

CAMILA DOS SANTOS HENGEN

**CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS ASSOCIADOS A *Varroa destructor* NO
RIO GRANDE DO SUL**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

São Gabriel

2014

CAMILA DOS SANTOS HENGEN

**CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS ASSOCIADOS A *Varroa destructor* NO
RIO GRANDE DO SUL**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

São Gabriel

2014

CAMILA DOS SANTOS HENGEN

**CARACTERIZAÇÃO DE VÍRUS ASSOCIADOS A *Varroa destructor* NO
RIO GRANDE DO SUL**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Orientador

(Unipampa)

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

(Unipampa)

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

(Unipampa)

SÃO GABRIEL

2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Profs. Juliano Boldo e Andrés Cañedo, pela paciência, dedicação, ensinamentos e por sempre estarem disponíveis e prontos para me ajudar. Foi maravilhoso tê-los encontrado.

A minha co-orientadora e amiga Fernanda Wiesel Garcia que me ajudou muito durante todo meu trabalho e me ensinou muitas coisas.

A minha família e amigos da minha cidade natal, que sempre me apoiaram e entenderam a minha ausência principalmente em datas importantes como aniversários, quando nem sempre eu pude estar presente.

Ás amigades que fiz em São Gabriel durante a faculdade e que levarei para toda a vida, pois compartilhamos momentos únicos de felicidade e aflição.

Ao meu companheiro Paulo Ricardo e sua família que me acolheu e me apoiou muito.

Aos professores pelos ensinamentos aplicados e incentivos.

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

Á Deus que sempre está comigo em meus passos e decisões, nos momentos difíceis a fé me ajudou a levantar.

“As grandes ideias surgem da observação dos pequenos detalhes”.

Augusto Cury

RESUMO

A apicultura é atividade econômica proveniente do manejo de abelhas melíferas que vem crescendo e ocupando espaço no mercado, tanto com a comercialização do mel ou de outros produtos da colmeia, quanto com o aluguel das próprias colmeias, que são utilizadas na polinização de diversos cultivares. Contudo, fatores como as mudanças climáticas e a presença de inseticidas, podem interferir nesta atividade, pois causam a diminuição do número de indivíduos nas colônias. Uma das prováveis razões para este fenômeno é a interferência desses fatores no sistema imunológico das abelhas, tornando-as mais suscetíveis a patógenos e parasitos. Dentre os patógenos, os vírus de RNA podem causar taxas de mortalidade acentuadas de indivíduos, diminuindo a população de abelhas e, conseqüentemente, diminuindo a produção de mel. Porém, sabe-se que a transmissão viral de indivíduo para indivíduo é rara ou não ocorrente, dependendo do tipo viral. Assim, a transmissão ocorre primariamente via vetores, como o ácaro *Varroa destructor*. A presença deste parasito em colmeias livres de vírus não causa danos significativos, mas pode causar altas taxas de mortalidade e abandono da colônia se associado a vírus. Portanto, faz-se necessária a identificação de quais vírus estão associados ao ácaro e que, possivelmente, utilizam-se do ácaro como vetor. Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo identificar quais vírus estão associados a ácaros da espécie *V. destructor* coletados em apiários de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Foram realizadas coletas de 15 espécimes de ácaros por colmeia em apiários localizados nos municípios de São Gabriel, Vila Nova do Sul, Santa Margarida do Sul, Bagé, Hulha Negra, Candiota, Dom Pedrito e Barão do Triunfo. Foram utilizadas um total de 5 caixas por apiário. A partir destas amostras, RNA total foi extraído e cDNA sintetizado. O cDNA sintetizado foi submetido à PCR utilizando *primers* específicos para oito tipos virais (ABPV, BQCV, CBPV, IAPV, KBV, SBPV e SBV, além do DWV, KV e VDV que compõem um *primer* multiespecífico) que afetam abelhas. Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. A presença ou ausência de bandas demonstrou a presença ou ausência de determinado tipo viral, respectivamente. Com este trabalho identificamos a presença dos vírus SBV, DWV e VDV associados ao ácaro *V. destructor* nos apiários de São Gabriel, Bagé e Barão do Triunfo. Os dados obtidos serão úteis na determinação do estado sanitário dos apiários gaúchos e na definição de melhores práticas nos apiários, visando o aumento da quantidade e qualidade dos

produtos apícolas. O trabalho também contribuiu para o conhecimento científico da área, antes inexistente considerando a região analisada.

Palavras-chave: *Varroa destructor*, *Apis mellifera*, RNA, vírus, PCR.

ABSTRACT

Beekeeping is the economic activity derived from the management of honeybees. Such activity has been increasing and taking up space in the market, with trading of both honey and other bee products and the rent of hives, which are used in the pollination of many crops. However, some factors, such as the climate change and the presence of insecticides in the crops, can interfere with this activity because they are responsible for decreasing the number of individuals in the colonies. One of the probable reasons for this phenomenon is the interference of the above stated factors on the immune system of bees, making them more susceptible to pathogens and parasites. Amongst the pathogens, RNA viruses can cause high mortality rates of individuals, reducing the bee population, and consequently reducing the production of honey. However, it is known that viral transmission from individual to individual rarely occurs or does not occur at all, depending on the virus type. Thus, transmission occurs primarily via vectors such as the mite *Varroa destructor*. The presence of this parasite in free-of-viruses hives does not cause significant damage, but can cause high rates of mortality and abandonment of the colony if associated to viruses. Therefore, it is necessary to identify which viruses are associated to the mites and, possibly, use these parasites as vectors. Within this context, this work aims to identify which viruses are associated to *V. destructor* mite specimens collected in apiaries from different regions of Rio Grande do Sul. We collected 15 *V. destructor* mite specimens per hive in apiaries located in São Gabriel, Vila Nova do Sul, Santa Margarida do Sul, Bagé, Hulha Negra, Candiota, Don Pedrito and Barão do Triunfo cities. A total of 5 hives per apiary were used. From these samples, total RNA was extracted and cDNA was synthesized. cDNA samples were subjected to PCR using specific primers for eight viral types (ABPV, BQCV, CBPV, IAPV, KBV, SBPV e SBV, beyond DWV, KV and VDV that make up a multispecific *primer*) that affect bees. After the PCR reaction, samples were subjected to electrophoresis on agarose gel. The presence or absence of PCR product bands denoted the presence or absence of a specific viral type, respectively. In this work, we identified which are the presence of SBV, DWV and VDV- associated virus *V. destructor* mite in the apiaries of São Gabriel, Bagé e Barão do Triunfo. That possibly use the ectoparasite mite as a vector for transmission. The data presented herein will be useful in determining the health status of the apiaries in Rio Grande do Sul and in defining more accurate practices in the apiaries. In addition, this work will

contribute to the scientific knowledge regarding bee virus associated to *V. destructor* mites in the state of Rio Grande do Sul, not existent to date.

