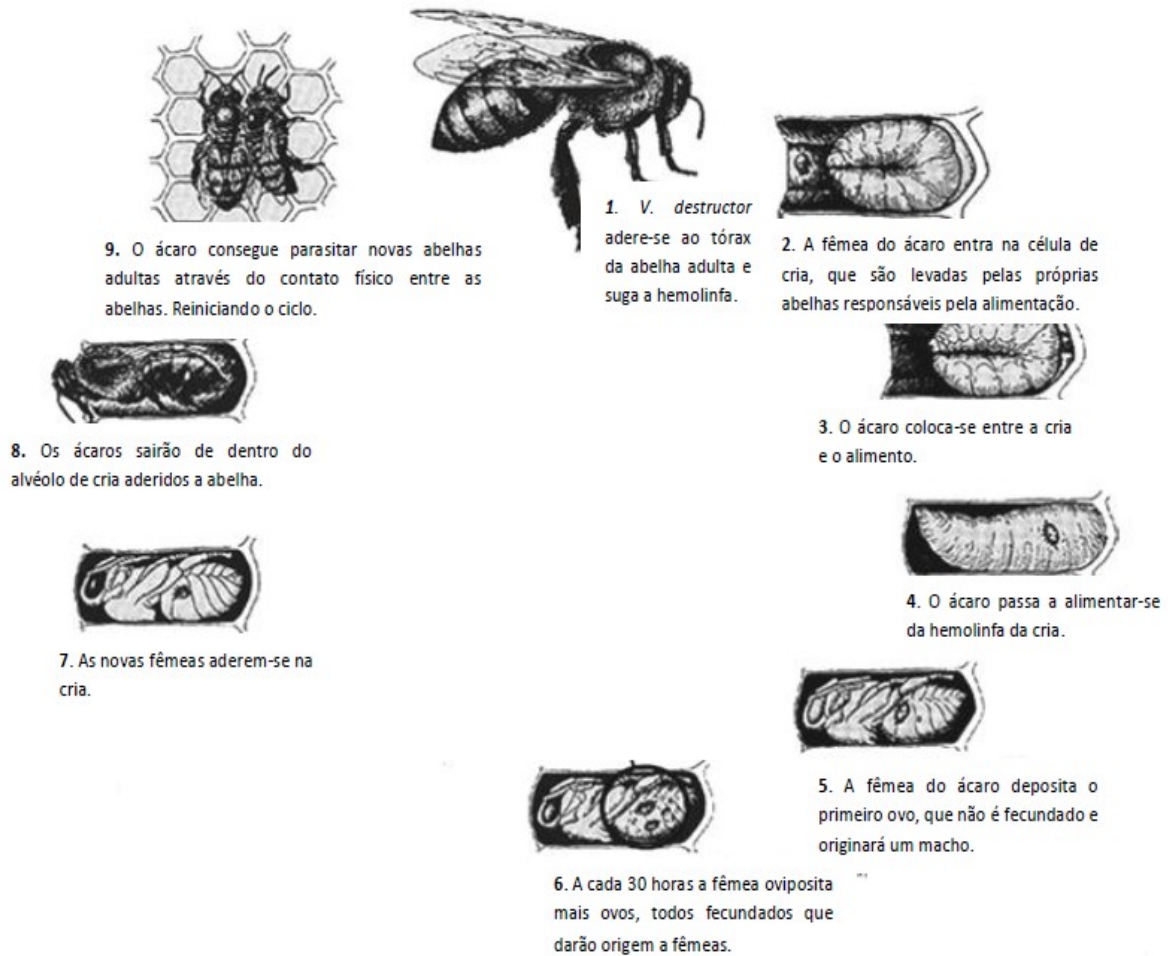
A criação de abelhas *Apis mellifera* pelo mundo, por causa principalmente da produção de mel, favoreceu a disseminação rápida do ácaro *Varroa* spp., tornando-se assim uma das principais pragas da apicultura no mundo (BOTTA; CARMENATE; TORRE, 2004). No Brasil, a única espécie relatada é *Varroa destructor*, a mais dispersa pelo mundo e vetor de várias viroses (ANDERSON; TRUEMAN, 2000). Os

danos causados por esses ácaros dependem muito do nível da infestação dentro da colônia. Dentre os principais sintomas estão, a má-formação de vários órgãos e a diminuição do peso de zangões e operárias, o que compromete a longevidade da população da colônia (DUAY; DE JONGE; ENGELS, 2003).

O referido ácaro é um ectoparasito visível a olho nu (IFANTIDIS, 1988). Os machos possuem coloração marrom clara e pernas brilhantes. O corpo mede de 0,75 a 0,98 mm de comprimento e de 0,70 a 0,88 mm de largura. As quelíceras do macho não o permitem a sugar a hemolinfa das abelhas porque são alteradas para a transferência de esperma (DELFINADO; BAKER, 1974). A vida do macho se limita ao acasalamento, ou seja, o ácaro macho morre logo após a cópula, não afetando diretamente, dessa forma, a sanidade da abelha (ENGLANG, 1971; DELFINADO; BAKER, 1974; LANGHE; NATZKII, 1976; SHABANOV et al., 1978).

As fêmeas adultas do ácaro possuem coloração que varia de marrom ao marrom escuro, medindo de 1,00 a 1,77 mm de comprimento e de 1,50 a 1,99 mm de largura. As fêmeas mostram quatro pares de pernas adaptadas com ventosas para ajudar na fixação ao hospedeiro. Nas quelíceras é possível observar dois dentes, utilizados para alimentação (ENGLANG, 1971; DELFINADO; BAKER, 1974). O primeiro par de pernas é possuidor de órgãos sensoriais de tato e olfato, que auxiliam na orientação do ectoparasito (BAIRAK, 1976). Elas têm o ciclo de vida caracterizado por duas fases: a forética, onde o ácaro se fixa sobre o corpo das abelhas adultas, e a fase reprodutiva, que começa quando a fêmea adulta do ácaro deixa as abelhas operárias e os zangões para entrar nas células de crias para realizar a postura (IFANTIDIS, 1988).

