



Universidade Federal do Pampa
Campus São Gabriel

**AVALIAÇÃO SANITÁRIA DE APIÁRIOS DO PAMPA PARA VÍRUS DA FAMÍLIA
IFLAVIRIDAE**

MARIANA FONSECA COSTA

São Gabriel (RS), Brasil
Maio de 2013

MARIANA FONSECA COSTA

**AVALIAÇÃO SANITÁRIA DE APIÁRIOS DO PAMPA PARA VÍRUS DA FAMÍLIA
IFLAVIRIDAE**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Andrés Delgado Cañedo

Co-orientadora: Raíssa Ochôa Golin

**São Gabriel
2013**

Costa, Mariana Fonseca
Avaliação Sanitária de Apiários do Pampa
para Vírus da Família Iflaviridae/ Mariana
Fonseca Costa. Data. 22 de maio de 2013.
Número de folhas: 33; tamanho (A4).

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado)
Universidade Federal do Pampa. Data de
defesa: 22 de maio de 2013. Orientação:
Andrés Delgado Cañedo

1. Virologia. 2. Qualidade Ambiental. 3.
Biologia Molecular. I. Cañedo, Andrés
Delgado. II. Título Doutor

MARIANA FONSECA COSTA

**AVALIAÇÃO SANITÁRIA DE APIÁRIOS DO PAMPA PARA VÍRUS DA FAMÍLIA
IFLAVIRIDAE**

ORIENTADOR: ANDRÉS DELGADO CAÑEDO

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Monografia defendida e aprovada em: 22 de maio de 2013.
Banca examinadora:

Orientador Prof. Andrés Delgado Cañedo
Universidade Federal do Pampa

Prof. Rubem Samuel de Ávila Jr.
Universidade Federal do Pampa

Adriana Koslovski Sassi
Universidade Federal do Pampa

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo apoio, paciência e confiança depositada em mim nesses quatro anos e meio de faculdade, muitas vezes entendendo e perdoando minha ausência em importantes datas comemorativas referentes à nossa família;

Aos professores pelos ensinamentos e incentivos;

Agradeço ao meu orientador Andrés, pela confiança em mim depositada e, por além de excelente mestre, ter tornado-se também um bom amigo desde que me “acolheu”.

A minha co-orientadora Raíssa, por toda a ajuda recebida;

Aos amigos que fiz, com quem dividi momentos de alegria e aflição, vivenciando com eles o verdadeiro sentido da amizade;

Aos colegas de curso, pelo coleguismo e convívio que tivemos em sala de aula;

Ao grupo de pesquisa e a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Foi o tempo que dedicaste à tua
rosa que fez tua rosa tão importante.”

Antoine De Saint Exupéry

RESUMO

Nos últimos anos, tem-se visto um declínio acentuado e preocupante em nível global das populações de abelhas, fenômeno atualmente conhecido como Colony Collapse Disorder (CCD), que vem ameaçando seriamente a apicultura e os cultivos que dependem das abelhas para a polinização. Dentre os motivos apontados como suspeitos para esta diminuição estão os vírus. Pelo fato dos enxames serem densamente populosos e terem uma taxa elevada de contato entre os membros das colônias, relacionando-se para comunicação e alimentação, as colônias de abelhas fornecem grandes oportunidades para a transmissão viral. Os vírus podem afetar todos os estágios de desenvolvimento das abelhas, incluindo ovos, crias e adultos, e diminuindo drasticamente a produção melífera e polinização. Dentre as famílias de vírus que afetam as abelhas encontra-se a família Iflaviridae, ainda sem registros científicos de atuação nas colméias de *Apis mellifera* no estado do Rio Grande do Sul. Este trabalho teve como objetivo fazer a identificação dos vírus desta família atuantes em colméias de diferentes cidades do estado. Operárias de *Apis mellifera* adultas e crias mortas foram recolhidas de seis colméias de dois apiários. Estes indivíduos foram levados ao laboratório de biologia molecular da Universidade Federal do Pampa campus São Gabriel, onde foram realizados os processos de extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR com primers específicos para a detecção viral, bem como um primer multiespecífico para três Iflaviridae (*Deformed Wing Virus*, *Kacugo Virus* e *Varroa Destructor Virus*). Obteve-se resultados positivos para a presença de *Varroa Destructor Virus* (VDV-1) com o primer específico para este, bem como amplificação viral, em diferentes amostras, com o primer multiespecífico, sugerindo a presença de outros vírus. Este é o primeiro registro de VDV-1 em colméias da América do Sul. Estes resultados possibilitam um melhor entendimento dos problemas que acometem ou podem acometer os apiários da região, bem como fornece subsídios para novas detecções virais em *Apis mellifera*.

Palavras-chave: CCD, Apicultura, *Apis mellifera*, *Varroa Destructor Virus*, Abelhas.

ABSTRACT

In recent years, we have seen a sharp and worrying decline of the global bee populations, a phenomenon known as Colony Collapse Disorder (CCD), that is seriously threatening beekeeping and crops that depend on bees for pollination. Among the reasons cited for this decline as suspects, are the viruses. Because the swarms are densely populated and have a high rate of contact between the colony members, relating each other for communication and feeding, bee colonies provide great opportunities for viral transmission. The virus can affect all developmental bee stages, including eggs, brood and adults, and drastically reducing honey production and pollination. Among the family of viruses that affect the bees is the Iflaviridae family, with no scientific records in the hives of *Apis mellifera* in the state of Rio Grande do Sul. This study aims to identify the viruses of this family that are present in beehives of different state cities. Adult workers of *Apis mellifera* and dead pups were collected from six hives of two apiaries. These individuals were processed at molecular biology laboratory of the Federal University of Pampa, São Gabriel campus, where we performed extraction of total RNA, cDNA synthesis and PCR with specific primers for viral detection, as well as a multispecies primer that detects three Iflavirus types (Deformed Wing Virus, Kacugo Viruses and Varroa Destructor Virus). Positive results were obtained for the presence of Varroa destructor virus (VDV-1) with a specific primer for this one, as well as viral amplification in different samples using the multispecific primer, suggesting the presence of other viruses. This is the first record of VDV-1 in South America hives. These results allow a better understanding of the problems that affect or may affect the region apiaries, as well as provides subsidies for new viral detections in *Apis mellifera*.

Key-words: CCD, Apiculture, *Apis mellifera*, *Varroa Destructor Virus*, Bees.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 Introdução | 10 |
| 1.1 A <i>Apis mellifera</i> L. | 12 |
| 1.2 Distúrbio do Colapso das Colônias (CCD-Colony Collapse Disorder). | 13 |
| 1.3 Doenças da <i>Apis mellifera</i> L. | 14 |
| 1.3.1 O ácaro <i>Varroa destructor</i> | 15 |
| 1.3.2 A Nosemose | 15 |
| 1.3.3 Vírus | 16 |
| 1.4 Pesticidas e Agrotóxicos | 17 |
| 2 Objetivos | 19 |
| 3 Material e Métodos | 20 |
| 3.1 Amostras | 20 |
| 3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA | 21 |
| 3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 21 |
| 4 Resultados e Discussão | 23 |
| 4.1 O <i>Varroa Destructor Vírus</i> | 28 |
| 5 Conclusão | 31 |
| 6. Referências Bibliográficas | 32 |

1 Introdução

As abelhas surgiram há 100 milhões de anos nas regiões áridas do então supercontinente Gondwana, acredita-se atualmente que o surgimento e a proliferação destas tenha relação com o aparecimento das angiospermas (SANTOS, 2010 apud FONSECA et. al., 1993). Atualmente existem dez famílias de abelhas, com aproximadamente 700 gêneros e 20 mil espécies, destas, a grande maioria tem hábitos solitários, e cerca de 1000 espécies são sociais. (FONSECA e SILVA, 2010).