Key-words: *Varroa destructor*, *Apis mellifera*, RNA, viruses, PCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Apicultura	11
1.2. O ácaro ectoparasita <i>Varroa destructor</i>	12
1.3. Vírus.....	16
2. JUSTIFICATIVA:.....	18
3. OBJETIVOS:.....	19
3.1. Objetivo Geral:	19
3.2. Objetivos Específicos:	19
4. METODOLOGIA:	20
4.1. Coleta de <i>Varroa destructor</i> :	20
4.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA	21
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):.....	21
4.4. Análise de dados:	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	29
6.1 Conclusões	29
6.2 Perspectivas	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apicultura

A apicultura é a atividade econômica proveniente do manejo de abelhas melíferas que vem crescendo e ocupando espaço no mercado, tanto com a comercialização do mel quanto de outros produtos da colmeia, como cera, própolis, geleia real e rainhas geneticamente selecionadas além do aluguel das próprias colmeias que são utilizadas na polinização de diversos cultivares.

Uma das principais razões para assegurar a manutenção de populações viáveis de abelhas é a sua importância como agentes polinizadores de muitas espécies de plantas cultivadas e silvestres. A polinização por abelhas e outros insetos durante o processo de floração/frutificação resulta no desenvolvimento de alimentos essenciais tais como vegetais, frutos e sementes que compõem cerca de 35% da dieta humana (AUBERT et al., 2008).

Segundo Vieira (1986), o Brasil tem um alto potencial de produção de mel por possuir grande variedade de flora apícola, uma ampla diversidade de cultivares entre legumes, frutos e cereais, somados a um clima propício à atividade biológica destes insetos, permitindo que as abelhas produzam durante todo o ano. Dados de janeiro de 2014 da ABEMEL (Associação Brasileira dos Exportadores de Mel) apontam que o volume de exportações do Brasil em toneladas de mel totalizou 16.180.566 kg no ano de 2013, rendendo ao país US\$ 54.123.900,00, sendo os principais destinos das exportações os Estados Unidos da América, Reino Unido, Alemanha, Canadá e Bélgica; e o Rio Grande do Sul está entre os estados brasileiros que mais se destacam neste ramo, além de São Paulo, Santa Catarina, Ceará e Paraná.

No entanto, alguns fatores como as mudanças climáticas e a presença de inseticidas são capazes de interferir nesta atividade, pois podem causar a diminuição do número de indivíduos nas colônias. Essas condições desfavoráveis geram estresse nos indivíduos, levando a um enfraquecimento no seu sistema imunológico e permitindo condições favoráveis ao desenvolvimento de patógenos e parasitos nas abelhas. Além disso, as abelhas enfrentam agentes de doença em todo o mundo, incluindo vírus, bactérias, fungos, protozoários, parasitos, ácaros e nematoides (TEIXEIRA et al., 2008) que podem causar problemas tanto na

fase de larva como na fase adulta. Como exemplos, podemos citar bactérias, como *Melissococcus pluton* e *Paenibacillus larvae*, que causam as doenças “Cria Pútrida Europeia” e “Cria Pútrida Americana”, respectivamente. Neste caso, a variante Americana gera mais danos na abelha africanizada, já sendo encontrada no Rio Grande do Sul, onde apicultores alimentaram as abelhas com mel e pólen importados que estavam contaminados com a bactéria *P. larvae*, promovendo a contaminação. Ainda, há fungos patógenos também presentes nos apiários, como o fungo *Ascosphaera apis*, que provoca a doença “Cria Giz”, com relatos de alguns casos no Rio Grande do Sul, introduzido nas colmeias da mesma forma que as bactérias citadas anteriormente. Outros exemplos são os microsporídios *Nosema apis* e *Nosema ceranae*, responsáveis pela doença chamada “Nosemose” caracterizada por causar disenteria em abelhas parasitadas, pois coloniza preferencialmente células do intestino (PEREIRA et al., 2002).

Da mesma forma, os vírus e os ácaros também causam grandes danos à apicultura. Dentre os ácaros, *Varroa destructor* se destaca por estar disseminado em todos os continentes (com exceção da Austrália), chegando ao Brasil em 1978 por importações clandestinas de rainhas via Paraguai (CHEN, 2004), e desde então causando prejuízos à apicultura nacional. Este ácaro quando associado a vírus, tende a causar efeitos negativos em apiários, podendo ser esta associação responsável, inclusive, pelo fenômeno chamado “Desordem de Colapso da Colmeia” (CCD, sigla para *Colony Collapse Disorder*) (CASTAGNINO, 2012).

