

AMANDA MARTINS DA CRUZ SOUZA

**VÍRUS QUE AFETAM *Apis mellifera* LINNAEUS 1758 (HYMENOPTERA:APIDAE)
EM APIÁRIOS DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729v
2018 Souza, Amanda Martins da Cruz, 1993-
Vírus que afetam *Apis mellifera* Linnaeus 1758
(Hymenoptera:Apidae) em apiários de Minas Gerais / Amanda
Martins da Cruz Souza. – Viçosa, MG, 2018.
xi, 47 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-45.

1. Abelhas africanizadas - Doenças. 2. Vírus.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

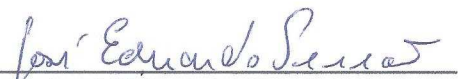
CDD 22. ed. 638.1

AMANDA MARTINS DA CRUZ SOUZA

**VÍRUS QUE AFETAM *Apis mellifera* LINNAEUS 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE)
EM APIÁRIOS DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2018.



José Eduardo Serrão



Tiago Antônio de Oliveira Mendes



Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação à minha mãe que não mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Que sonhou esse sonho comigo, e dedicou parte de sua vida para que fosse realizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe pelo incentivo e por toda dedicação ao longo da minha trajetória. Pelo apoio incondicional e por colocar minha vida frente à dela para que esse sonho se tornasse realidade.

Aos meus irmãos Lucas e Yan pelo cuidado, pela presença constante e pelo carinho.

Às minhas avós Orozina e Expedita por se fazerem presente na minha criação e terem grande participação nas minhas vitórias.

Ao meu noivo Bruno por estar sempre ao meu lado, por sonhar meus sonhos e também não medir esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

À Professora Márcia por ter me acolhido no LIMA, pela paciência, ensinamentos e por sempre estar disposta a ajudar.

À Professora Juliana Fietto pela disponibilidade em me orientar e pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Professor Weyder Santana por ter sido tão solícito e paciente durante todo o período de execução do projeto, por não ter medido esforços para que este trabalho fosse possível.

Ao Professor Tiago Mendes pela prontidão em ajudar e por todos seus ensinamentos.

À Thiago Onofre por ter me ensinado as práticas laboratoriais e mais importante que isso, a ser uma pessoa melhor, pois pude ter como mestre uma das melhores pessoas que já conheci.

Aos meus amigos do LIMA: Jackson, Leilane, Joice, Fernanda, Victor, Walmir, Tatiana, Isadora, Duda, Nancy e Jerusa pelo incentivo e auxílio durante os experimentos e por tornar a rotina de laboratório um pouco mais amena.

Aos estagiários Lucas e Felipe pela ajuda que foi de grande valia, por doarem parte do seu tempo para que este trabalho fosse possível.

Ao Ítalo do Laboratório de Imunovirologia pelos ensinamentos e ajuda nos experimentos.

Ao senhor Waldir que durante todo esse tempo cuidou do preparo dos materiais que utilizei neste trabalho e pela preocupação constante se estava tudo certo com eles.

Ao meu tio Gecelmino Correa, funcionário do Apiário Central da UFV pela ajuda e pela motivação.

À secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Elizabeth Alves Pena (Beth), por ser uma pessoa doce, paciente e que sempre me ajudou quando precisei.