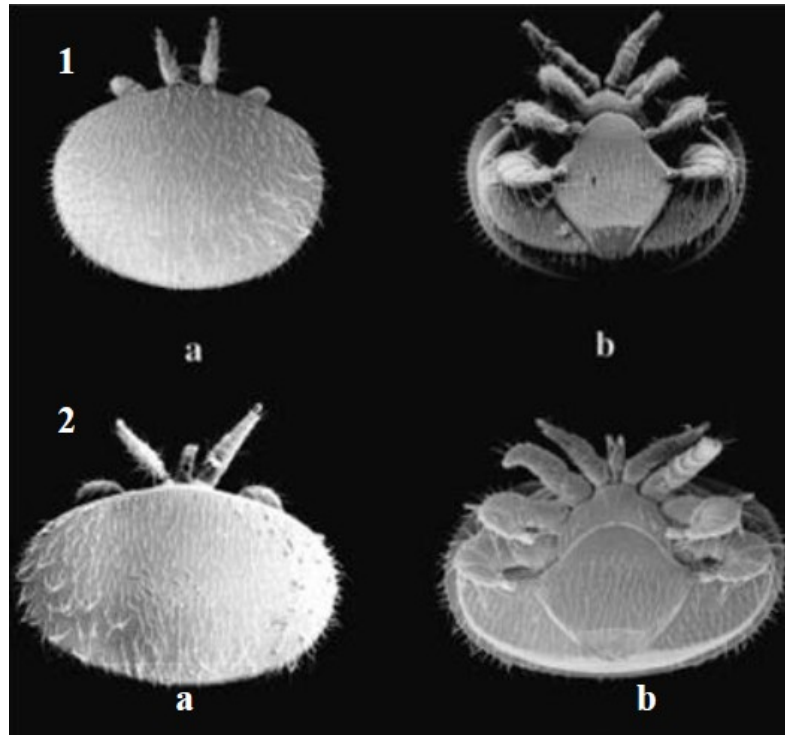
O ciclo de vida tem início quando o ácaro entra na célula de cria imediatamente após abandonar o corpo da abelha adulta (BOOT et al., 1994), quando a cria encontra-se no último estágio larval (DE JONG, 1997). O acasalamento dos ácaros acontece quando as abelhas encontram-se no estágio de pupa, ou seja, no interior das células de cria operculadas. Esse ciclo reprodutivo tem duração de 7 a 8 dias e coincide com a fase na qual a abelha em desenvolvimento permanece no interior da célula do favo, passando pelo último estágio larval, atravessando o período de pupa, até que a abelha possa concluir seu desenvolvimento (HARRIS et al., 2003), como pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1.** Ciclo de vida do ácaro *Varroa destructor*. **Fonte:** Adaptado de <http://coronaapicultores.blogspot.com.br/2014/03/biologia-reproductiva-de-la-varroa.html> Acesso: 05/10/2016.

A espécie *Varroa destructor* (ANDERSON; TREUMAN, 2000) foi descrita pela primeira vez como *Varroa jacobsoni* Oudemans (1904) a partir do exame de exemplares encontrados em células contendo pupas de *Apis cerana* (DELFINADO; BEKER, 1974; ANDERSON; TREUMAN, 2000) e foi incluída na família Varroidae, da Ordem Mesostigmata (DELFINADO; BAKER, 1974). A partir de estudos da variabilidade genética do DNA de *Varroa destructor* descobriu-se a existência de diferentes tipos de haplótipos e genótipos do ácaro relacionados com sua virulência (KRAUS; HUNT, 1995; ANDERSON; FUCHS, 1998; GUZMAN; RINDERER, 1999; SOLIGNAC et al. 2003;2005; WARRIT et al. 2004). Fundamentados na variabilidade no gene *co-I* (subunidade I do Citocromo C Oxidase) do DNA mitocondrial (mtDNA) identificaram a existência dos haplótipos J (Japonês) e K (Coreano), nomeados de acordo com o nome dos países asiáticos onde foram inicialmente detectados em

*Apis cerana* (ANDERSON; TREUMAN, 2000) (Figura 2). No Brasil, o primeiro haplótipo identificado foi o haplótipo J e posteriormente o haplótipo K, considerado mais virulento por sua alta reprodutibilidade (GUERRA et al., 2010).



**Figura 2.** Haplótipos de *Varroa destructor*. Em posição dorsal (a) e ventral (b). (1) Haplótipo J e (2) Haplótipo K. **Fonte:** Adaptado de Anderson e Trueman, 2000.

A identificação dos haplótipos do ácaro pode ser feita com base nas enzimas de restrição *Xho*I e *Sac*I. Ambos os haplótipos apresentam sítio de clivagem para enzima *Xho*I, mas apenas o haplótipo J tem clivagem pela enzima *Sac*I. A enzima *Xho*I cliva especificamente em 5' C↓TCGAG 3' e a enzima *Sac*I possui o sítio de clivagem 5' GAGCT↓C 3'. Para a confirmação da espécie é necessário a utilização da enzima *Xho*I, pois a espécie *V. jacobsoni* não apresenta o sítio de clivagem para essa enzima (ANDERSON; FUCHS, 1998).

Observou-se a predominância do haplótipo K nos apiários dos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina (GARRIDO et al., 2003). A predominância foi relatada novamente no ano de 2009 em apiários de Santa Catarina, ficando o haplótipo J restrito a colônias localizadas na Ilha de Fernando de Noronha (PE) (STRAPAZZON et al., 2009). Em um estudo mais recente, realizado nos apiários da Mesorregião Sudoeste do Rio Grande do Sul, foi relatada a prevalência do haplótipo K parasitando abelhas em colmeias de todos os apiários

amostrados (cerca de 94,29% dos ácaros) e há evidências da existência de um novo haplótipo (5,71%) (SALVADÉ, 2015). Os apiários da região sul e principalmente do Rio Grande do Sul requerem um cuidado maior, já que o Estado é o maior produtor de mel do Brasil, com uma alta produção de 5,99 mil toneladas (IBGE, 2014). A partir dos dados relatados acima, se torna necessário o acompanhamento e caracterização do perfil genotípico dos ácaros.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Caracterizar o método mais aceito para identificação do haplótipo J de *V. destructor*.

### 2.2 . Objetivos específicos

- Clonar e sequenciar parcial do gene *co-I* de *Varroa destructor* haplótipo J;
- Depositar a sequência no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para uso da comunidade científica;
- Padronizar a técnica de identificação do haplótipo J no Grupo de Pesquisa APIPAMPA.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Obtenção da amostra

A amostra de *Varroa destructor* haplótipo J utilizada neste trabalho, proveniente da Ilha de Fernando de Noronha – PE, foi fornecida pelo Prof. Dr. David de Jong da Universidade de São Paulo. O DNA da amostra foi extraído utilizando o kit *Pure Link Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, EUA), segundo instruções do fabricante. A amostra foi devidamente armazenada e mantida refrigerada a -20°C até a realização das análises.