1.2. O ácaro ectoparasita *Varroa destructor*

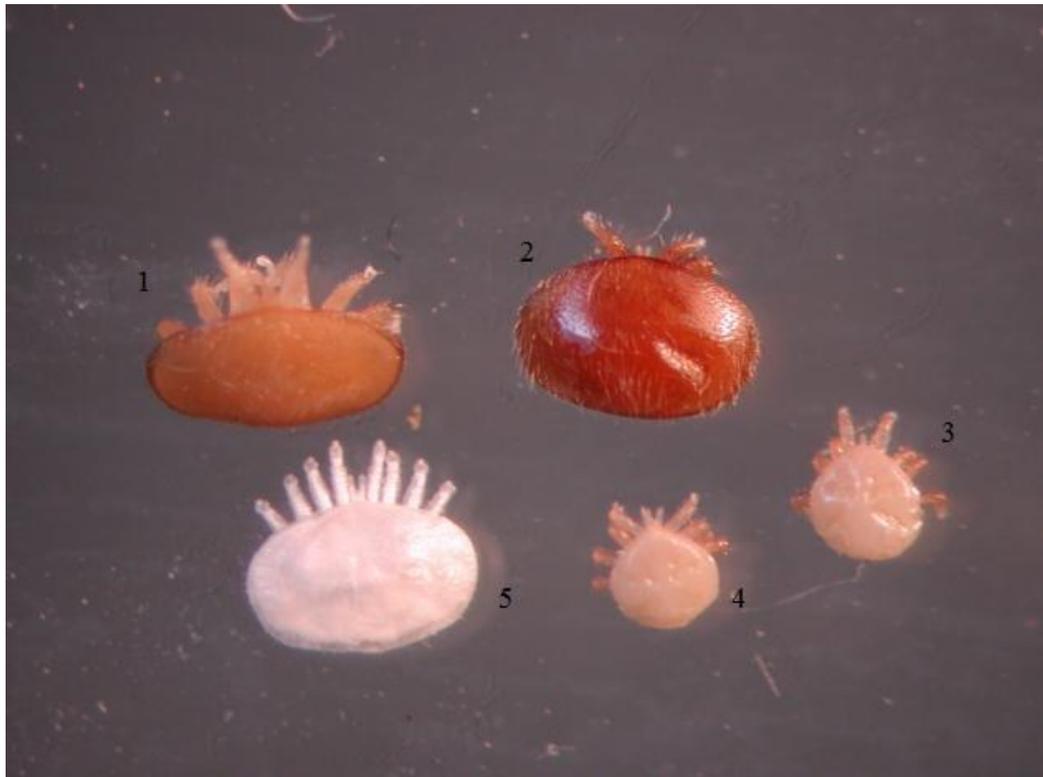
Varroa destructor é um ácaro ectoparasito, tanto de abelhas adultas quanto de crias, e é uma das pragas que mais causam danos à apicultura comercial em grande parte do mundo (ROSENKRANZ, 2010). Há várias razões para este ácaro ter se tornado alvo de inúmeros estudos científicos e programas de controle de pragas. Dentre as razões podemos citar: (i) trata-se de um parasito novo de abelhas da espécie *Apis mellifera*; (ii) como esta associação é nova, ainda não se conhece profundamente a relação parasito-novo hospedeiro, dificultando o controle da praga; (iii) também o fato deste parasito ter se espalhado rapidamente por todo o mundo, exceto na Austrália, torna-se praticamente impossível encontrar colônias de *A. mellifera* livres de *V. destructor*; (iv) a necessidade de realizar tratamentos periódicos aumenta os custos e o risco de contaminação dos produtos apícolas com resíduos químicos. Porém, se o controle em abelhas europeias não for realizado em locais de clima temperado,

muitas colmeias tendem a entrar em colapso dentro de um período de dois a três anos (ROSENKRANZ, 2010).

A dispersão deste ácaro ocorre de diversas maneiras. Dentro de um apiário, operárias e zangões ao retornarem para a colmeia, vindos do campo, podem adentrar outra colmeia que não era de sua origem, causando um novo foco de infestação. Outra forma é o próprio manejo feito pelos apicultores por meio da troca de favos entre colmeias em seus apiários. Podem ocorrer também transmissões inter-apiários por meio de zangões infestados, introdução de rainhas e até mesmo captura de enxames já contaminados. Ainda, as infestações podem ocorrer em longas distâncias quando há apicultura migratória, onde enxames já infectados são transportados para outro local, causando a infestação de colmeias antes livres do ácaro (JUNIOR, 2007). Outra forma grave de infestação é a introdução de rainhas vindas de localidades, ou até mesmo de outros países de forma clandestina e ilegal.

O difícil tratamento e o rápido crescimento da população da praga estão diretamente relacionados à forma de reprodução do ácaro. Os ácaros fêmeas e machos apresentam grande dimorfismo sexual, principalmente em tamanho, coloração e forma do corpo. A fêmea adulta mede cerca de 1,1-1,2 mm de largura e 1,5-1,6 mm de comprimento, podendo ser vista a olho nu e possui quatro pares de patas com ventosas para fixação nas abelhas. Seu período de desenvolvimento é de sete a oito dias. Os machos adultos são de cor amarelada, medem cerca de 0,85 mm de comprimento e 0,80 mm de largura. Eles possuem quelíceras modificadas para a transferência dos espermatozóides, e por não conseguirem se alimentar acabam perecendo após a cópula sem afetar as abelhas adultas (Figura 1) (JUNIOR, 2007).