À Giuliana e Matheus Gandra pelo apoio durante a fase inicial do trabalho, que foi fundamental para meu desenvolvimento.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABELAS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | ix |
| RESUMO | x |
| ABSTRACT | xi |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO E FUNDAMENTAÇÃO | 4 |
| 2.1 Abelha africanizada no Brasil | 4 |
| 2.2 Apicultura no Brasil | 5 |
| 2.3 CCD (Colony Collapse Disorder) ou SÍNDROME DO COLAPSO DE DESORDEM DA COLÔNIA..... | 5 |
| 2.4 Ácaro <i>Varroa Destructor</i> | 7 |
| 2.5 Vírus em <i>Apis mellifera</i> | 9 |
| 2.5.1 ABPV (Vírus da Paralisia Aguda), Vírus Caxemira (KBV) e Vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV) | 11 |
| 2.5.2 DWV (Vírus Deformador da Asa) | 12 |
| 2.5.3 CBPV (Vírus da Paralisia Crônica)..... | 13 |
| 2.5.4 BQCV (Vírus da Realeira Negra) | 14 |
| 2.5.5 SBPV (<i>Slow Bee Paralysis Virus</i>)..... | 15 |
| 2.5.6 SBV (Vírus da Cria Ensacada) | 15 |
| 2.5.7 VDV1 (Vírus <i>V. destructor</i> -1)..... | 16 |
| 3 OBJETIVOS | 17 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 17 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 17 |
| 4. METODOLOGIA..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 4.1 Coleta de amostras de <i>Apis mellifera</i> africanizada | 18 |
| 4.2 Extração de RNA total de <i>A. mellifera</i> | 20 |
| 4.3 Identificação de vírus presentes em <i>A. mellifera</i> por RT-PCR..... | 20 |
| 4.4 Clonagem dos produtos de PCR e extração de DNA plasmidial | 23 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 24 |
| 5.1 Extração de RNA total de <i>A. mellifera</i> | 24 |
| 5.2 Identificação de vírus presentes em <i>A. mellifera</i> por RT-PCR..... | 24 |
| 5.3 Clonagem dos produtos de PCR e extração de DNA plasmidial | 29 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 31 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 32 |
| REFERÊNCIAS..... | 33 |
| APÊNDICES..... | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Ciclo de vida do ácaro <i>Varroa destructor</i> | 8 |
| Figura 2 - Distribuição mundial de ABPV, KBV e IAPV por país..... | 12 |
| Figura 3 - Exemplo de uma abelha adulta apresentando asas deformadas | 13 |
| Figura 4 - Célula da rainha infectada com o BQCV | 14 |
| Figura 5 - Sintomas típicos da Cria Ensacada em larvas de operárias..... | 16 |
| Figura 6 - Cidades do Estado de Minas Gerais onde foram coletadas as abelhas. . | 18 |
| Figura 7 - Mesoregiões do estado de Minas Gerais onde foram feitas as coletas de abelhas..... | 19 |
| Figura 8 - Etapas prévias para a extração de RNA de abelhas antes de ser adicionado o reagente Trizol | 20 |
| Figura 9 – Gel de Agarose a 1% dos produtos de PCR de amostra de <i>Apis mellifera</i> , corado com Gel Red™..... | 25 |
| Figura 10 - Análise da presença dos vírus ABPV, BQCV, CBPV, Multi- Virus VP1a, IAPV, KBV, SBPV, SBV e VDV-1 em 13 cidades do estado de Minas Gerais. | 26 |
| Figura 11 - Análise da presença dos vírus ABPV, BQCV e CBPV em sete cidades mineiras..... | 27 |
| Figura 12 - Comparação entre abelhas encontradas em diferentes cidades mineiras..... | 28 |
| Figura 13 - Distribuição de frequência de Vírus de Abelhas nas treze cidades mineiras..... | 29 |
| Figura 14 - Análise dos produtos de PCR após clonagem e purificação do DNA plasmidial. | 30 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Propriedades físicas dos vírus de <i>Apis mellifera</i> conhecidos. Modificado de De Miranda et al. (2013)..... | 10 |
| Tabela 2 - Datas das coletas em cada cidade do estado de Minas Gerais..... | 19 |
| Tabela 3 - Primers utilizados na reação de PCR. Modificado de GARCIA et al. (2014)..... | 22 |
| Tabela 4 – Análise da quantidade de RNA total extraído de <i>A. mellifera</i> . A quantidade é por cada pool de 6 abdômens de abelhas. | 24 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEMEL – Associação Brasileira dos Exportadores de Mel
ABPV – Vírus da Paralisia Aguda
ABV - Arkansas Bee virus
AIV – Virus Apis Irisdescent
ALPV – Aphid lethal paralysis virus
AmFV – Vírus Filamentoso *Apis mellifera*
A mellifera – *Apis mellifera*
Apis mellifera L. – *Apis mellifera* LINNAEUS
BBPV – Berkeley bee picorna-like virus
BQCV – Vírus da Realeira Negra
BSRV – Big Sioux River virus
BVX – Vírus X de Abelha
BKY – Vírus Y de Abelha
CBPSV – Chronic bee paralysis satellite virus
CBPV – Vírus da Paralisia Crônica
CCD – Colony Collapse Disorder
CWV – Cloudy wing virus
DWV – Vírus da Asa Deformada
EBV – Vírus Egípcio
Femap – Federação Mineira de Apicultura
IAPV – Vírus Israelense da Paralisia Aguda
KBV – Vírus Caxemira
LSV-1 – Lake Sinai virus-1
LSV-2 – Lake Sinai virus-2
MMLV – Moloney Murine Leukemia Virus
SBPV – Slow bee paralysis virus
SBV – Vírus da Cria Ensacada
TSBV – Vírus da Cria Ensacada Tailandês / Chinês
V. destructor – *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000
VDV-1 –Virus Varroa destructor -1.