#### 3.2. Análise do haplótipo J

Para a análise do haplótipo J do ácaro *V. destructor*, realizou-se reação de PCR utilizando os *primers* para amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase I (*co-I*) COXF [5'GG(A/G)GG(A/T)GA(C/T)CC(A/T)ATT(C/T)T(A/T)TATCAAC3'] e COXR [5'GG(A/T)GACCTGT(A/TA(A/T)AATAGCAAATAC3'] descritos por Anderson; Fuchs (1998).

Realizou-se a técnica de PCR com um volume final de 20 µL, utilizando 18 µL de PCR Master Mix (Ludwig Biotecnologia, Brasil), 6 pmol de cada *primer*, 48 ng de DNA extraído e 0,8 µL de água ultrapura para o controle negativo.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Alemanha) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento de *primers* a 42°C por 1 min e 20 s e alongamento a 72°C por 2 min; alongamento final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando marcador de peso molecular adequado GeneRuler DNA Ladder Mix 100 – 10.000 pb (Thermo Scientific, EUA), corados com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, EUA), em tampão TBE 1X (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A visualização do gel foi efetuada em um transluminador de luz ultravioleta L-PIX LTB 20x20 HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Após a comprovação da amplificação do fragmento por eletroforese, o amplicon da PCR foi purificado do gel com o Gel DNA Purification Kit (MEBEP

Bioscience, China) de acordo com as instruções do fabricante. O material purificado foi visualizado em gel nas mesmas condições descritas acima.

### 3.3. Clonagem molecular e crescimento bacteriano

A clonagem foi realizada utilizando-se o Kit comercial TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen, EUA), alterando-se a reação recomendada pelo fabricante, onde foi usado metade da quantidade de vetor e da solução de sais e 6 µL de produto de PCR purificado.

Para transformação por eletroporação utilizou-se as bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen, EUA), eletroporadas no eletroporador Gene Pulser X-Cell™ (Bio-Rad, EUA), em uma cubeta de 0,2 mm (Bio-Rad, EUA) no programa padrão de 2,5 kV, onde adicionou-se 20 µL de bactérias eletrocompetentes e 3 µL de vetor TOPO® TA. Após a eletroporação, as bactérias foram ressuspendidas em 1 mL de meio SOC (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) e como controle negativo, eletroporou-se as bactérias sem adição de vetor. Após, as células foram incubadas a 37°C com agitação de 250 RPM por 1 h (Shaker-Incubator AG-45, Agimaxx).

A seleção das células transformadas foi realizada em meio LB Ágar Miller (Himedia, Índia), suplementado com 100 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina (EMS, Brasil) e as placas foram incubadas a 37°C em estufa (MA 430 - Marconi, Brasil) por 16 h.

A clonagem foi confirmada através da técnica de PCR de colônia, descrita em Sambrook e Russell (2001) e visualizado em gel de agarose 1% nas condições informadas previamente.

### 3.4. Extração do DNA plasmidial

Com auxílio de um palito de madeira estéril, retirou-se uma colônia das bactérias transformadas. A amostra foi inoculada em meio LB suplementado com 50 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina (EMS, Brasil), incubada em *shaker* a 37°C por 16 h, sob agitação de 250 RPM.

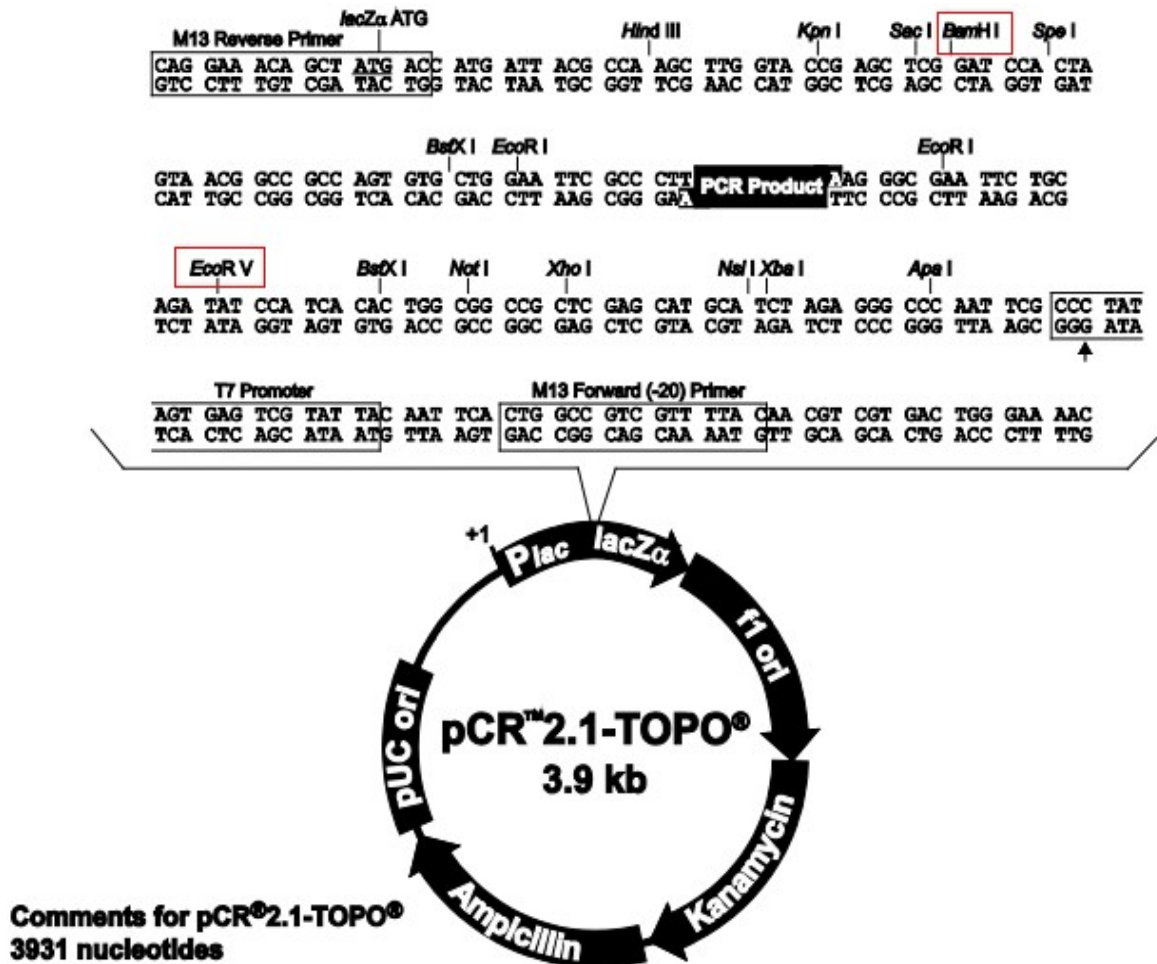
A extração do DNA plasmidial foi realizada através de lise alcalina, conforme o protocolo descrito em Sambrook e Russell (2001).