Estes insetos possuem grande importância biológica e financeira, devido ao seu grande potencial polinizador. A maior eficiência das abelhas como polinizadoras, comparando-se com outros insetos, dá-se pelo seu grande número na natureza e pela sua grande adaptação a complexas estruturas florais, aumentando de forma muito eficaz o rendimento de sementes e frutos, sendo, em algumas regiões, responsáveis por 90% da polinização local (CARVALHO, 2010).

Além disso, sua importância também é atribuída ao fato de produzirem variados produtos que podem ser utilizados como matéria prima na indústria farmacêutica, no mercado de cosméticos, bem como serem consumidos como alimento pelo seu alto valor nutricional. Dentre esses produtos estão o mel, cera, própolis, pólen apícola, geléia real e apitoxina.

O homem utiliza o mel como alimento desde a pré-história, e por muitos séculos o retirava dos enxames de forma predatória, muitas vezes causando danos e matando as abelhas. Nessa época o alimento ingerido era uma mistura de mel, pólen, crias e cera, pois o homem ainda não sabia como separar os produtos do favo. Os enxames, muitas vezes, morriam ou fugiam, obrigando o homem a procurar novos ninhos cada vez que necessitasse retirar o mel para consumo. Com o tempo, passou-se a aprender a lidar com os enxames sem matá-los, protegê-los, e instalá-los em colméias de forma a aumentar a produção do mel e não matar as abelhas. Mas a chave para a apicultura racional foi a invenção da colméia de quadros móveis, pelo Reverendo Lorenzo, em 1851. Esta permitiu a criação racional de abelhas, favorecendo o avanço tecnológico da atividade como a conhecemos hoje. Atualmente são conhecidas 20 mil espécies de abelhas, dentre as quais, aproximadamente 3 mil podem ser encontradas no Brasil, mas acredita-se que existam aproximadamente 40 mil espécies ainda não descobertas. Dessas, apenas

2% são sociais e produzem mel. Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas (SEBRAE 2009).

Estas são originárias da Europa e foram introduzidas no Brasil no século XVIII, no Sul do país, por Jesuítas, e no Rio de Janeiro (1839), para suprir apiários na produção de mel e cera.

Dentre as abelhas *Apis* que foram trazidas ao Brasil, houve um destaque à *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), principalmente a subespécie de origem africana, pela maior produção de mel. Antes da introdução destas no Brasil, as subespécies responsáveis pela produção melífera no país eram: a alemã [*Apis mellifera mellifera* L.] e a italiana [*Apis mellifera ligustica* Spinola] muito mansas mas com produtividade não compatível com o que ofereciam as floradas da região (CARVALHO, 2010).

Atualmente no Brasil, todas as abelhas *Apis* encontradas na natureza são mestiças, polihíbrido denominado por Gonçalves (2006) de abelha africanizada, que foi formado pelo cruzamento entre as raças européias e a africana.

As abelhas africanizadas encontram-se distribuídas desde o sul do Brasil até o Sul do EUA e são mais adaptadas ao meio ambiente tropical do que as subespécies européias, mostrando-se melhores produtoras de mel nas condições tropicais e com maior tolerância às pragas e doenças (BRASIL *et al.* 2010.)

A produção de mel obtida de floradas silvestres está se tornando cada vez mais escassa no mundo. Por esse motivo, atualmente, a exploração da apicultura está cada vez mais dependente das culturas agrícolas que, na maioria dos sistemas produtivos, utilizam os agroquímicos de maneira inadequada. Essa situação prejudica a qualidade do mel e dos demais produtos apícolas, pois ocasiona a contaminação da produção com resíduos que podem ser tóxicos para o homem.

No Brasil, ocorre o contrário. As floradas silvestres têm se tornado cada vez mais importantes para o setor apícola, graças às vastas áreas disponíveis, as características especiais de flora e clima que, aliados à presença da abelha africanizada, conferem ao país um potencial fabuloso para a atividade apícola. O Brasil figura como o 11º maior produtor de mel e ocupa a 5ª posição no *ranking* mundial de exportação. Em maio de 2012 foram exportadas 1.975 toneladas de mel, gerando uma receita de US\$ 5,9 milhões. O valor médio pago pelo quilo do mel exportado foi de US\$ 3,02. (SEBRAE 2006; 2012)

No cenário apícola mundial o Brasil é reconhecido pelo domínio da metodologia de controle e manejo das abelhas africanizadas. Essas abelhas

oferecem ao país uma vantagem competitiva em relação aos seus concorrentes, pois são rústicas e mais tolerantes a doenças que as abelhas européias.

1.1 A *Apis mellifera* L.

O habitat das abelhas *Apis mellifera* é bastante diversificado e inclui savana, florestas tropicais, deserto, regiões litorâneas e montanhosas. Essa grande variedade de clima e vegetação acabou originando diversas subespécies ou raças de abelhas, aproximadamente 26, com diferentes características e adaptadas às diversas condições ambientais (RAMOS, e CARVALHO, 2007). A abelha africanizada do Brasil possui um comportamento agressivo, porém, menos que as africanas, têm grande facilidade de enxamear, alta produtividade, tolerância a doenças, alto comportamento higiênico e de *grooming* (processo em que o grupo ajuda a remover parasitas uns dos outros) e adapta-se a climas mais frios, continuando o trabalho em temperaturas baixas, diferente das européias, que se recolhem nessa época (GRAMACHO e JESUS, 2009)

São insetos sociais que vivem em colônias organizadas em que os indivíduos se dividem em castas, possuindo funções bem definidas que são executadas visando sempre à sobrevivência e manutenção do enxame. Numa colônia, em condições normais, existe uma rainha, cerca de 5.000 a 100.000 operárias e de 0 a 400 zangões (EMBRAPA 2003)

A rainha tem por função a postura de ovos e a manutenção da ordem social na colméia. A larva da rainha é criada num alvéolo modificado, bem maior que os das larvas de operárias e zangões, de formato cilíndrico, denominado realeira, sendo alimentada pelas operárias com a geléia real, produto rico em proteínas, vitaminas e hormônios sexuais. A rainha adulta possui quase o dobro do tamanho de uma operária e é a única fêmea fértil da colméia. Quando a rainha morre, ou ainda quando o enxame está muito populoso e falta espaço na colmeia, as operárias escolhem ovos recentemente depositados ou larvas de até 3 dias de idade. Em caso de população grande, a rainha velha enxameia com, aproximadamente, metade da

população antes do nascimento de uma nova rainha. Também pode ocorrer que a nova rainha elimine a rainha antiga, logo após o nascimento.

As abelhas operárias são responsáveis por todas as tarefas dentro e fora da colméia. Suas atividades obedecem a uma escala de trabalho que, normalmente, está associada à idade do indivíduo. As operárias não apresentam os órgãos reprodutivos completamente desenvolvidos, por terem nascido em berços pequenos e não terem sido alimentados com geléia real. (CARVALHO, 2010).