RESUMO

SOUZA, Amanda Martins da Cruz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Vírus que afetam *Apis mellifera* Linnaeus 1758 (Hymenoptera:Apidae) em apiários de Minas Gerais.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Gustavo Costa Bressan, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Raphael de Souza Vasconcellos e Weyder Cristiano Santana.

Na abelha *Apis mellifera* são identificados 24 vírus, que persistem de forma natural nas colônias, em baixos títulos e sem sintomas aparentes. Porém, esta infecção silenciosa, associada a outros tipos de perturbações individuais, pode ser prejudicial e levar à morte de toda a colônia, como relatada no CCD. Vários vírus de abelhas foram descritos em *A. mellifera*, mas somente alguns são considerados como capazes de causar doenças, assim sendo, estes vírus estudados com mais frequência: Vírus da Paralisia Crônica (CBPV), Vírus da Paralisia Aguda (ABPV), Vírus Deformador da Asa (DWV), Vírus da Realeira Negra (BQCV), Vírus da Cria Ensacada (SBV), Vírus Caxemira (KBV), SBPV (Slow Bee Paralysis Virus), VDV1 (Vírus V. destructor -1) e, mais recentemente, o Vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV). Baseando-se na importância da apicultura no Brasil, além do valor ecológico das abelhas como polinizadoras, o presente trabalho buscou verificar a ocorrência de vírus que afetam *A. mellifera* no estado de Minas Gerais, em treze cidades de sete Mesorregiões. As amostras foram coletadas em colônias distintas, em apiários cujo número variou entre 1 e 3 por mesorregião. O RNA total presente em seis abdômens (*pool*) de operárias por apiário foi extraído e feita a síntese de DNA complementar. O cDNA obtido foi utilizado para a amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR) com primers já previamente publicados. Posteriormente, cada fragmento gerado foi purificado e inserido no vetor pGEM-T Easy para sequenciamento. Neste trabalho pode-se detectar a presença de três tipos virais: ABPV, BQCV e CBPV. Dois na cidade de Passa Quatro no Sul (ABPV e BQCV) e um (CBPV) nas cidades de Viçosa, Caratinga, Divinópolis e Diamantina. Para os vírus DWV, IAPV, KBV, SBV, SBPV e VDV1 não foram obtidos amplicons. A presença do CBPV se dá em maior frequência (30,76%), sendo registrada em quatro cidades mineiras; ABPV e BQCV a 7,69% em uma localidade; das cidades analisadas 61,55% não apresentaram amplicons para os vírus analisados.

ABSTRACT

SOUZA, Amanda Martins da Cruz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Virus that affecting *Apis mellifera* Linnaeus 1758 (Hymenoptera:Apidae) in apiaries of Minas Gerais.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Gustavo Costa Bressan, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo, Raphael de Souza Vasconcellos and Weyder Cristiano Santana.

Honey bee *Apis mellifera* can be identified by 24 viruses, which persist naturally in the colonies, low titers and no apparent symptoms. However, this infection, associated with other types of individual disorders, can be harmful and lead to the death of the entire colony, as reported in CCD. Several bee viruses have been described in *A. mellifera*, but only some are considered to be capable of causing diseases, so these, viruses are most frequently studied: Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Deformed Wing Virus (DWV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Sacbrood Virus (SBV), Kashmir Virus (KBV), SBPV (Slow Bee Paralysis Virus), VDV1 (Virus V. destructor -1) and more recently, the Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV). Based on the importance of beekeeping in Brazil, in addition to the ecological value of bees as pollinators, the present work sought to verify the occurrence of viruses that affect *A. mellifera* in the state of Minas Gerais, in thirteen cities of seven Meso-regions. The samples were collected in distinct colonies, in apiaries whose number varied between 1 and 3 per mesoregion. The total RNA present in six abdomens (pool) of workers per apiary was extracted and the synthesis of complementary DNA was made. The obtained cDNA was used for amplification by polymerization chain reaction (PCR) with previously published primers. Subsequently, each generated fragment was purified and inserted into the pGEM-T Easy vector for sequencing. In this work we can detect the presence of three viral types: ABPV, BQCV and CBPV. Two in the city of Passa Quatro in the South (ABPV and BQCV) and one (CBPV) in the cities of Viçosa, Caratinga, Divinópolis and Diamantina. For the viruses DWV, IAPV, KBV, SBV, SBPV and VDV1 no amplicons were obtained. The presence of CBPV occurs more frequently (30.76%), being registered in four cities in Minas Gerais; ABPV and BQCV at 7.69% in one locality; of the analyzed cities 61.55% did not present amplicons for the virus analyzed.