A análise da extração de DNA plasmidial realizou-se através da técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### **3.5. Clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RV**

Após a comprovação da amplificação do fragmento clonado do gene no vetor pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen, EUA) (Figura 3), selecionou-se as enzimas *Bam*HI (Thermo Scientific, EUA) e *Eco*RV (Ludwig Biotecnologia, Brasil) para liberação do inserto. A clivagem iniciou-se com a enzima de restrição *Bam*HI, segundo instruções do fabricante. Confirmada a clivagem, o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M, pH 5,5, ressuspendido em tampão TE (100mM de Tris e 10mM de EDTA), pH 8 (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e clivado com *Eco*RV, conforme instruções do fabricante. Os produtos da digestão foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, nas condições descritas previamente.



**Figura 3.** Mapa do vetor pCR™2.1-TOPO®. As enzimas destacadas foram as utilizadas na clivagem para a confirmação da clonagem. **Fonte:**

<[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)> Acesso: 05/10/2016.

### 3.6. Sequenciamento e análise de dados

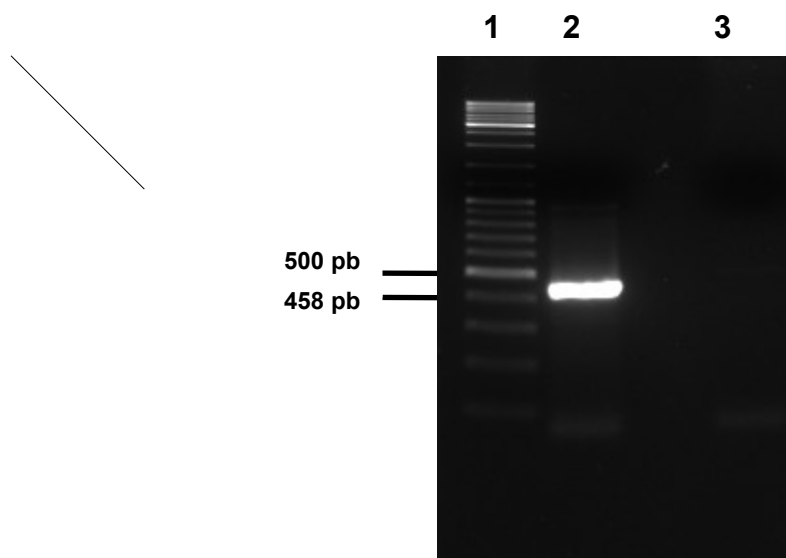
O DNA clonado foi sequenciado utilizando o sequenciador ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA) com o kit Big Dye (Applied Biosystems, EUA), pela empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA (Brasil). Foram utilizados *primers* para M13 (-20), fornecidos com o kit TOPO®, utilizado para clonagem.

Os dados resultantes do sequenciamento foram analisados com o pacote Staden (STADEN et al., 2000), onde foi eliminada a sequência do vetor e obtida a sequência consenso. A sequência consenso foi alinhada com as sequências disponíveis de *V. destructor* no banco de dados NCBI através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Com o software ClustalX (LARKIN et al., 2007), alinhou-se

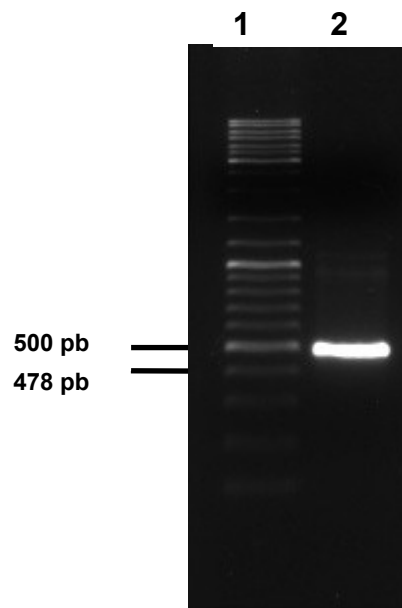
a sequência consenso com duas sequências do haplótipo J (números de acesso AF106897 e KX458253) e com duas sequências do haplótipo K (números de acesso AF106899 e KX458254), visando confirmar o perfil do haplótipo J.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação parcial do gene mitocondrial *co-I* por PCR do ácaro *V. destructor* gerou um fragmento de aproximadamente 458 pb (Figura 4). Os resultados foram semelhantes aos descritos por Anderson e Trueman (2000). Após realizada a amplificação por PCR, o fragmento foi purificado, podendo-se observar que o mesmo estava sem impurezas (amostra pura) para a realização da posterior clonagem (Figura 5).