Geneticamente, uma rainha é idêntica a uma operária. Ambas se desenvolvem a partir de ovos fertilizados. Entretanto, fisiológica e morfológicamente essas castas são diferentes em razão da alimentação diferenciada que as larvas recebem. Mesmo tendo recebido um alimento menos nutritivo, uma larva de, no máximo, 3 dias pode transformar-se em rainha se passar a receber a alimentação adequada. Entretanto, quanto mais nova for a larva, melhor será a qualidade da rainha e sua capacidade de postura.

O zangão é a abelha macho, não possui ferrão e, nasce de ovos não fecundados, depositados pela rainha. A única função dos zangões é a fecundação das rainhas virgens. As larvas de zangões são criadas em alvéolos maiores que os alvéolos das larvas de operárias. Durante o acasalamento, o órgão genital do zangão (endófalo) fica preso no corpo da rainha e se rompe, ocasionando sua morte. (RAMOS e CARVALHO, 2007).

1.2 Distúrbio do Colapso das Colônias (CCD-Colony Collapse Disorder)

Visando a maximização dos índices de produtividade, a agricultura moderna vêm utilizando técnicas que afetam de forma muito negativa a população de polinizadores, em especial as abelhas. Em anos recentes, as populações de abelhas vêm sofrendo uma severa diminuição, causando uma preocupação em nível global.

Estudos afirmam que o declínio pode ser devido a uma combinação de fatores, incluindo doenças, perda de habitat ou ainda serem causadas por intoxicações de pesticidas e agrotóxicos, que as atingem por ocasião das suas

visitas às floras e frutos das culturas vegetais. Entretanto, as perdas aumentaram muito em anos recentes, com os sintomas novos, ameaçando seriamente a apicultura e os cultivos que dependem das abelhas para a polinização. Este novo fenômeno tem sido chamado de "Colony Collapse Disorder" (CCD) (Distúrbio do Colapso das Colônias) e vem assolando as colméias há alguns anos. Segundo os primeiros relatos, o CCD originou-se na Flórida espalhando-se rapidamente pelos Estados Unidos, atingindo o Canadá, Europa e Taiwan (De JONG, 2010)

Colônias com CCD podem ter a aparência de saudáveis poucas semanas antes de entrar em colapso. Entretanto, as abelhas adultas, de repente, começam a desaparecer das caixas originando a "doença de desaparecimento". As abelhas deixam caixas cheias de mel, pólen, cria operculada, uma rainha e, às vezes, um punhado de operárias, na maioria recém saídas da pupa. Abelhas mortas não são encontradas dentro de colméias com CCD nem encontradas no chão perto das caixas. Muitas vezes, por terem restado tão poucas operárias para coletar alimento e cuidar das crias, a colônia rapidamente definha e morre.

O desaparecimento das abelhas já é um fenômeno mundial, que preocupa tanto os apicultores, que perdem as suas colméias, bem como os agricultores, pois se sabe que 70% dos alimentos de origem vegetal consumidos pelo homem são polinizados pelas abelhas. (GONÇALVES, 2012).

1.3 Doenças da *Apis mellifera* L

Nos EUA e na Europa, pesquisadores têm focado em algumas doenças, deficiências e contaminações que possam estar associadas ao CCD. Estes incluem infestações com o ácaro parasita *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000), vários vírus, alguns associados com o ácaro, Nosemose, nutrição deficiente, pesticidas e agrotóxicos. (De JONG, 2010).

Por outro lado, algumas possibilidades como transportar pólen de plantas geneticamente modificadas, a radiação de telefones celulares, e, talvez, até mesmo estresse em si, podem ser descartadas como causas contribuintes para o Colony Collapse Disorder (WATANABE, 2008)

1.3.1 O ácaro *Varroa destructor*

Um fator comum a todos os casos de CCD nos EUA e também para a apicultura no Brasil é o ácaro *Varroa destructor*. Este ácaro suga a hemolinfa das abelhas adultas e crias, enfraquece o sistema imunológico das abelhas e também transmite vírus. Já matou milhões de colméias em todo o mundo e eliminou completamente as colméias silvestres e qualquer outra colméia que não foi tratada nos EUA e Canadá nos anos 90. A doença causada pelo ácaro *Varroa* é a Varroose e seu dano varia com a raça de abelhas e as condições climáticas. Embora, ao parasitar uma abelha, o ácaro possa por ela transportar-se e assim infectar novas colméias, os níveis de infestação são relativamente baixos e estáveis, causando poucos danos às abelhas africanizadas do Brasil (MORETTO, GUERRA *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2005)

Quando o *Varroa* foi descoberto em nosso país em 1978, houve uma grande preocupação porque era conhecido como mortal. Em 1981, encontraram-se altos índices de infestação, mais de 60 ácaros para cada 100 abelhas em algumas das colméias africanizadas. Apesar disto, observou-se que colméias da espécie *Apis mellifera* africanizada podem sobreviver ao ácaro e, felizmente, as infestações começaram a diminuir ao ponto que em 1984 a infestação média era de menos de cinco ácaros para cada 100 abelhas. As abelhas africanizadas do Brasil haviam se adaptado a esta nova praga em poucos anos (De JONG, 2010).

1.3.2 A Nosemose

A Nosemose é causada por um microsporídeo, podendo ser um destes, *Nosema apis* (Zander, 1909). Desenvolvem-se nas células da mucosa do intestino médio de abelhas adultas: operárias, zangões e rainhas. Os ovos, pupas e larvas não são afetados. Ao atacar o sistema digestivo da abelha danifica-o e o expõe a numerosas bactérias e vírus, causando o encurtamento de vida útil da abelha. É

uma doença que tem ressurgido em tempos recentes e é suspeita como uma das causas de CCD (ALAUX, FOLSCHWEILLER *et. al.*, 2011; De JONG, 2010).

1.3.3 Vírus

Embora com maior tolerância, a abelha africanizada também está sujeita aos vírus, eles afetam todos os estágios de desenvolvimento das abelhas (ovos, crias e adultos), assim como podem estar presentes em todas as castas.

Pelo fato dos enxames serem densamente populosos e terem uma taxa elevada de contato entre os membros da colônias, relacionando-se para comunicação e alimentação, as colônias de abelhas fornecem grandes oportunidades para a transmissão viral. Além disso, as colônias de abelhas podem ser atacadas por mais de um vírus simultaneamente (CHEN *et al.* 2006).

A característica mais crucial na dinâmica das infecções virulentas é o modo de transmissão do vírus. Em geral, a transmissão de vírus pode ocorrer através de duas vias: transmissão horizontal e vertical. Na transmissão horizontal, os vírus são transmitidos entre indivíduos da mesma geração, de forma direta através da alimentação, fezes, acasalamento e, de forma indireta, por parasitas. A transmissão vertical ocorre de rainha infectada ou zangão infectado para sua prole.

A transmissão horizontal é fortemente dependente do número de agentes patogênicos. Quanto maior for o número de agentes parasitas, maiores as oportunidades para a exploração destes na colônia e, assim, uma maior taxa de transmissão (CHEN *et al.* 2006)

Como os ácaros se alimentam e se movem regularmente entre ninhada e abelhas adultas, eles possuem grande potencial para atuarem como vetores virais, mas também podem atuar como uma incubadora de replicação, ampliando e potencializando seus efeitos sobre as abelhas e colméia. Segundo Fievet, J. *et. al.* (2006) *apud* Allen & Ball (1996) já foram encontrados 18 vírus atuantes em abelhas, destes mais de 15 têm sido descritos para *Apis mellifera* até a data. Os seguintes vírus podem ser citados como os mais comuns: *Sacbrood Vírus (SBV)*, *Black Queen*

Cell Virus (BQCV), *Deformed Wing Virus* (DWV), *Chronic Bee Paralysis Virus* (CBPV), *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV), *Kashmir Bee Virus* (KBV), *Kakugo Virus* (KV), *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV) e *Varroa Destructor Virus* (VDV-1).