1 INTRODUÇÃO

A abelha é um inseto pertencente à ordem Hymenoptera, com cerca de 20 mil espécies diferentes conhecidas, sendo este o maior grupo de insetos polinizadores (MICHENER, 2000). *Apis mellifera Linnaeus 1758* (Apidae) é uma espécie que foi levada para outras regiões do planeta, onde não ocorria de forma espontânea, a fim de produzir mel, geléia real, cera, própolis, pólen e polinização na agricultura (CICCO, 2016).

Com origem na Europa, Ásia e África, essa espécie pode ser encontrada em diferentes Biomas (incluindo savanas, regiões litorâneas e montanhosas). Com clima e vegetação flexíveis, o habitat original da espécie colaborou para o desenvolvimento de diversas subespécies ou raças de abelha *A. mellifera*, com características distintas e adaptadas à diferentes condições ambientais (RUTTNER, 1987).

Distribuída em todo território brasileiro *A. mellifera* está presente em todos os Biomas e tipos de ambientes (urbanos, agrícolas e naturais, preservados ou degradados) (OLIVEIRA; CUNHA, 2005). Contudo, esta população se originou de um cruzamento entre abelhas de subespécies europeias trazidas pelos imigrantes como *Apis mellifera mellifera* (abelha alemã), *Apis mellifera ligustica* (abelha italiana), *Apis mellifera carnica* (abelha carniola) com uma subespécie trazida da África em 1956, *Apis mellifera scutellata* (abelha africana), sendo conhecida atualmente como abelha africanizada ou *A. mellifera* africanizada (SHEPPARD et al, 1991).

No Brasil, os pequenos agricultores lideram a produção de mel, com a região Sul sendo a maior produtora com 49%, Paraná com 16,2% e Santa Catarina com 12,9%, com destaque também para Minas Gerais e São Paulo, totalizando 350 mil produtores, cuja maioria de agricultores familiares (90%). De acordo com a Associação Brasileira dos Exportadores de MEL– ABEMEL, em 2016, em relação ao volume mundial de mel exportado, o Brasil subiu 3 posições no ranking de maiores exportadores ocupando o 7º lugar no ranking de exportações. Em volume foram aproximadamente 33.931 toneladas (ABEMEL,2016).

Ocupando a quinta colocação na produção de mel no país, Minas Gerais, segundo dados da Federação Mineira de Apicultura (FEMAP), possui a Mesoregião Jequitinhonha/Mucuri com 22,7% do total da produção, Central (15,2%), Sul de Minas (14,5%), Rio Doce (12,8%), Zona da Mata (11,3%), Norte de Minas (9,3%), Centro Oeste (6,4%), Triângulo (4,2%), Alto Paranaíba (2,3%) e Noroeste (1,2%). Com cerca de quatro mil toneladas de mel produzidas por ano, com geração de 13 mil empregos geralmente associados à economia de pequenas famílias. São 4,5 mil apicultores, organizados em várias associações e cooperativas que asseguram condições ideais para a garantia de produtos de qualidade. (FEMAP, 2016).

Os principais problemas na criação de abelhas são a aplicação de forma descontrolada de pesticidas (doses letais e sub-letais), alterações climáticas, desmatamentos, desastres ambientais (secas), queimadas, déficit nutricional e doenças causadas por diversos tipos de patógenos, como ácaros, em especial o *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000), nematoides, insetos, protozoários, bactérias, fungos e vírus. (SUMPTER, 2004, FRAZIER, 2011).

Varroa destructor é um ácaro que apesar de não causar muitos danos às colônias de abelhas africanizadas no Brasil (DE JONG, 1982), em associação com determinados vírus pode causar comprometimento da sanidade das colmeias, de forma que quando se alimenta, causa perfuração na cutícula da abelha, transgredindo a barreira de proteção do inseto e permitindo que diversos patógenos entrem, incluindo vírus. Se uma abelha está infectada por um vírus e o ácaro suga a sua hemolinfa, se contamina e transmite-o a outro inseto, tornando-se um vetor viral. Numa colônia infestada pelo ácaro há o aparecimento de abelhas com má-formação nas asas, pernas, abdômen e tórax (GARCIA, 2014).