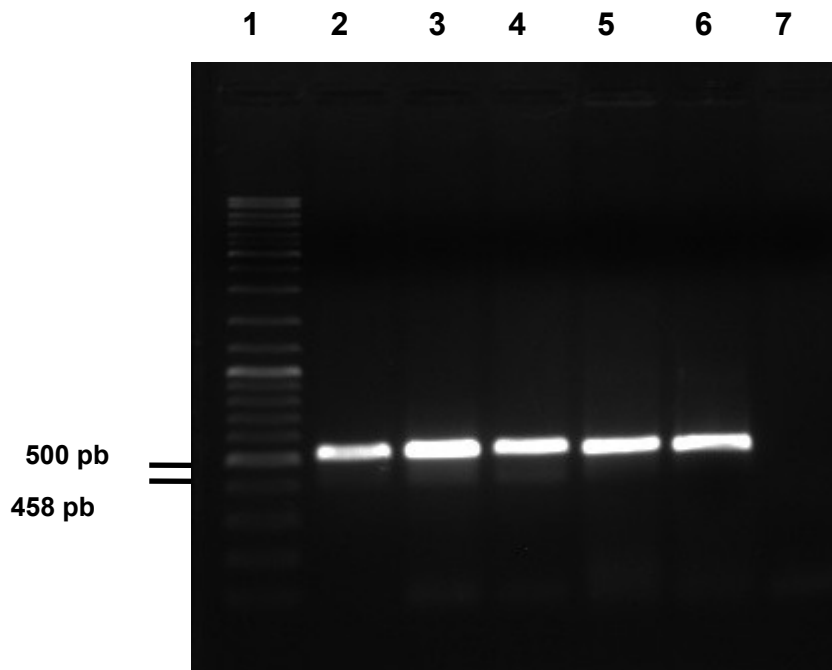


**Figura 4.** Visualização da amplificação parcial do gene *co-I*. Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaleta 1: padrão de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific). Canaleta 2: a amplificação demonstra que o gene *co-I* possui aproximadamente 458 pb. Canaleta 3: controle negativo. Corante utilizado: GelRed™ (Biotium). **Fonte:** Autor (2016).



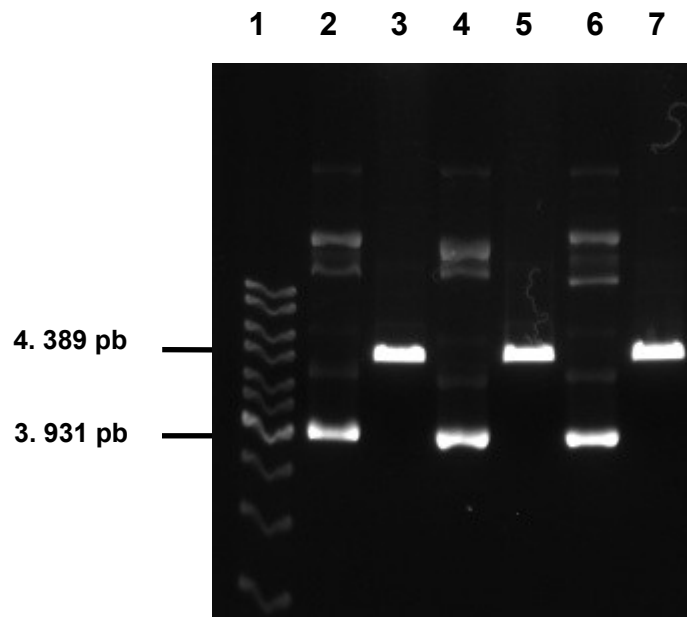
**Figura 5.** Purificação do fragmento amplificado do DNA de *V. destructor*. Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaleta 1: padrão de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific). Canaleta 2: amostra purificada. Corante utilizado: GelRed™ (Biotium). **Fonte:** Autor (2016).

A confirmação da clonagem foi realizada através da técnica de PCR de colônia, descrita em Sambrook e Russell (2001). Assim como aconteceu com a amplificação por PCR da região do genoma mitocondrial *co-I* do ácaro *V. destructor* (Figura 4), ficou evidente o resultado positivo (Figura 6). Pode-se observar nas canaletas 3 a 6, a presença de bandas com aproximadamente 458 pb confirmando a amplificação do gene mitocondrial *co-I* presente no inserto adicionado ao plasmídeo de clonagem.

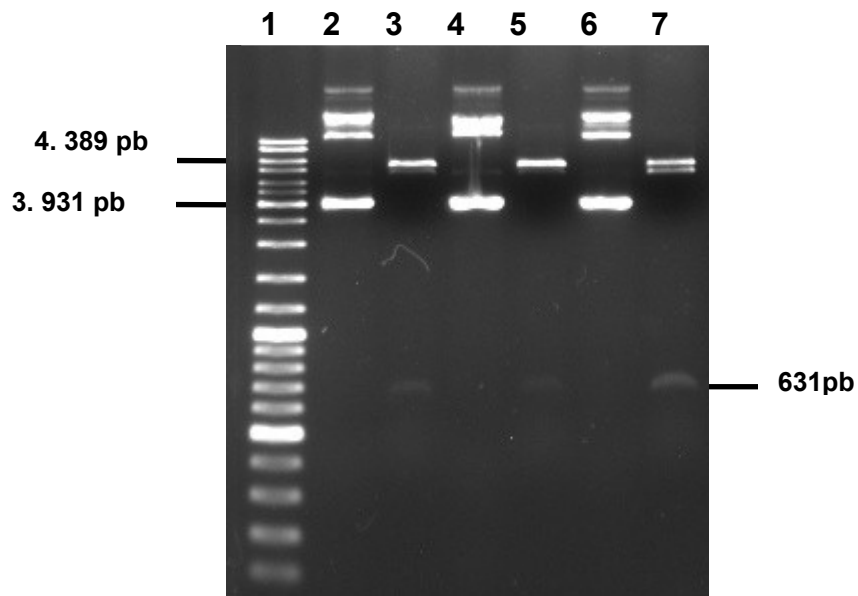


**Figura 6.** Visualização da PCR de colônia. Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaleta 1: padrão de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific); Canaleta 2: Controle Positivo: DNA purificado; Canaleta 3 a 6: amplificação do gene *co-I*, em torno de 458 pb, em *E. coli*, cada amostra é de uma colônia distinta; e Canaleta 7: Controle negativo. Corante utilizado: GelRed™ (Biotium) e como tampão: TBE 1X. **Fonte:** Autor (2016).

Os resultados a partir da clivagem do vetor plasmidial com *Bam*HI e *Eco*RV são demonstrados nas Figuras 7 e 8. O produto da amplificação foi clivado primeiramente com a enzima de restrição *Bam*HI, deixando o mesmo linearizado, gerando um fragmento de aproximadamente 4.389 pb, confirmando a clivagem, onde o inserto está aderido no vetor utilizado (Figura 7). Para acurácia procedeu-se a clivagem com a enzima de restrição *Eco*RV, visando isolar somente o fragmento desejado (inserto) para a confirmação da presença do mesmo, em torno de 631 pb, o aumento do número de pares de base deve-se à presença de fragmentos do vetor (Figura 8).