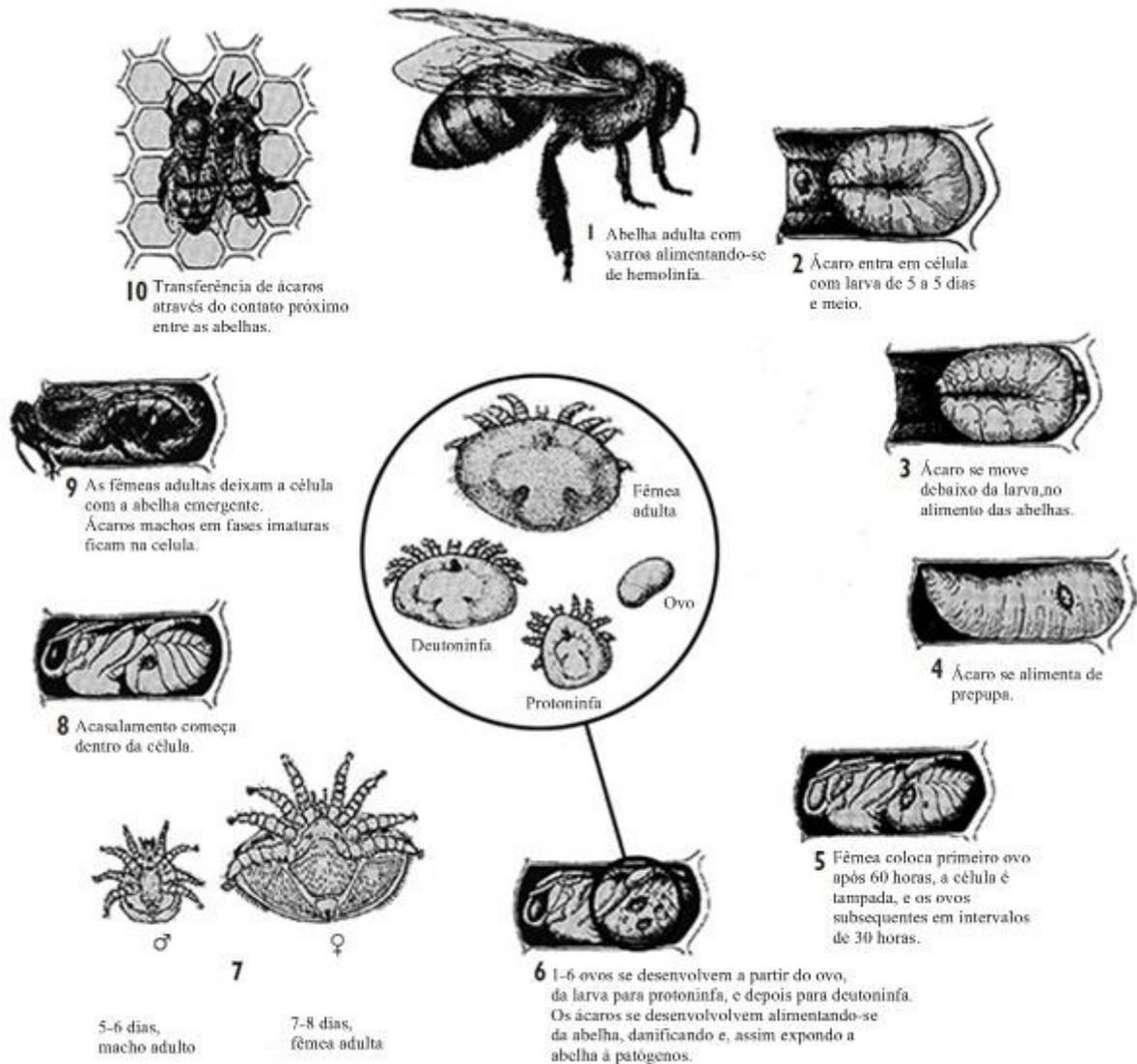
Figura 1- Fêmeas maduras, imaturas e machos maduros de *Varroa destructor*. 1. ácaro filha madura, 2. ácaro mãe, 3 e 4. machos maduros e 5. filha imatura (deutoninfa).



Fonte: Adaptado de Huang (2012)

Segundo Jung et. al. (1982) o ácaro se alimenta da hemolinfa das abelhas e se reproduz em suas crias, que uma vez infestadas apresentam danos em seu desenvolvimento e acabam nascendo com menor peso corporal. Logo, as abelhas adultas têm sua longevidade reduzida. É importante salientar que o ácaro possui uma fase forética (dispersiva), aderido ao dorso de abelhas adultas, e uma fase reprodutiva, que ocorre dentro dos alvéolos operculados de crias (Figura 2). Assim, o sistema respiratório da fêmea é adaptado a condições de alta concentração de gás carbônico (CO₂), importante para a sua sobrevivência quando a célula está operculada, e também a condições de grande aeração, durante o voo das abelhas. De acordo com Ritter (1981) à medida que o ácaro se alimenta, conseqüentemente e não intencionalmente ocorre a transmissão de doenças sendo, portanto, identificado como transmissor de enfermidades virais e bacterianas. Ainda segundo Ritter (1981) *Varroa spp.* ingere pequenas quantidades de hemolinfa frequentemente, prejudicando a abelha não só pela perda sanguínea, mas também pelo fato de a abertura causada pelo ácaro acabar permitindo a entrada de microrganismos em seu sistema circulatório podendo causar infecções.

Figura 2- Ciclo de vida do ácaro *Varroa destructor*.



Fonte: Adaptado de Huang (2012),

Estudos já foram conduzidos com o objetivo de determinar as principais causas de mortalidade de colônias associadas à infestação do ácaro e identificar mudanças significativas na prevalência de vírus em comparação com os dados colhidos ao longo de anos, antes da presença do ácaro (CARRECK et al., 2002).

Sabe-se que vírus de abelhas foram considerados inofensivos por muitos anos até a introdução do ácaro *V. destructor*, que se tornou uma praga global, estando ausente apenas na Austrália. Quando associados a vírus, pode dizimar colônias de abelhas e causar danos extremos à apicultura (AUBERT et al., 2008). Segundo Castagnino (2012) quando esta praga chegou ao Brasil, dispersou-se rapidamente, e hoje já é encontrada em todo o país. Portanto,

faz-se necessária a identificação de quais vírus estão associados ao ácaro e que podem utilizar deste como vetor.

1.3. Vírus

Dentre os patógenos, os vírus de RNA podem causar taxas de mortalidade acentuadas de indivíduos (CHEN, 2004), diminuindo a população de abelhas e, conseqüentemente diminuindo a produção de mel.

Já foi identificado e caracterizado um total de 18 tipos virais que afetam as abelhas. Sequências genômicas completas da maioria deles podem ser encontrados em bancos de dados (COSTA, 2013).

Os vírus possuem duas principais vias de transmissão: a transmissão horizontal e a transmissão vertical. Na transmissão horizontal os vírus são transmitidos entre indivíduos da mesma geração, enquanto que a transmissão vertical ocorre de mães para seus filhos. A transmissão horizontal pode ainda ser de forma direta ou indireta, ou seja, pelo ar, alimentação ou sexualmente se a via for direta, ou com hospedeiro intermediário agindo como vetor se a via for indireta, como no caso do ácaro *V. destructor* (CHEN, 2006).

Porém, sabe-se que nas abelhas a transmissão viral de um indivíduo para o outro é rara ou não ocorrente, dependendo do tipo viral. Assim, a transmissão ocorre primariamente via vetores, como o ácaro *V. destructor* (CARRECK et al., 2002). Trabalhos demonstram que este ácaro pode atuar como vetor de uma série de vírus em abelhas melíferas (ROSENKRANZ, 2010).

Os vírus BQCV, DWV, SBV e *Kashmir Bee Virus* (KBV) infectam naturalmente larvas, pupas e abelhas adultas enquanto ABPV afeta apenas as abelhas adultas. Além disso, diversos vírus podem coexistir em uma colônia de abelhas e coinfectar indivíduos na mesma colônia de abelhas, o que dificulta precisar qual o tipo viral majoritário e sua frequência (CHEN, 2004).