Com exceção dos vírus da família Iridoviridae, que possui DNA no seu genoma, os vírus que atuam em abelhas possuem RNA de senso positivo e fita simples e são pertencentes às famílias Iflaviridae, Cripaviridae e Dicrostoviridae, as quais estão dentro da superfamília de vírus denominados Picorna-like. A estrutura viral consiste em uma molécula de RNA revestida com proteínas do cápsideo. O genoma de RNA é covalentemente ligado por uma proteína chamada VPG (viral protein genome-linked) na extremidade 5' e uma cauda poliA na extremidade 3' (ONGUS, ROODE *et al.* 2006)

A replicação do vírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira. A partícula de vírus prende-se na superfície da célula hospedeira e interage com um receptor na membrana celular e injeta o seu genoma de RNA na célula hospedeira. Uma vez no interior da célula hospedeira, o genoma de RNA é traduzido em uma única poliproteína, que é subsequentemente clivada em proteínas estruturais e proteínas funcionais para replicação do RNA por uma protease própria do vírus denominada C3 (CHEN *et al.* 2006)

Muitos vírus podem comumente ocorrer em populações de abelhas, sem resultar em infecção latente. Tal baixo nível, porém crônico, leva a infecções persistentes que podem ser mantidas nas populações durante muitas gerações, causando pouco ou nenhum dano, ou ainda em determinadas circunstâncias, podem ser estimulados ou ativados para replicar-se rapidamente ou para infectar as fases sensíveis ou órgãos e iniciar as agudas e frequentes infecções fatais (RIBIÈRE *et al.* 2008; GENERSCH e CARTER, 2008).

1.4 Pesticidas e Agrotóxicos

Nos últimos anos vem aparecendo com bastante destaque os pesticidas agrotóxicos do grupo neonicotinoides. Estes pesticidas são altamente tóxicos para as abelhas. Eles apresentam atividade enzimática que atuam fisiologicamente no

olfato e na memória das abelhas, bem como no comportamento de vôo das mesmas, em especial nas atividades de forrageamento, o que explica, em parte, o desaparecimento das abelhas sem deixar vestígios de morte (GONÇALVES, 2012)

No Brasil, os pesticidas e agrotóxicos também são apontados como responsáveis por uma doença conhecida como “Mal do Outono”. Muitos cultivos que florescem no outono recebem pulverização de inseticidas para minimizar os efeitos dos cortes pelas formigas, que estão se preparando para estocagem de alimentos antes da chegada do inverno. Essa prática acaba refletindo na criação de abelhas, que visitam as flores dos cultivos na busca de mel e pólen (SILVA, 2010)

A ocorrência de doenças nas colméias acarreta prejuízos diretos pela diminuição da produtividade, uma vez que o aumento da mortalidade, tanto de crias como de abelhas adultas, leva a uma redução da população da colméia com consequente redução da produção (EMBRAPA, 2003). Além disso, o uso das abelhas na polinização de cultivos também se vê afetada com grandes perdas.

Lamentavelmente, o CCD já está presente no Brasil. Segundo Gonçalves, (2012) o primeiro caso de desaparecimento de abelhas no país ocorreu em 2008, no estado de São Paulo, porém já existem vários casos pontuais detectados recentemente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, onde em Florianópolis, no ano de 2012, apicultores registraram perda de 50% a 90% de suas colônias, com sérios prejuízos econômicos.

O CCD é um fenômeno de importância global, que ameaça seriamente a população de abelhas, porém por ser algo ainda pouco conhecido e devido à falta de pesquisas específicas para comprovar as causas já registradas, o problema continua e tende a se agravar.

Por todos os motivos acima citados, o estudo de eventos que levam à morte das abelhas é de grande importância para a ecologia e economia mundial, e o conhecimento científico destes é de suma importância.

2 Objetivos

Com base na problemática abordada, o presente trabalho visa alcançar os seguintes objetivos:

- Identificar, através de ferramentas moleculares, na região do Pampa gaúcho, os principais vírus da família Iflaviridae que afetam a saúde das abelhas *Apis mellifera*.
- Desenhar *primers* específicos para o vírus *Varroa destructor Virus* e estabelecer sua detecção através da técnica de Reação em Cadeira da Polimerase.
- Estabelecer em laboratório as técnicas de identificação dos vírus DWV e KV utilizando os *primers* descritos na literatura.
- Avaliar a presença de *Iflavirus* em abelhas da região do pampa em: cabeça da abelha, corpo (tórax e abdômen) e em crias mortas.

3 Material e Métodos

3.1 Amostras

As amostras são provenientes de seis colméias, distribuídas em três apiários, e a coleta foi realizada de forma a priorizar colméias com sinais de enfraquecimento. Os apiários eram de propriedade de colaboradores localizados em dois municípios diferentes do pampa, no estado do Rio Grande do Sul: São Gabriel (Fig. 1) e Alegrete.



Figura 1 - Imagens de um dos apiários de São Gabriel, onde foram realizadas as coletas.

Para estabelecimento das técnicas foram usadas abelhas de apiário experimental mantido em colaboração com o apicultor Aldo Machado dos Santos, em São Gabriel.

O material foi coletado entre o período de Junho de 2012 e Fevereiro de 2013 e levado ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Pampa, *campus* São Gabriel/RS.

Foram coletadas 6 abelhas por caixa, abelhas com sintomas de doenças e sem sintomas aparentes, exceto a coleta de uma única caixa, onde foi recolhido um zangão, uma operária assintomática e uma operária sintomática.

Cada amostra foi composta de 3 indivíduos (sintomáticos ou assintomáticos) que foram coletados diretamente da caixa de abelhas num microtubo de 2ml e

colocados em caixa de isopor com gelo, mantendo as abelhas neles até a chegada ao laboratório onde foram mantidas no inibidor de RNAses (Invitrogen, EUA) a -20°C até o momento da extração de RNA.

3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para análise de patógenos virais foi extraído RNA, e também se realizou extração de DNA para detecção de patógenos não virais.

Para a extração de RNA, cada abelha foi dividida separando a cabeça do resto do corpo (tórax e abdômen). Assim, as cabeças e os corpos foram levados ao TissueLyser II¹ onde foram triturados em tubos de 2ml na presença de 2 esferas de aço de 3 mm em 1ml de RNALater. (Invitrogen, EUA).

Para extração de RNA foi usado 300 μl da amostra processada.

A extração de RNA foi realizada com kit específico para tal finalidade (Pure Link TM RNA) usando colunas cromatográficas, seguindo as especificações do fabricante (Ambion, EUA).

Após a extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em luz UV 260/280 nm no espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare, USA) para verificação da concentração de RNA e foram estocadas em freezer -80°C .

Após a quantificação, parte da amostra (1 μg de RNA total) foi usada como molde para síntese de cDNA usando um oligonucleotídeo poli dT como primer e MMLV como transcriptase reversa, seguindo as recomendações do fabricante da enzima (Invitrogen, EUA). O cDNA foi estocado a -20°C até uso.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de cDNA foram analisadas por PCR para avaliar a presença ou ausência de patógenos.