**Figura 7.** Clivagem pela enzima de restrição *Bam*HI. Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaleta 1: padrão de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific). Canaletas 2, 4 e 6: vetor plasmidial TOPO® antes da clivagem com *Bam*HI (3.931 pb); Canaletas 3, 5 e 7: vetor clivado com *Bam*HI contendo o fragmento de *co*-I. Corante utilizado: GelRed™ (Biotium) e como tampão TBE 1X. **Fonte:** O Autor (2016)



**Figura 8.** Clivagem pela enzima de restrição *Eco*RV. Eletroforese em gel de agarose 1%. Canaleta 1: padrão de peso molecular (GeneRuler™ 100-10.000 bp DNA Ladder, Thermo Scientific). Canaletas 2, 4 e 6: vetor plasmidial TOPO® antes da clivagem com *Eco*RV (3,9kb); Canaletas 3, 5 e 7: vetor clivado com *Eco*RV e o fragmento de *co*-I. Corante utilizado: GelRed™ (Biotium) e como tampão TBE 1X. **Fonte:** O Autor (2016).

As sequências nucleotídicas obtidas a partir do sequenciamento foram exatamente iguais à sequência anteriormente publicada por Anderson e Trueman (2000) (AF106897). Também foi possível comparar com sequências do haplótipo K (AF106899) e (KX458254), confirmando que a sequência apresentada no presente trabalho refere-se ao haplótipo J (Figura 9). A sequência obtida do haplótipo J foi depositada no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob o número de acesso KX458253.

Os géis da eletroforese podem ter sofrido algumas alterações, por isso parece ter mais que 458 pb, mas por meio do sequenciamento pode-se confirmar o número exato de pb.

Além das comprovações expostas, o haplótipo J também foi confirmado através da identificação dos sítios de clivagem de *Xho*I e *Sac*I (SALVADÉ, 2015). A sequência amplificada do haplótipo J apresenta sítio de clivagem 5' C↓TCGAG 3' para a enzima de restrição *Xho*I e sítio de clivagem 5' GAGCT↓C 3' para a enzima de restrição *Sac*I. Sabendo-se que os dois haplótipos podem ser identificados com base nesses sítios de clivagem reconhecidos pelas enzimas de restrição *Xho*I e *Sac*I, ambos os haplótipos apresentam sítio de clivagem para *Xho*I e somente o haplótipo J possui sítio de clivagem para *Sac*I (ANDERSON; FUCHS, 1998). Os estudos realizados anteriormente por Salvadé (2015) corroboram com Anderson e Fuchs (1998), mostrando que a enzima de restrição *Xho*I alcançou uma concreta clivagem do fragmento *co*-I do haplótipo J e K, no entanto, apenas o haplótipo J possui o sítio de clivagem para a enzima de restrição *Sac*I.

No alinhamento consegue-se compreender que os haplótipos, além de possuírem sítios de clivagem específicos já descritos, também possuem dois polimorfismos de base única entre eles (Figura 9).



```

AF106897.1 : ATTTATTTGATTTTITGGACACCCA GAA GTT TA IATTTTAA ITTTGCCTGGT TTTGGIAT IATTTCTCATG : 72
KX458253.1 : ATTTATTTGATTTTITGGACACCCA GAA GTT TA IATTTTAA ITTTGCCTGGT TTTGGIAT IATTTCTCATG : 72
AF106899.1 : ATTTATTTGATTTTITGGACACCCA GAA GTT TA IATTTTAA ITTTGCCTGGT TTTGGIAT IATTTCTCATG : 72
KX458254.1 : ATTTATTTGATTTTITGGACACCCA GAA GTT TA IATTTTAA ITTTGCCTGGT TTTGGIAT IATTTCTCATG : 72
ATTTATTTGATTTTITGGACACCCA GAA GTT TA IATTTTAA ITTTGCCTGGT TTTGGIAT IATTTCTCATG

      80      *      20      *      40      *      60      *
AF106897.1 : TAA TTTGTATACAAA CAGGGAAGAAGCAGCC TTTIGGAAA TTIAGGGA TAA TT TACGCIATAATAACTA ICG : 144
KX458253.1 : TAA TTTGTATACAAA CAGGGAAGAAGCAGCC TTTIGGAAA TTIAGGGA TAA TT TACGCIATAATAACTA ICG : 144
AF106899.1 : TAA TTTGTATACAAA CAGGGAAGAAGCAGCC TTTIGGAAA TTIAGGGA TAA TT TACGCIATAATAACTA ICG : 144
KX458254.1 : TAA TTTGTATACAAA CAGGGAAGAAGCAGCC TTTIGGAAA TTIAGGGA TAA TT TACGCIATAATAACTA ICG : 144
TAA TTTGTATACAAA CAGGGAAGAAGCAGCC TTTIGGAAA TTIAGGGA TAA TT TACGCIATAATAACTA ICG

      *      160      *      180      *      200
AF106897.1 : GTATTTTAGGTTT TAITGTATG GCTCATCA IATA TT TACAGIAGGAA TA GATATT GA IACICGAGCATATT : 216
KX458253.1 : GTATTTTAGGTTT TAITGTATG GCTCATCA IATA TT TACAGIAGGAA TA GATATT GA IACICGAGCATATT : 216
AF106899.1 : GTATTTTAGGTTT TAITGTATG GCTCATCA IATA TT TACAGIAGGAA TA GATATT GA IACICGAGCATATT : 216
KX458254.1 : GTATTTTAGGTTT TAITGTATG GCTCATCA IATA TT TACAGIAGGAA TA GATATT GA IACICGAGCATATT : 216
GTATTTTAGGTTT TAITGTATG GCTCATCA IATA TT TACAGIAGGAA TAGATATT GA IACICGAGCATATT

      *      240      *      260      *      280
AF106897.1 : TTACIGCAGCTACAA IAA TTA TTGCGGTTCC IACIGGTAT TAAAA TTTTICTTGA TTAGCAACAATTTCATG : 288
KX458253.1 : TTACIGCAGCTACAA IAA TTA TTGCGGTTCC IACIGGTAT TAAAA TTTTICTTGA TTAGCAACAATTTCATG : 288
AF106899.1 : TTACIGCAGCTACAA IAA TTA TTGCGGTTCC IACIGGTAT TAAAA TTTTICTTGA TTAGCAACAATTTCATG : 288
KX458254.1 : TTACIGCAGCTACAA IAA TTA TTGCGGTTCC IACIGGTAT TAAAA TTTTICTTGA TTAGCAACAATTTCATG : 288
TTACIGCAGCTACAA IAA TTA TTGCGGTTCC IACIGGTAT TAAAA TTTTICTTGA TTAGCAACAATTTCATG