Vírus causam diversos tipos de danos como, por exemplo, o vírus DWV (*Deformed Wing Virus*) que causa a deformação nas asas das abelhas impedindo-as de voar e realizar de forma plena suas atividades biológicas, como a busca por alimento (forrageamento). Outro exemplo de vírus é o vírus KBV, que sabidamente utiliza *V. destructor* como vetor para infectar as abelhas, tem como fase mais suscetível a pupa das abelhas, uma vez que no

momento em que o ácaro perfura a cutícula e os tecidos para sugar a hemolinfa, partículas virais são transferidas para o hospedeiro, podendo levar o hospedeiro a morte (MINISTRY OF AGRICULTURE, 2014). O vírus SBV (*Sac Brood Virus*) conhecido como “Vírus da Cria Ensacada”, causa danos nas pré-pupas podendo leva-las à morte, pois há a deposição de líquido entre a epiderme da larva e da pupa em formação, impedindo que ela continue se desenvolvendo, característica que dá nome à doença (EMBRAPA, 2003). Portanto, fica claro que a presença de vírus associados a *V. destructor* pode levar a danos nas colmeias, impedindo ou diminuindo a produção adequada dos produtos apícolas.

Posto isso, este trabalho objetivou identificar quais os vírus presentes nas populações de *V. destructor* presentes em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul e, que possivelmente utilizam o ectoparasita como vetor. Cabe salientar que este trabalho é pioneiro na área, uma vez que não existem dados acerca do tema exposto na região avaliada.

2. JUSTIFICATIVA:

As abelhas são os agentes polinizadores mais importantes no ecossistema, sendo diretamente responsáveis pela polinização de alimentos essenciais, tais como vegetais, frutos e sementes, que juntos compõem cerca de 35% da dieta humana. Com a identificação dos vírus que se associam ao ácaro *Varroa destructor* será possível determinar em parte o estado sanitário de apiários do estado do Rio Grande do Sul, contribuindo para o desenvolvimento de práticas que evitem a diminuição do número de colmeias de abelhas melíferas e conseqüentemente, a diminuição da produção de produtos apícolas e de material biológico para a polinização de cultivares no estado.

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo Geral:

Identificação dos tipos virais associados ao ácaro *Varroa destructor*, em apiários localizados no estado do Rio Grande do Sul.

3.2. Objetivos Específicos:

- Coletar espécimes de *Varroa destructor* em apiários localizados em 8 localidades do estado do Rio Grande do Sul;
- Extrair RNA total das amostras e sintetizar cDNA;
- Realizar PCR com *primers* específicos para 8 tipos virais;
- Realizar a análise dos dados por eletroforese em gel de agarose.

4. METODOLOGIA:

4.1. Coleta de *Varroa destructor*:

A coleta foi realizada nos seguintes municípios do Rio Grande do Sul: São Gabriel; Vila Nova do Sul; Santa Margarida do Sul; Bagé; Hulha Negra; Candiota; Dom Pedrito; Barão do Triunfo (Figura 3).

Figura 3. Mapa do Rio Grande do Sul com os pontos de coleta demarcados.



Fonte: Do autor & Garcia (2014).

Durante as coletas a campo foram utilizados Equipamentos de Proteção Individual (EPI), que consistem em macacão, luvas e botas, além de um fumegador para produção de fumaça com o intuito de inibir a atividade das abelhas enquanto foi realizada a coleta dos espécimes de *V. destructor* de cada colmeia. Cerca de 100 a 150 abelhas de cada colmeia foram imersas em um recipiente com solução de detergente neutro 10% diluído em água destilada. A solução foi agitada durante 1 min e depois vertida em peneiras adaptadas para proceder-se com a coleta dos ácaros. Após, as abelhas foram contadas e removidas. O líquido

desprezado na primeira etapa foi, ainda, filtrado em tecido de algodão para verificar-se a presença de ácaros restantes. Procedeu-se à contagem dos ácaros e estes foram armazenados em tubos tipo Eppendorf de 0,5 mL contendo 300µL de *RNA later* (Ambion®). Após, os espécimes foram imediatamente levados ao Laboratório de Proteômica Aplicada do Centro Interdisciplinar de Pesquisa em Biotecnologia (LPA– CIP-Biotec) na UNIPAMPA– *Campus* São Gabriel, acondicionados em gelo, onde foram mantidos a -20°C até o momento do uso. Foram coletados 15 espécimes de ácaros por colmeia e foram utilizadas um total de 5 colmeias por apiário.

4.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA

Foram utilizados cerca de 11 ácaros por extração. RNA total das amostras de cada apiário foi extraído com o kit *ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System* com o protocolo *Isolation of RNA from Fibrous Tissue* (Promega). Após, as amostras foram quantificadas em ng.µL⁻¹ utilizando-se o espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare Life Sciences) e o eluído (15µL) armazenado a -80°C. Com base nos resultados da quantificação, as amostras tiveram suas concentrações padronizadas e foram submetidas à reação de síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o kit *Super Script® II Reverse Transcriptase* (RT) (Invitrogen)[™], utilizando MMLV como transcriptase reversa.

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

O cDNA sintetizado foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para oito tipos virais que afetam abelhas, já relatados na literatura (Tabela 1). Cada reação teve um volume final de 25µL contendo 1U de enzima Taq- DNA polimerase.

As condições de ciclagem para a PCR, no caso de *primers* previamente publicados, seguiram as recomendadas na publicação. Para os oligonucleotídeos desenhados para o grupo de pesquisa foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min; 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 50 seg, hibridização a 58°C durante 1 min e

extensão a 72°C por 1 min. Após a ciclagem, a reação foi concluída por uma fase de extensão final durante 6 min a uma temperatura de 72°C estabelecidas por Costa (2013).

Tabela 1. *Primers* utilizados na reação de PCR.