¹ Mais informações em <<http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Automated-Solutions/Sample-Disruption/TissueLyser-II#orderinginformation>>

No caso de *primers* previamente publicados, as condições de ciclo seguiram as recomendadas na publicação. No caso dos oligonucleotídeos desenhados para este trabalho, foram usadas as seguintes condições:

- Fase de Desnaturação Inicial a 95°C durante cinco minutos, seguida de 40 ciclos de fase de Desnaturação a 95°C durante 50 segundos, fase de Hibridização, a 58°C durante um minuto e extensão a 72°C por um minuto. Após a ciclagem a reação foi concluída por uma fase de Extensão final, durante seis minutos a uma temperatura de 72°C.

Foram utilizados *primers* específicos para cada vírus, bem como um *primer* multiviral capaz de amplificar 3 vírus (tab. 1)

Foi utilizado o *primer* do gene endógeno “Beta-actina” para verificar a qualidade das amostras obtidas.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed (Biotium) e visualizados sob luz UV. As imagens foram obtidas em fotodocumentador (ChemiBis).

Tabela 1 - São apresentados todos os primers que foram usados, os vírus que estes amplificam e a citação do trabalho do qual foram obtidos.

| <i>Patógeno</i> | <i>Nome</i> | <i>Sequência</i> | <i>Citação</i> |
|-----------------|--------------------|----------------------|--------------------------------------|
| DWV | DWV F | TCGACAATTTTCGGACATCA | Chen et al (2006) |
| | DWV R | ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA | |
| DWV/VDV1/Kakugo | Multi-virus VP1a F | CTCGTCATTTTGTCCCGACT | Williams et al., (2009) |
| | Multi-virus VP1a-R | TGCAAAGATGCTGTCAAACC | |
| Beta Actina | Actin-F | ATGAAGATCCTTACAGAAAG | Williams et al., (2009) |
| | Actin-R | TCTTGTTTAGAGATCCACAT | |
| VDV-1 | VDV-F | CGAAACGAAGAGAGCATGTA | Desenhados para este trabalho. |
| | VDV-D | CGACTCTTCCCCAGCTAAG | |

4 Resultados e Discussão:

Dos três apiários amostrados, registrou-se presença viral em dois, sendo estes localizados no município de São Gabriel.

Obteve-se resultado positivo para a presença de vírus da família Iflaviridae em três colméias analisadas:

Varroa Destructor Vírus foi detectado em duas amostras; (fig.2)

A análise de *Deformed wing virus* não apresentou bandas quando foram usados os *primers* potencialmente específicos para detectá-lo, porém o *primer* multiviral (que apresenta produto da PCR quando DWV está presente na amostra) amplificou em cinco amostras.(fig.3)

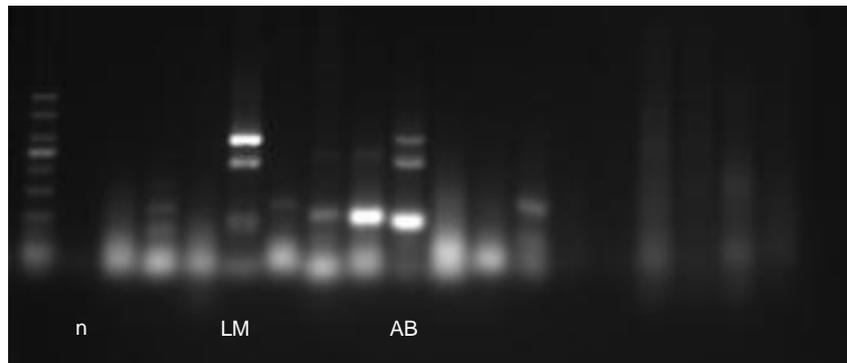


Figura 2 - Gel de agarose 1,5% com *primer* para VDV-1 mostrando as amostras que amplificaram para este *primer*, sendo (n) o controle negativo, (LM) amostra contendo larva morta e (AB) amostra de abelha sintomática. Marcador molecular: Law Range DNA Ladder

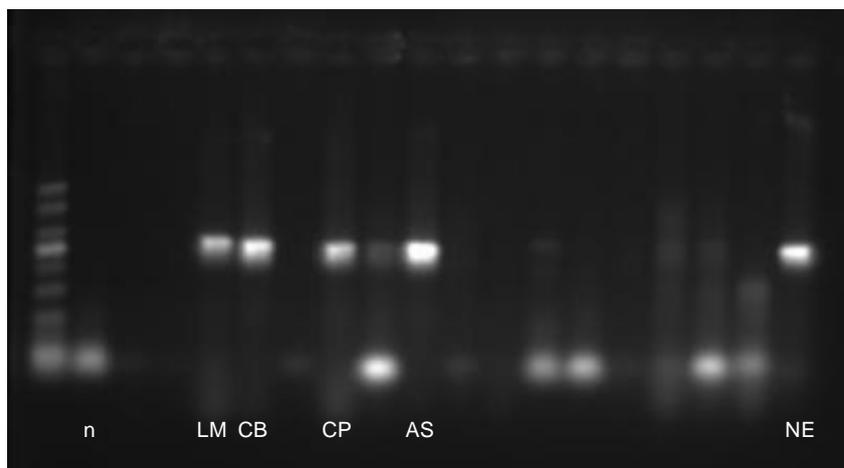


Figura 3 – Gel de agarose 1,5% com *primer* multiviral, mostrando as amostras que amplificaram para este *primer*. Sendo (n) o controle negativo, (LM) amostra contendo larva morta, (CB) cabeças de caixa com DWV, (CP) corpos de caixas com DWV, (AS) operária com asas deformadas e (NE) abelha não eclodida e com asas deformadas. Marcador molecular: Law Range DNA Ladder.

Na tabela 2 observa-se os *primers* utilizados e as amostras que amplificaram para cada um deles.

Tabela 2 - Primers utilizados nas reações de PCR e as amostras que amplificaram registrando presença viral para cada um deles.

| | Primer Multiviral | Primer específico VDV-1 |
|--|-------------------|-------------------------|
| Larva Morta | x | |
| Cabeça (caixa com DWV) | x | x |
| Corpo (caixa com DWV) | x | |
| Operária com asas deformadas | x | x |
| Abelha não eclodida escura e com asas deformadas | x | |

Anteriormente aos testes virais, as amostras foram testadas com o *primer* para amplificar um fragmento do gene de Beta-actina, para verificação da sua qualidade (Fig. 4), onde mostraram que a técnica de macerar o material coletado diretamente no inibidor de RNAses e usá-lo para estocagem do material até seu uso em laboratório é eficaz, pois conservou as amostras com sucesso e qualidade, e que as amostras negativas para infecção viral não eram amostras com problemas no seu processamento.

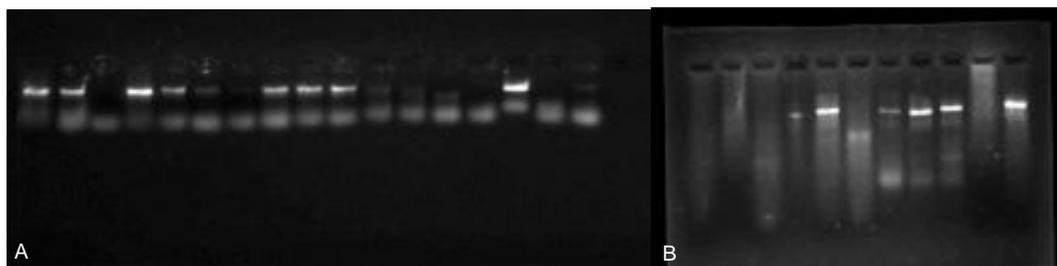


Figura 4 - Gel de agarose 1,5% mostrando com Beta Actina as amostras capazes de amplificar. As amostras negativas para o teste A, foram submetidas a um segundo teste (B) com 2 μ l de Beta Actina. As que após o segundo teste não amplificaram, não foram submetidas ao teste de PCR com iniciadores virais e foram descartadas.