```

**XhoI**

**SacI**

```

AF106897.1 : GTTCIATAGT TAAAT IAGATGT CCGATAAAT IIGATCTTTAGGTTTTA TTTT TTTA TTTIACITTAGGGGCTA : 360
KX458253.1 : GTTCIATAGT TAAAT IAGATGT CCGATAAAT IIGATCTTTAGGTTTTA TTTT TTTA TTTIACITTAGGGGCTA : 360
AF106899.1 : GTTCIATAGT TAAAT IAGATGT CCGATAAAT IIGATCTTTAGGTTTTA TTTT TTTA TTTIACITTAGGGGCTA : 360
KX458254.1 : GTTCIATAGT TAAAT IAGATGT CCGATAAAT IIGATCTTTAGGTTTTA TTTT TTTA TTTIACITTAGGGGCTA : 360
GTTCIATAGT TAAAT IAGATGT CCGATAAAT IIGATCTTTAGGTTTTA TTTT TTTA TTTIACITTAGGGGCTA

AF106897.1 : TTACIGGTCGTAAT TTIAGCTAAT ICTTCTAAT IGA IAT TGT TTIACATGATACTTATTA IGTA GTAGCACATT : 432
KX458253.1 : TTACIGGTCGTAAT TTIAGCTAAT ICTTCTAAT IGA IAT TGT TTIACATGATACTTATTA IGTA GTAGCACATT : 432
AF106899.1 : TTACIGGTCGTAAT TTIAGCTAAT ICTTCTAAT IGA IAT TGT TTIACATGATACTTATTA IGTA GTAGCACATT : 432
KX458254.1 : TTACIGGTCGTAAT TTIAGCTAAT ICTTCTAAT IGA IAT TGT TTIACATGATACTTATTA IGTA GTAGCACATT : 432
TTACIGGTCGTAAT TTIAGCTAAT ICTTCTAAT IGA IAT TGT TTIACATGATACTTATTA IGTA GTAGCACATT

AF106897.1 : TTCACCTA IGTATTAA GAA TAGGGGCT : 458
KX458253.1 : TTCACCTA IGTATTAA GAA TAGGGGCT : 458
AF106899.1 : TTCACCTA IGTATTAA GAA TAGGGGCT : 458
KX458254.1 : TTCACCTA IGTATTAA GAA TAGGGGCT : 458
TTCACCTA IGTATTAA GAA TAGGGGCT

```

**Figura 9.** Alinhamento da sequência nucleotídica obtida do haplótipo J de *V. destructor* (KX458253) com a sequência publicada do haplótipo J (AF106897) e o haplótipo K (KX458254), (AF106899). Os haplótipos possuem sítios específicos para clivagem: ambos têm sítio de clivagem para *Xho*I e somente o haplótipo J possui sítio de clivagem para *Sac*I. Entre os haplótipos há dois polimorfismos de base única. **Fonte:** O Autor (2016).

## 5. CONCLUSÕES

Conhecendo a extrema importância das abelhas tanto na natureza como grande polinizadora de inúmeras espécies, quanto por seu potencial econômico na comercialização de produtos provenientes de seu modo de vida, se torna essencial o investimento em pesquisa relacionada à sanidade apícola para que fique clara a forma como acontece a relação parasito-inseto, atendendo a qualidade do produto apícola. A apicultura no Brasil advém de uma única e exclusiva espécie de abelhas, a *A. mellifera* (DE JONG, 1996). Em vista disso, é de suma relevância o manejo adequado nos apiários, que tem início no entendimento da biologia da própria abelha e de seus adversários naturais, englobando a maior ameaça atual das colmeias, o ácaro *V. destructor*. Dessa maneira, os métodos de controle de pragas e doenças podem ser melhores planejados e executados, obtendo resultados positivos e de sucesso no seu final.

O presente trabalho teve como seu principal objetivo, desenvolver um método para identificação do haplótipo J de *V. destructor*, dentro do Grupo de Pesquisa APIPAMPA, portanto, o objetivo correspondeu aos resultados esperados para este estudo. A análise do gene *co-I* do DNA mitocondrial corroborou ser o haplótipo J de *V. destructor*, a clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RV, demonstraram-se eficazes e isolaram o fragmento da sequência desejada do gene mitocondrial *co-I*. Os resultados do sequenciamento confirmam as sequências já existentes no banco de dados. Entende-se que a caracterização do haplótipo J, com a continuidade da clonagem, clivagem e do sequenciamento, oportuniza a comunidade acadêmica e aos demais pesquisadores uma ampla facilidade de identificação do mesmo, podendo dessa forma contribuir para o acompanhamento, manutenção e manejo dos apiários com infestações.

## REFERÊNCIAS

- ABEMEL. **Setor apícola brasileiro em números.** Disponível em: <[http://brazilletsbee.com.br/inteligencia\\_comercial\\_abemel\\_abril\\_2016.pdf](http://brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_abril_2016.pdf)> Acesso em: 11/09/2016.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., WEBB M., MYERS E.W., LIPMAN D.J. **Basic Local Alignment Search Tool.** J MolBiol 215, p.403–410. 1990.
- ANDERSON D. L.; FUCHS, S. **Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*.** J. Apic. Res. ed.37, p. 69-78. 1998.
- ANDERSON, D.L & J.W.H TRUEMAN. ***Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species.** Exp. Appl. Acarol. 24: p.165-189. 2000.
- BAIRAK, O. V. **The orientation of female mites (*Varroa*).** In: **Varroasis, a honey bee disease.** Bucharest: Apimondia Publishing House, p.39-40, 1976.
- BOECKING, O., GENERSCH, E. **Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping.** Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. v.3, p.221-228. 2008.
- BOOT, J.; SISSELAAR, D. J. A.; CALIS, J. N. M. & BEETSMA, J. **Factors affecting invasion of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) into honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae), brood cells.** Bulletin of Entomological Research, 84: p.3-10, 1994.
- BOTTA, E.; CARMENATE,H. & TORRE, P.E. **Varroosis, peligrosa enfermedad de la abeja melífera.** Fitosanidad, 8: p.73-79. 2004.
- CRUZ L. C. ; BATISTA J. E. S. ; ZEMOLIN A. P. P. ; NUNES M. E. M. ; LIPPERT D. B. ; ROYES L. F. F. ; SOARES F. A. ; PEREIRA A. B. ; POSSER T. ; FRANCO J. L. **A Study on the Quality and Identity of Brazilian Pampa Biome Honey: Evidences**

**for Its Beneficial Effects against Oxidative Stress and Hyperglycemia.** p.11. 2014.

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

DE JONG D. **Mites: Varroa and other parasites of brood.** Honey bee pests, predators and diseases, ed. 3, p.231-279. 1997.