Vírus	<i>Primers</i> (5'→3' sequência) ^a	Número de Acesso do GenBank	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
ABPV	ABPV-F (5'-TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA-3') ABPV-R (5'-GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT-3')	AF150629	900	CHEN et al, 2006
BQCV	BQCV-F (5'-TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC-3') BQCV-R (5'-GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC-3')	JN542437 JN542438 JN542439	494	CHOE et al, 2009
CBPV	CBPV-F (5'-TCAGACACCGAATCTGATTATTG-3') CBPV-R (5'-ACTACTAGAACTCGTCGCTTCG-3')	AB682799	335	BLANCHARD et al, 2007; 2009
DWV	DWV-F (5'-ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA-3') DWV-R (5'-TCGACAATTTTCGGACATCA-3')	NC-004807	702	CHEN et al, 2006
IAPV	IAPV-F (5'-CGATGAACAACGGAAGGTTT-3') IAPV-R (5'-ATCGGCTAAGGGGTTTGT-3')	NC-009025	767	COX-FOSTER, 2007 BLANCHARD, 2008 PALACIOS, 2008
KBV	KBV-F (5'-GATGAACGTCGACCTATTGA-3') KBV-R (5'-CAGTTAAGGGGTGTTGTGC-3')	JN-542433 JN-542434 JN-542435	276	CHOE, 2012
VDV	VDV-F (5'-CGAAACGAAGAGAGCATGTAT-3') VDV-R (5'-CGACTCTTCCCCAGCTAAG-3')	KC-786222	1129	**
SBV	SBV-F (5'-ACCAACCGATTCCCTCAGTAG-3') SBV-R (5'-TCTTCGTCCTCTCTCATCAC-3')	JN-542440 JN-542441 JN-542442	128	CHOE, 2012
SBPV	SBPV-F (5'-AGCGCTTTAGTTCAATTGCC-3') SBPV-R (5'-AGACATCATCATTTTCAGGCTGC-3')	GU-938761	623	**
□-actina	Actin-F (5'-GCCGTGCTTCTCTATACGC-3') Actin-R (5'-ATGACTCCATGCCGATGAAT-3')	AB-242568.1	254	**
DWV / VDV1 / Kakugo (Multi-vírus VP1a)	DWV VP1 a-F (5'-CTCGTCATTTTGTCCCGACT-3') DWV VP1a-R (5'-TGCAAAGATGCTGTCAAACC-3')		424	WILLIAMS et al, 2009

** Desenhados para o grupo de pesquisa de sanidade apícola.

4.4. Análise de dados:

Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%, coradas com GelRed (Biotium) e analisadas sob luz UV. As imagens foram obtidas em fotodocumentador, onde a presença ou ausência de bandas denotou a presença, ausência ou baixo nível de detecção de determinado tipo viral.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Sabe-se que os ácaros da espécie *V. destructor* são hospedeiros intermediários de vírus que afetam as abelhas, podendo ser considerados vetores de pelo menos alguns deles. Neste sentido, foram feitas análises para detectar-se quais vírus estariam associados a ácaros da espécie *V. destructor* em algumas regiões do Rio Grande do Sul. Para tal utilizou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) após síntese de cDNA a partir de RNA total do ácaro. Esta técnica revolucionou o diagnóstico de infecções por vírus e se tornou um método padrão para este tipo de diagnóstico, considerando que métodos sorológicos são problemáticos por terem baixa especificidade, podendo ocorrer classificações errôneas dos vírus presentes (CHEN, 2004).

Porém um único ensaio de PCR com *primers* específicos permite a detecção de apenas um vírus por reação, ou seja, para detectar vários vírus seria necessário fazer um ensaio para cada tipo viral. Então, uma alternativa viável é a utilização de *primers* multiespecíficos ou a técnica de PCR Multiplex, que possibilita a detecção de vários tipos virais na mesma reação oferecendo vantagens como economia de tempo e de dinheiro (CHEN, 2004).

Neste trabalho, utilizamos um *primer* multiespecífico denominado *Multi- virus VP1a*, que tem a capacidade de amplificar três tipos virais: *Deformed Wing Virus* (DWV), *Kakugo Virus* (KV) e *Varroa Destructor Virus-1* (VDV-1) (WILLIAMS et al, 2009). Também utilizamos *primers* específicos para mais 9 tipos virais conforme Tabela 1.

Dentre os oito pontos de coleta, verificamos a presença de vírus associados a *V. destructor* em apenas três: São Gabriel (ponto 1), Bagé (ponto 4) e Barão do Triunfo (ponto 8). Ainda, procedemos com a amplificação do cDNA do gene β -actina de *V. destructor* como controle positivo das reações em cada um dos pontos amostrados, demonstrando a presença de cDNA sintetizado (Figura 4).

Figura 4. Identificação dos 8 tipos virais associados a *V. destructor* nos pontos coletados dentro do estado do Rio Grande do Sul. cDNA foi sintetizado a partir da extração de RNA total de espécimes de *V. destructor* e submetido a PCR com *primers* específicos. C+ - β -actina de *V. destructor*; C- - ausência de DNA molde. *Acute Bee ParalysisVirus* (ABPV), *Black Queen CellVirus* (BQCV), *Chronic Bee ParalysisVirus* (CBPV), *Israeliacute paralysis Virus* (IAPV), *Kashmir Bee Virus* (KBV), *Slow Bee Paralysis Virus* (SBPV), *Sacbrood Virus* (SBV) e *Varroa destructor Virus* (VDV).

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

Fonte: Do autor & Garcia (2014).

Pode-se observar a presença de *amplicons* a partir da reação de PCR utilizando-se *primer* multiespecífico em amostras de São Gabriel. No entanto, pelo fato de três tipos virais serem alvo deste par de *primers*, torna-se necessário uma segunda etapa de análise para confirmar-se o tipo viral com precisão, como o sequenciamento dos *amplicons* obtidos. Além disso, VDV também foi positivo para amostras de São Gabriel, confirmando a amplificação de um dos tipos virais do *primer* multiespecífico.

Segundo Bowen-Walker et al., (1999) o vírus DWV foi isolado pela primeira vez a partir de abelhas adultas doentes em associação com *V. destructor*, onde se observou um grande impacto nas colônias. Ball (1997) também relatou que DWV, em detrimento a outros tipos virais, como ABPV, CWV e SPV, foi mais frequentemente associado com a mortalidade das abelhas desde a disseminação de *V. destructor*. No entanto, Nordström et al. (1999) aponta que nem sempre a presença de DWV estará associada à morte da colônia e estudos já mostraram que DWV associado à *V. destructor* causou o colapso de uma colônia em um

apiário da Suécia, porém em vários outros apiários, também infectados, não houve perdas de colônias. Cabe salientar que nas colmeias onde coletamos amostras de *V. destructor* posteriormente confirmadas contendo DWV, pudemos observar abelhas com sintoma da infecção viral por este vírus (asas deformadas em abelhas adultas).