Após observado o resultado das amostras para o teste PCR multiespecífico, apenas os resultados positivos para este foram submetidos ao teste com o primer específico para DWV, resultando negativamente para este em todas as repetições. (fig. 5)

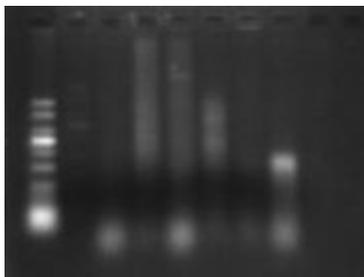


Figura 5- Gel de agarose 1,5% mostrando ausência de amplificação de PCR para DWV. Law Range DNA Ladder.

Para avaliar se houve erro no processo de PCR, foi realizada mudança do tampão e de temperatura de hibridização, uma vez que os testes iniciais foram feitos com tampão contendo KCl e a temperatura era de 58°C, então utilizou-se tampão contendo MgSo4 e temperatura 56°C, resultando novamente negativo aos testes para DWV.

Apesar dos dados negativos para PCR, presença do vírus DWV nas amostras amplificadas com primer multiespecífico poderia ser esperada, pois foram recolhidas abelhas com asas deformadas (fig. 6), e a relação DWV e deformação das asas é aceita pela comunidade científica e amplamente documentada, como por exemplo em Lanzi, G. et. al. (2006). Supõe-se então que a não amplificação deste vírus nos testes de PCR pode ser devido a algum erro no *primer* específico, pois as amostras positivas para vírus no primer multiviral foram as amostras de abelhas sintomáticas. Poderia-se também supor que tais resultados positivos seriam amplificação para *Kakugo Vírus*, pois o primer multiviral também é capaz de detectar este. Porém, além de não evidenciar sintomas nas asas como o DWV, KV é encontrado apenas no cérebro de operárias, tornando-as muito agressivas, como relatado por Fujiyuki, T. et. al (2004).

Para esclarecer a não amplificação específica do vírus DWV em nossos resultados, as amostras positivas para DWV serão analisadas com novos *primers* e as bandas obtidas com DWV multi serão submetidas a sequenciamento.



Figura 6 – Três (3) abelhas amostradas, possuindo as duas (2) primeiras, visível deformação nas asas. Foto: Leôncio Batista.

A técnica de RT-PCR foi utilizada pois, levando em consideração que os métodos sorológicos são muitas vezes pobres em especificidade e sensibilidade, e a reação em cadeia da polimerase revolucionou o diagnóstico da infecção por vírus, além de oferecer um método padrão para o diagnóstico específico e sensível de infecção viral (CHEN, Y. *et al.* 2004). Esta técnica também foi utilizada por vários autores como Teixeira, E. W. *et. al.* (2008), Chen, Y. *et. al.* (2005), Yue, C. *et. al.* (2005), Reynaldi, J. F *et. al* (2010) mostrando-se muito eficaz para este tipo de abordagem experimental.

No entanto, um único ensaio de RT-PCR com *primers* específicos permite a detecção de apenas um vírus por reação, e a detecção de vários vírus exigiria vários ensaios de RT-PCR. Assim, sempre que possível é aconselhável a utilização de primers multiespecíficos ou uso da técnica de PCR Multiplex que permite a detecção de vários tipos de vírus na mesma reação, excluindo as amostras sadias e reanalisando as amostras infectadas com *primers* específicos. Isto permite a detecção simultânea de vírus diferentes numa única reação e pode reduzir o tempo e os custos de diagnóstico (CHEN *et al.*, 2004), como pode ser observado neste trabalho.

As amostras vindas do apiário localizado no município de Alegrete não apresentaram resultado viral positivo. Este resultado provavelmente se deve ao fato de que, como relatado pelo apicultor local, este apiário estava a mais de dois anos sem haver sofrido retirada melífera. No momento da coleta também pode-se observar que as caixas estavam extremamente seladas com muito própolis e o enxame estava muito forte.

Estes dados reforçam que a maior incidência de patologias nas colméias dá-se quando os enxames estão enfraquecidos, o que geralmente ocorre durante o inverno, devido ao frio e/ou baixa oferta de alimento. As abelhas coletadas neste local são provindas de um enxame que provavelmente não sofreu com falta de alimento nos dois últimos invernos e então encontravam-se assim muito fortes e resistentes às patologias, apresentando dados negativos para o testes virais.

A análise das amostras com *primers* específicos para o vírus VDV-1 apresentou dados positivos em amostras de cabeça de abelhas com asas deformadas, que também apresentaram banda quando amplificadas com primers DWV multi, estes dados concordam com os resultados de Zioni et. al. (2011) que encontraram replicação ativa de DWV e VDV-1 apenas nas cabeças de abelhas sintomáticas que recentemente haviam surgido com asas mutiladas, e não nas cabeças de abelhas assintomáticas que recentemente haviam surgido.

Dentre os resultados positivos para o *primer* Multiviral, pode-se observar também uma amostra de cria morta. Esta larva no momento da coleta já estava morta e desoperculada.

É um dos sintomas do CCD encontrar favos onde há, na parte de crias, algumas mortas e desoperculadas, pois devido ao fato das abelhas africanizadas terem um alto comportamento higiênico, as operárias retiram crias que percebem estarem doentes.

Esta ação pode ser uma das grandes vias de transmissão viral. Como relatado por Shen et al. (2005) onde foi observado com o vírus Sacbrood que, abelhas operárias ao retirarem do alvéolo larvas mortas mas com vírus ainda ativo, contaminavam-se com este, uma vez que, ingeriam partes da larva infectada. Posteriormente, voltavam a alimentar o restante das larvas com secreções de suas glândulas hipofaríngeas e com isso propagavam o vírus a outras abelhas.

Este fato pode explicar a amplificação positiva com o *primer* multiviral para o corpo (tórax e abdômen) de uma operária sintomática. Esta amostra foi recolhida de um enxame onde também foi retirado um zangão e uma operária assintomática. O zangão mostrou-se negativo ao teste, bem como a operária assintomática. Isso nos leva a propor a contaminação da operária pela via horizontal, por alimentação provinda de alguma operária contaminada, quando esta ainda era larva ou por contaminação via *Varroa*, mas não pela via vertical.

4.1 O *Varroa Destructor* Vírus

Vírus recentemente descrito (ONGUS *et al.* 2004), encontrado pela primeira vez no ácaro *Varroa destructor*.

Por ser um vírus que está começando a ser estudado, não existe até o momento muita literatura sobre este, porém os estudos já realizados mostram que o genoma de VDV-1 é muito similar ao de outros Iflaviridaees, e devido a essas semelhanças foi atribuído ao gênero Iflavirus.

Baseando-se em domínios da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), Ongus, *et al.* (2004) construíram uma árvore filogenética entre os vírus e suas respectivas famílias (fig. 7). Nela mostram que VDV-1 é um parente próximo de DWV e KV e afirmam que possivelmente os três vírus tenham evoluído de um ancestral em comum.