DELFINADO, M. D.; BAKER, E. W. **Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina).** Journal of the Washington Academy of Sciences, v.64, n.1, p. 4-10, 1974.

DUAY, P.; DE JONG, D.; ENGELS, W. **Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites.** Apidologie, v.34, p.61-65. 2003.

EMBRAPA. **Apicultura. Sistema de Produção 3.** Embrapa Meio Norte Teresina. ISSN 1678- 8818. Versão Eletrônica. 2003.

EMBRAPA. **Produção de mel.** Sistemas de produção 3. Embrapa Meio Norte Teresina, p.138, 2002.

ENGLAND, D. G. **Varroatosis.** American Bee Journal, v.111, p.468, 1971.

FAO. **Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture the international response.** In: Freitas, B.M.; Pereira, J.O.P. (eds.) Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Imprensa Universitária. Fortaleza, Brasil. 2004.

FONSECA, V. L. O. **Desaparecimento das Abelhas Melíferas (*Apis mellifera*) e as Perspectivas do Uso de Abelhas Não Melíferas na Polinização,** p.14. 2010.

FREITAS, B. M., IMPERATRIZ-FONSECA V. L. **A importância econômica da polinização**. Mensagem Doce. 80, p.44-46. 2005.

FREITAS, D. G. F.; KHAN, A. S.; SILVA, L. M. R. **Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) no Ceará**. Rev. Econ. Sociol. Rural [online]. vol.42, n.1, p.171-188. 2004.

GARRIDO C., ROSENKRANZ P., PAXTON R.J, GONÇALVES L.S. **Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil**. Apidologie, ed. 34, p.535-541. 2003.

GUERRA JR., J. C. V.; ISSA, M. R. C.; CARNEIRO, F. C.; STRAPAZZON, R.; MORETTO, G. **RAPD Identification of *Varroa destructor* genotypes in Brazil and other regions of the Americas**. Genet. Mol. Res., v.9, p.303-308. 2010.

GUZMAN, L.I.;& RINDERER, T.E. **Identifications and comparison of *Varroa* species infesting honey bees**. Apidologie 30: p.85-95. 1999.

GRAMACHO, K. P.; JESUS, R.S. **Avaliação da Ocorrência de Intoxicação Apícola em Abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) por pólen de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) em apiários da Região Central – Bahia**. Diálogos de Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC. Ano III, n. 10, p.139-146. 2009.

HARRIS, J. W.; HARBO, J. R.; VILLA, J. D.; DANKA, R. G. **Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) during a 10-year period**. Environmental Entomology, v.32, p.1305–1312. 2003.

IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro. v.42, p.1-39. 2014.

INABA, R. M; PASIN, L. E. V. **Custo da produção de mel no município de Taubaté**. (O) UNITAU São Paulo, 1998.

IFANTIDIS, M.D. **Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells.** Apidologie, 32: p.89-91. 1988.

KRAUS, B. & HUNT, G. **Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD).** Apidologie, 26: p.283- 290. 1995.

LANGHE, A. B.; NATSKII, K. V. **The mite *Varroa* and the methods of controlling it.** *Pchelovdstvo*, (3): 16-20. English translation in: Varroasis, a Honeybee Disease. Apimondia Publishing House, Bucharest, p.40-46. 1976.

LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G. **Clustal W and Clustal X version 2.0.** Bioinformatics. ed. 23 p.2947–2948. 2007.

PEGORARO A. **ESTUDO DA INTEGRAÇÃO DE DIVERSOS FATORES NO MANEJO DE ABELHAS AFRICANIZADAS *Apis mellifera* Unnaeus., 1758 (Hymenoptera: Apidae), NA UNIDADE FITOGEOGRÁFICA DA FLORESTA COM ARAUCÁRIA, NO SUL DO BRASIL.** 165 f. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, 2003.

PEROSA JMY, Arauco EMR, Santos MLA, Albarracín VN **Parâmetros de competitividade do mel brasileiro.** Inf Econ 34(3): p.41-48. 2004.

POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W.E. **Global pollinator declines: trends, impacts and drivers.** Trends in Ecology and Evolution, v.25, p.345-353. 2010.

ROSENKRANZ, P.; AUMEIER, P.; ZIEGELMANN, B. **Biology and control of *Varroa destructor*.** J InvPathol. 103:S p.96-119. 2010.

SALVADÉ, CARLA E. O., **Identificação do perfil genotípico do ácaro ectoparasito *Varroa destructor* em apiários no sudoeste Rio-Grandense**. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso – Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa. 2015.

SAMBROOK J.; RUSSEL D.W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

SHABONOV, M.; NEDYALKOV, S.; TOSHKOV, A. **Varroatosis – A Dangerous Parasitic Disease on Bee**. American Bee Journal, v.118, p.402-403, 407, 1978.

SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.; VAUTRIN, D.; LE CONTE, Y.; ANDERSON, D.; EVANS, J.; CROSARTEIL, S. & NAVAJAS, M. **The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones**. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences., 272: p.411-419. 2005.

SOLIGNAC, M.; VAUTRIN, D.; PIZZO, A.; NAVAJAS, M.; CONTES, Y. & CORNUET, J. **Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives**. Molecular and Ecology Notes, 3: p.556-559. 2003.

STADEN R., BEAL K.F., BONFIELD J.K. **The Staden package, 1998**. Methods Mol Biol. v.132 p.115–130. 2000.

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

STRAPAZZON, R.; CARNEIRO, F. E.; GUERRA JR., J. C. V.; MORETTO, G. **Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the State of Santa Catarina, Brazil**. Genet. Mol. Res. 8 (3): p.990-997. 2009.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **User Guide TOPO® TA Cloning®**. Disponível em: <[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)> Acesso: 15/09/2016.



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, e.6481, 2009.

WARRIT, N.; HAGEN, T.A.R.; SMITH, S.R. & ÇAKMAK, I. **A survey of *Varroa destructor* strains on *Apis mellifera* in Turkey**. Journal of Apiculture Research, 43: p.190-191. 2004.