O vírus SBV, detectado nas amostras de Bagé e Barão do Triunfo, conferem alguns sintomas que são facilmente visíveis ao analisar os favos de crias das colônias. Aubert (2008) descreve que quando as larvas são infectadas, estas não conseguem chegar ao estágio de pupa, pois há produção de um fluído que se acumula entre a pele e o corpo da larva formando um saco, característica que denomina o vírus. A larva ainda sofre mudanças de cor, de branco perolado a amarelo pálido, finalmente tornando-se marrom escuro alguns dias antes de perecer. Após este estágio, a larva seca e fica achatada (BAILEY et al., 1964).

Hitchcock (1966) conduziu um experimento com larvas de abelhas melíferas com todas as idades, contaminando-as através de alimentos com o vírus SBV, o qual demonstrou maior suscetibilidade à infecção viral em larvas com dois dias de idade. No entanto, vários estudos certificam que abelhas adultas também são infectadas, porém os sintomas tornam-se inaparentes (AUBERT, 2008). Bailey (1968) submeteu abelhas adultas jovens a uma alimentação com alta concentração de SBV e demonstrou que esta via de infecção de forma natural também é provável. Além disso, Shen et al. (2005) evidencia que esta transmissão horizontal através de alimentos contaminados, tanto entre abelhas adultas quanto entre abelhas adultas e larvas, atribui-se pela presença de SBV em todos os recursos alimentares possíveis, como os alimentos das crias, o mel, o pólen e a geleia real.

Em 1969, Bailey testou abelhas já com quatro a oito dias de idade, onde não testemunhou qualquer infecção, dando indícios de que a idade também está relacionada à infecção viral.

Porém, Bowen-Walker, Ball, Nordström, Aubert, Bailey, Hitchcock e Shen evidenciaram que quando SBV infecta abelhas adultas os sintomas tornam-se inaparentes e os danos são bem menores quando comparados à infecção do mesmo em abelhas no estágio larval.

Do mesmo modo que demonstramos a presença de SBV associado à *V. destructor*, Ball (1989) demonstrou experimentalmente a capacidade que o ácaro possui de transmitir o vírus SBV, infectando gravemente pupas saudáveis, e, em 1999, Ball afirmou que a mortalidade de pupas está diretamente relacionada à infestação de *V. destructor* associado ao

SBV. Há relatos informais de apicultores que observaram sintomas de SBV em suas colmeias (COSTA, 2013).

O *primer* específico VDV-1 mostrou-se com amplificação positiva nas amostras de São Gabriel. Este dado mostra-se compatível com Costa (2013), onde amostras de cabeças de abelhas com asas deformadas coletadas no mesmo local que os ácaros, foram analisadas com o *primer* VDV-1 e DWV multi, e em ambos o resultado mostrou-se positivo, em conformidade também com 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. A ocorrência de VDV-1 em abelhas africanizadas e no ácaro é um fato inédito considerando a região analisada. Por VDV-1 ser um vírus descoberto á pouco tempo, ainda não são encontrados muitos dados sobre o mesmo.

O *Varroa destructor virus* (VDV) foi descrito recentemente (ONGUS et al., 2004) sendo isolado a partir do ácaro *Varroa destructor*. Segundo Costa (2013) este vírus tem seu genoma muito similar á outros vírus da família Iflaviridae e devido á estas semelhanças foi atribuído as gênero Iflavirus, o que explica o *primer* multiespecífico abranger DWV e KV além do VDV-1.

De acordo com Ongus et al. (2004), VDV-1 e DWV possuem 84% de identidade em suas sequências de ácido nucléico e 95% de identidade de aminoácidos, sendo a principal diferença localizada na região 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.

Os dados de Costa (2013) demonstram que DWV poderia ser detectado tanto em cabeça quanto no corpo das abelhas, mas o VDV1 somente foi detectado na cabeça, isto evidencia que estes vírus apresentam tropismos diferentes e por tal motivo se fundamenta a ideia de que são vírus diferentes.

Em geral, os apiários das regiões do estado do Rio Grande do Sul analisadas demonstraram baixa diversidade de vírus associados à *V. destructor*. De fato, as colmeias destas regiões, mesmo com taxas de 8 a 12 % de infestação de *V. destructor* não possuem indícios de doenças, possuindo altos níveis populacionais, alta produção de mel e adequada

sobrevivência durante os períodos de inverno. Contudo, Cañedo et al. (com. pessoal, 2013) demonstraram por PCR a presença de uma diversidade viral maior quando abelhas adultas, larvas e pupas foram amostradas. É possível que estes vírus não sejam transmitidos por *V. destructor*, mas pelas vias horizontal e vertical independentemente deste vetor. Experimentos futuros neste sentido irão demonstrar quais tipos virais utilizam *V. destructor* como vetor e quais têm infecção não influenciada pela presença do ácaro ectoparasita.

De fato o Rio Grande do Sul é um grande exportador de mel devido à qualidade dos produtos da colmeia aqui encontrados tendo em vista os cuidados para que não haja resíduos químicos no mesmo, justamente por isso estas pesquisas em cima das patologias apícolas que o Grupo de Pesquisa Apícola da UNIPAMPA vem fazendo está sendo de suma importância para que se alcancem soluções e estratégias para melhorar ainda mais este ramo somente com práticas apícolas adequadas, dispensando o uso de produtos químicos para controle de pragas.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

Apesar de *Varroa destructor* não causar danos expressivos em colônias de abelhas melíferas, foi possível constatar que quando associado a vírus os prejuízos podem se agravar, levando em consideração que alguns tipos virais utilizam-se deste ácaro para infectá-las.

Com este trabalho, pudemos confirmar a presença de 2 tipos virais associados ao ácaro parasita *V. destructor* em apiários do Rio Grande do Sul. Estes dados são inéditos considerando a relação entre estes ácaros e abelhas africanizadas, e auxiliam na determinação do estado sanitário dos apiários do estado.