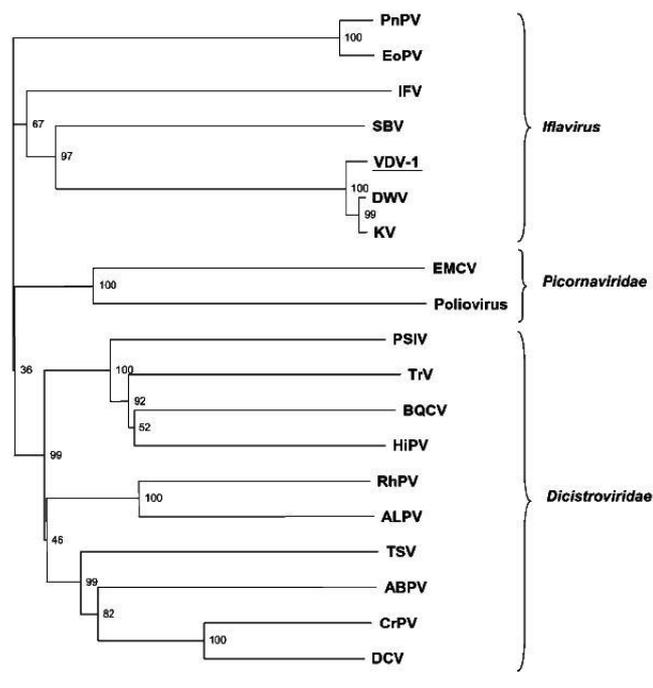


Figura 7. Árvore filogenética construída por Ongus, J. R. et al. (2004) com base nos domínios de RdRp, mostrando a proximidade entre VDV-1, DWV e KV.

Ao descrever VDV-1, Ongus *et al.* (2004), verificaram que este e DWV possuem 84% de identidade em suas sequências de ácido nucléico e 95% de identidade de aminoácidos. Seu genoma codifica um único polipeptídeo grande, que

é clivado para originar as proteínas virais não estruturais e estruturais (MIRANDA e GENERSCH, 2010).

A principal diferença entre DWV e VDV-1 está localizada na UTR 5' do genoma viral, embora existam também várias diferenças de nucleotídeos entre as regiões codificantes desses vírus, que resultam em alterações de aminoácidos nas suas proteínas. Verificou-se também que ambos os vírus podem coexistir na abelha e no ácaro (ONGUS et al., 2004).

Devido ao elevado grau de semelhança, Miranda e Genersch (2010) bem como Lanzi (2006) consideram que VDV-1 pode ser uma variante genética de DWV, embora os vírus possam ser distinguidos por RT-PCR com iniciadores específicos para cada um. Contudo, nossos dados mostram que DWV poderia ser detectado tanto em cabeça quanto no corpo das abelhas, mas o VDV1 somente foi detectado na cabeça, isto demonstra que estes vírus apresentam tropismos diferentes e por tal motivo se fundamenta a ideia de que são vírus diferentes.

Embora os sintomas sejam uma rápida forma de detecção viral em enxames, os diagnósticos de vírus em abelhas com base apenas nestes nem sempre são confiáveis, pois como relatado por Shen, M. et al. (2005), as abelhas infectadas podem não apresentar sintomas e os vírus são capazes de permanecerem dormentes por longos períodos de tempo sem qualquer dano aparente para o anfitrião.

As populações de abelhas *Apis mellifera* do Brasil, embora mais rústicas e tolerantes a doenças, estão sendo cada vez mais acometidas por estas, o que atinge diretamente a ecologia e economia do nosso país, e ameaça seriamente o avanço da apicultura brasileira. Esta atividade em nosso país é de suma importância, pois a inserção da abelha africanizada no Brasil foi a responsável pelo resgate social de numerosas famílias que encontraram na atividade uma forma de trabalho e fonte de renda.

A Apicultura é uma das poucas atividades que contempla tópicos importantes da sustentabilidade, como o econômico, por gerar renda para os produtores; o social por criar oportunidade de ocupação da mão de obra familiar no campo, reduzindo o êxodo rural; e o ecológico, por não poluir, contribuindo para a preservação do ecossistema existente, além dos produtos apícolas servirem até mesmo de monitores de contaminação do meio ambiente (PIRES, 2011)

Um diagnóstico rápido e preciso para a infecção viral em abelhas é um componente crítico para a vigilância de doenças e programas de controle, pois a combinação de ácaros e vírus causa a imunossupressão nas abelhas e aumenta a susceptibilidade a outros patógenos oportunistas, levando assim a uma progressiva redução no desempenho das colônias (CHEN *et al.* 2004; LANZI, 2006).

Dentro das atividades que diversos países estão desenvolvendo para atacar de frente estes problemas estão os programas de sanidade apícola.

No Brasil, este teve sua primeira portaria publicada no ano de 2006, mas somente no ano de 2008 é que o Programa Nacional de Sanidade Apícola (PNSAp) foi instituído, no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Este programa visa o fortalecimento da cadeia produtiva apícola, e tem por objetivo e função a vigilância epidemiológica dos apiários brasileiros, com controle, prevenção e erradicação das principais enfermidades infecciosas, orgânicas e parasitoses que acometem as abelhas.

No Rio Grande do Sul ainda não existe um programa de sanidade apícola estabelecido; porém, no dia 5 de julho do ano de 2012 realizou-se a primeira reunião para criação deste programa no estado, na qual o Programa de Pesquisa e Extensão em Biotecnologia Apícola da UNIPAMPA fez-se presente, onde atuará junto ao Programa visando a identificação e erradicação das doenças que acometem as abelhas no estado. Desta forma os dados aqui apresentados são pioneiros para a região e permitirão um melhor entendimento dos problemas que acometem ou podem acometer aos apiários da região e a partir destes estabelecer políticas públicas que tragam benefícios sociais e econômicos para os apicultores e a nossa região de abrangência.

5 Conclusão

Levando em consideração os trabalhos de autores que se concentraram na detecção viral que acometem abelhas *Apis mellifera*, como Teixeira et. al. (2008) em São Paulo, onde houve detecção de ABPV, BQCV, e DWV, Reynaldi et al. na Argentina (2010), relatando presença de ABPV, CBPV e SBV, e Antúnez et al. (2005) no Uruguai com CBPV e ABPV, este trabalho reporta a presença do *Varroa Destructor Vírus* (VDV-1) no Rio Grande do Sul, sendo portanto, a primeira descrição da presença do vírus para a América do Sul, pois anteriormente, este apenas havia sido relatado para Holanda (ONGUS; PETERS et al. 2004), Israel (ZIONI et al. 2011), Reino Unido (BAKER e SCHROEDER, 2008) e Bélgica (GRAAF et al. 2008).

Além disso, o *primer* desenhado para esta pesquisa funcionou com sucesso, e permite detectar VDV-1 de forma específica.

Observou-se também, a presença de abelhas sintomáticas para o vírus Deforming Wing Vírus. Embora a ausência da evidência molecular deste, nos indivíduos sintomáticos coletados a amplificação em amostras com *primer* Multiviral, com iniciadores para DWV, permitirá relatar a sua presença no Rio Grande do Sul, somente após o sequenciamento das amostras.

Houve registros virais em distintas partes das abelhas: cabeças e corpos (tórax e abdômen).

A verificação de ocorrência de vírus em nosso estado, fornece subsídios para pesquisar os possíveis causadores do CCD no Rio Grande do Sul, mais pesquisas relacionadas ao tema serão feitas, iniciando-se assim uma corrida contra o tempo para tentar impedir o avanço desta patologia no estado.

6. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA DE APOIO AO EMPREENDEDOR E PEQUENO EMPRESÁRIO (SEBRAE). 2012. Disponível em <<http://www.apinews.com/pt/noticias-de-apicultura/item/18922-brasil-exportacoes-de-mel-maio-2012>> Acessado em: 13 de Setembro de 2012.

ALAUX, C; FOLSCHWEILLER, M. *et. al.* **Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*)**. Journal of Invertebrate Pathology, v. 106, p.380–385, 2011.

ANTÚNEZ, K.; D´ALESSANDRO, B.; ZUNINO, P. **Virus de la parálisis crónica y virus de la parálisis aguda: detección en uruguay**. In: Algo sobre depoblacion de colmenas. Instituto Nacional de Investigación Agropecuária. p.6-8, Uruguai, 2005.

BAKER, A. C. e SCHROEDER, D. C. **The use of RNA-dependent RNA polymerase for the taxonomic assignment of Picorna-like viruses (order Picornavirales) infecting *Apis mellifera* L. populations**. Virology Journal, v.5, n. 10, p.1-10, 2008.

BRASIL, C. E. A. *et al.* **Apicultura: Uma Comparação Na Produção Entre Apicultores de Porto Velho/RO e Aiuaba/CE**. In: VIII Congresso Latinoamericano de Sociología Rural, Porto de Galinhas, 2010. Disponível em < <http://www.alasru.org/wp-content/uploads/2011/07/GT3-Caroline-Est%C3%A9fanie-do-Amaral-Brasil.pdf>> Acesso em 20 de junho de 2012.

CARVALHO, R. G. ***Apis mellifera*: reprodução, polinização e produção de mel**. Defesa de trabalho de conclusão de curso . SP, 2010. Disponível em < <http://www.unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/revistabiologia/sumario/15/02032011082215.pdf>> Acesso em 3 de junho de 2012, 16:24:15.

CHEN, Y. *et al.* **Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses**. Journal of Invertebrate Pathology, v.87, p. 84–93, 2004.

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

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

De JONG, D. **Desaparecimento das abelhas – Brasil**. In: X Congresso Íberolatino Americano de Apicultura, 2010. Disponível em <http://www.xibla.com.br/PDF/Davis_de_Jong3.pdf> Acesso em: 19 de junho de 2012, 00:25:16.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em 20 de Junho de 2012.

FIEVET, J.; TENTCHEVA, D. *et al.* **Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L.** *Virology Journal*, p. 1- 5. 2006.

FONSECA, V. L. I e SILVA, P. N. **As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro.** *Biota Neotrop*, vol. 10, n. 4, p. 59-62, 2010.

FUJIYUKI, T.; TAKEUCHI, H. *et al.* **Novel Insect Picorna-Like Virus Identified in the Brains of Aggressive Worker Honeybees.** *Journal of Virology*, v. 78 , n.3, p. 1093–1100, 2004.

GENERSCH, E. e CARTER, M. Molecular characterisation of honey bee viruses In: **Virology and the Honey Bee**, p. 85-119. Bruxelas, European Commission. 2008.

GONÇALVES, L. S. **O desaparecimento das abelhas, suas causas, conseqüências e o risco dos neonicotinoides para o agrogégocio apícola.** *Mensagem Doce*. n117. APACAME, p. 2-12. Jul/2012.

GRAAF, D. C.; BRUNAIN, M. *et al.* **First molecular confirmation of deformed wing virus infections of honeybees from a Belgian apiary reveals the presence of black queen cell virus and *Varroa destructor* virus 1.** *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v.78, 2008.

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*. p. 139-146. Ano III, n. 10. 2009.

LANZI, G.; MIRANDA, J. R. *et al.* **Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.)** *Journal of Virology*, v. 80, n. 10, p. 4998–5009, 2006.

Manual de Segurança e Qualidade para Apicultura. Agência de Apoio ao Empreendedor e Pequeno Empresário (SEBRAE). Brasília – DF, 2009.

Manual do Agente de Desenvolvimento Rural. 2ª ed. Agência de Apoio ao Empreendedor e Pequeno Empresário (SEBRAE). Piauí, 2006.

MIRANDA, J. R. e GENERSCH, E. **Deformed wing virus.** *Journal of Invertebrate Pathology*, v.103, p. 48-61, 2010.

MOORE, J.; JIRONKIN, A. *et al.* **Recombinants between Deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies.** *Journal of General Virology*, v. 92, p. 156–161. 2011.

MORETTO, G.; GUERRA, JR. J. C. V *et al.* **Uncapping Activity of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) towards Worker Brood Cells Infested with the Mite *Varroa destructor* Anderson & Treuman (Mesostigmata: Varroidae).** *Neotropical Entomology*, n.3, v.35, p. 299-301. 2006

ONGUS, J. R.; PETERS, D. *et al.* **Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*.** *Journal of General Virology*, v. 85, p.3747–3755, 2004.

ONGUS, J. R.; ROODE, E. C. *et al.* **The 59 non-translated region of Varroa destructor virus 1 (genus Iflavirus): structure prediction and IRES activity in Lymantria dispar cells.** Journal of General Virology, v.87, p.3397–3407, 2006.

PIRES, R. M. C. **Qualidade do Mel de Abelhas *Apis mellifera*, Linnaeus, 1758 Produzido no Piauí.** Dissertação de mestrado. Teresina - PI, 2011. Disponível em <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppgan/arquivos/files/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Final%20MSc_%20Rosana%20Martins%20Carneiro%20Pires.pdf> Acesso em: 28 de junho de 2012, 15:03:30.

RAMOS, J. M.; CARVALHO, N. C. **Estudo Morfológico e Biológico das Fases de Desenvolvimento de *Apis mellifera*.** Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal. Ano VI, n.10. 2007.

REYNALDI, F. J. *et al.* **First report of viral infections that affect argentine honeybees.** Environmental Microbiology Reports, v.6, n.2, p.749–751, Argentina, 2010.

RIBIÈRE, M. *et al.* Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In: **Virology and the Honey Bee**, p. 19-84. Bruxelas, European Commission. 2008.

SANTOS, A. B. **Abelhas nativas: polinizadores em declínio.** Natureza on line, v. 8, n.3, p. 103-106, 2010. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_SantosAB_103106.pdf > Acesso em: 23 de junho de 2013.

SHEN, M.; CUI, L. *et al.* **Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite.** Journal of General Virology, v. 86, p. 2281–2289, 2005.

SILVA, F. S. **Revisão das Doenças que podem acometer *Apis mellifera*.** Defesa de trabalho de conclusão de curso. Porto Alegre - RS. 2010. Disponível em <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/39035>>. Acesso em 20 de Junho de 2012, 00:00:48.

TEIXEIRA, E. W.; CHEN, Y. *et al.* **Virus infections in Brazilian honey bees.** Journal of Invertebrate Pathology v.99, p.117–119, 2008.

WATANABE, M. **Colony Collapse Disorder: Many Suspects, No Smoking Gun.** American Institute of Biological Sciences, v. 58, n. 5, p. 384-388, 2008.

YUE, C e GENERSCH, E. **RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honey bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*).** Journal of General Virology v.86, 2005.

ZIONI, N.; SOROKER, V.; CHEJANOVSKY, N. **Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1–deformed wing virus recombinant (VDV-1–DWV) in the head of the honey bee.** Virology, v. 417, p.106–112 Israel, 2011.