6.2 Perspectivas

- Realizar sequenciamento das amostras amplificadas utilizando o par de primers multiespecífico para confirmar-se a identidade da sequência amplificada;
- Coletar amostras de ácaros de outras regiões do estado e analisar a presença de vírus associados;
- Realizar a identificação de outros tipos virais não avaliados neste trabalho;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL. Disponível em < http://www.beebrazil.com/inteligencia_comercial_abemel_dezembro.pdf> Acesso em 17 de março de 2014 às 15:24 hs. 2014.

AUBERT, M.; Ball, B.; Fries, I.; Mortiz, R.; Milani, N.; Bernardinelli, I.; Virology and the Honey Bee. Editora: European Commission, 2008.

BALL, B.V., ***Varroa jacobsoni* as a virus vector**. In Present status of varroa tosis in Europe and progress in the varroa mite control (R. Cavalloro, Ed.), E.E.C.; Luxemburg, 1989.

BALL B. V., Bailey L., Viruses, in: Morse R.A. and Flottum K.(Ed), **Honey bee pests, predators and diseases**, A.I. Root Company, Medina, pg. 11-32, 1997

BALL, B.V.; Sacbrood, in: Colin, M. E., Ball, B. V., and Kilani, M. (Ed.), **Bee disease diagnosis**, Options Mediteranneós, pg. 91-96, 1999

BAILEY, L.; Gibbs A.J. **Acute infection of bees with paralysis virus, J. Insect Pathol**, pg. 395-407, 1964

BAILEY, L.; **The incidence of virus diseases in the honey bee**. Ann. Appl. Biol. 60, pg. 43–48, 1967

BAILEY, L.; **The multiplication of sacbrood virus in the adult honeybee**, Virol. 36, pg. 312-313, 1968

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

BOWEN-WALKER, P.L., Martin, S.J., Gunn, A., **The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni*** Oud. J. Invertebr. Pathol. 73, pg. 101-106. 1999

CARRECK, N.L.; Ball, B.V.; Wilson, J.K.; **Virus succession in honeybee colonies infested with *Varroa destructor***; Apiacta,1; 2002.

CASTAGNINO, G. L. B. ; Orsi, R. O.; **Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas**. DF,. Disponível em

<<http://www.scielo.br/pdf/pab/v47n6/47n06a02.pdf>> Acesso em 20 de janeiro de 2014 11:43am, 2012.

CHEN Y.; Zhao Y.; Hammond J.; Hsu H.; Evans J.; Feldlaufer M.; **Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses**; Journal of Invertebrate Pathology; 2004

CHEN Y., Evans J., Feldlaufer M.; **Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera***; Journal of Invertebrate Pathology. 2006.

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

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

COSTA, M. F., **Avaliação sanitária de apiários do Pampa para vírus da família Iflaviridae**, Universidade Federal do Pampa, 2013

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA); Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/doencas.htm>> Acesso em 06 de março de 2014 às 15:03 hs. 2003.

HITCHCOCK J.D.; **Transmission of sacbrood disease to individual honey bee larvae**, J. Econ. Entomol. 59, 1154-1156, 1966.

HUANG Z.; **Varroa mite reproductive Biology**; American Bee Journal; Disponível em <http://www.extension.org/pages/65450/varroa-mite-reproductive-biology#.Uxci0D_xr5M> Acesso em 05 de março de 2014 12:01hs; 2012.

JONG D.; **The Varroa problem in Brazil**; American Bee Journal; 1981.

JUNG D.; Jung P.; Gonçalves L.; **Mites pest of honey bee**; Ann. Rev. Entomol. 27: 229-252; 1982.

JUNIOR G.; **Aspectos epidemiológicos da infestação do ácaro *Varroa spp.* em apiculturas da microrregião de Viçosa-MG**; Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária; Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte; 2007.

MANUAL DE SEGURANÇA E QUALIDADE PARA APICULTURA. **Agência de Apoio ao Empreendedor e Pequeno Empresário (SEBRAE)**. Brasília – DF, 2009.

MAXIM L.; Arnold G.; **Pesticides and bee**; Embo Reports, Vol 15, No 1; 2012.

MESSAGE, D.; Ball, B. V.; Allen, M. **Ocorrência de viroses em abelhas no Brasil e na Argentina**. In: ANAIS DOS CONGRESSOS, SEMINÁRIOS E ENCONTROS BRASILEIROS DE APICULTURA; **Proceedings/ CD...** (Coordenador: Aroni Sattler, UFRGS). 11º Congresso Brasileiro de Apicultura. Painei; 1996.

MINISTRY OF AGRICULTURE; Disponível em
<http://www.agf.gov.bc.ca/apiculture/factsheets/230_kashmir.htm> Acesso em 06 de março de 2014 às 15:09 hs; 2014.

NORDSTRÖM S., Fries I., Aarshus A., Hansen H., Korpela S. **Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations**, Apidologie 475-484; 1999.

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.

PALACIOS, G. et al.; **Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States**. Journal of virology, v. 82, n. 13, p. 6209-6217, 2008.

PEREIRA F. de M, Lopes M. T. de R.; **Doenças e inimigos naturais das abelhas**; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa); Disponível em
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/doencas.htm>>; Acesso em 16 de março de 2014 às 19:33 hs; 2002.

RITTER W.; **Varroa disease of the honey bee *Apis mellifera***; Bee World 62: 141-153. 1981.

ROSENKRANZ, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B.; **Biology and control of *Varroa destructor***; Journal of Invertebrate Pathology; pg.: 96-119; doi:10.1016/j.jip.2009.07.016; 2010.

SILVA E.; **Avaliação da produtividade melífera de ecossistemas naturais do litoral sul da Bahia**; COBRAPI; Pg. 109; 2002.

TEIXEIRA, E.W.; Message, D.; Chen, Y.; Pettis, J.; Evans, J. D.; **First metagenomic analysis of microorganisms in honey bees from Brazil.** B.Indústr.anim., N. Odessa,v.65, n.4, p.355-361, out./dez., 2008.

VIEIRA M.; **Apicultura atual**; Editora Nobel S.A. São Paulo; 1986.

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

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.