Várias espécies de vírus podem parasitar abelhas africanizadas, embora elas possuam maior resistência a doenças. Esses vírus persistem de forma natural nas colônias, em baixos títulos e sem sintomas aparentes. Porém, esta infecção silenciosa, associada a outros tipos de perturbações individuais, pode ser prejudicial e levar à morte de toda a colônia (AUBERT et al., 2008; DE MIRANDA et al., 2013). Por serem insetos polinizadores, impactos causados ao meio ambiente que acarretariam diminuição drástica ou perda das abelhas levaria a uma série de mudanças em nichos ecológicos, como em animais que dependem das cadeias alimentares relacionadas (ECODEBATE, 2014).

Baseando-se na importância da apicultura no Brasil, além do valor ecológico das abelhas como polinizadoras, o presente trabalho buscou um levantamento de vírus que afetam *A. mellifera* no estado de Minas Gerais, uma vez que problemas sanitários da apicultura mundial vêm se agravando, tornando necessária a adoção de medidas de maior proteção à saúde das abelhas.

2. REVISÃO E FUNDAMENTAÇÃO

2.1 Abelha africanizada no Brasil

No Brasil, a introdução da abelha africanizada ocorreu após o ano de 1956, quando devido à baixa produtividade das abelhas européias, algumas rainhas de abelhas da África do Sul foram introduzidas pelo geneticista Prof. Dr. Warwick Estevan Kerr, com o objetivo de aumentar a produtividade de mel no país em um programa de melhoramento (Kerr, 1957). Após um incidente, estas colônias enxamearam e iniciaram um rápido processo de hibridização (Kerr, 1967), com as abelhas de origem européia (*A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica* e *A. mellifera carnica*) que já haviam sido introduzidas anteriormente no país (Nogueira-Neto, 1972 e Gonçalves, 1994). A partir destes cruzamentos, originaram-se as abelhas polihíbridas, as quais apresentavam características predominantes da subespécie africana (*Apis mellifera scutellata*), sendo denominadas abelhas africanizadas (Gonçalves, 1974).

Com grande capacidade de defesa, de adaptação a ambientes tropicais/subtropicais, alta capacidade de crescimento populacional, reprodução e enxameação, aliado ao ciclo de desenvolvimento mais curto que as demais subespécies existentes no Brasil, estas características das abelhas africanizadas muito se assemelham à abelhas africanas nativas (Oliveira & Cunha, 2005). Tais características permitiram a rápida ocupação dos ambientes Neotropicais (Gonçalves, 1994). Todos esses fatores contribuíram para ocupação de quase todo continente americano, pelas abelhas africanas, do sul da Argentina até o sudeste de Nevada, Estados Unidos, percorrendo cerca de 110 Km/ano (Gonçalves, 2001).

Apesar da alta produtividade, essa abelha africanizada causou um impacto negativo muito grande ao disseminar. Devido à agressividade que apresentavam e as deficiências técnicas dos apicultores e da população em geral para trabalhar e conviver com elas, levou no início ao abandono da atividade apícola. Entretanto, houve adequação e reformulação das técnicas para o manejo da abelha

africanizada, fazendo com que o Brasil passasse da 27ª colocação para a 7ª em relação à produção mundial de mel (SOARES, 2012).

2.2 Apicultura no Brasil

A atividade apícola iniciou-se no país em 1839, quando algumas colônias de abelhas da espécie *A. mellifera* da região do Porto, em Portugal, foram trazidas pelo padre Antônio Carneiro para o Rio de Janeiro. Subsequentemente houve introdução de outras raças da mesma espécie nas regiões Sul e Sudeste, por imigrantes europeus (Alemães e Italianos). Com a introdução da abelha africana (*Apis mellifera scutellata*) em 1956, houve mudanças na apicultura do Brasil, de maneira acidental: após a fuga dessas abelhas do apiário em que eram realizados os experimentos, elas se acasalaram com abelhas europeias formando um híbrido natural chamado de abelha africanizada. Por serem agressivas, geraram problemas no manejo de apiários, causando abandono da atividade apícola. Técnicas adequadas surgiram após os anos 70, acarretando o retorno do crescimento da apicultura e sua expansão para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (NOGUEIRA-NETO, 1970; SOARES, 2012). Deste modo pode se resumir a história da apicultura em três etapas:

A chegada das abelhas *A. mellifera* de origem europeia que correspondeu ao período de implantação da apicultura no país – entre 1839 a 1955.

A africanização dos apiários e das colônias na natureza – após a chegada dos primeiros enxames africanos, cuja importação iniciou-se em 1956 de forma intensa e depois reduziu-se ao longo dos anos.

E por fim foi quando a apicultura brasileira se recuperou e expandiu-se, em 1970, no ano do Primeiro Congresso Brasileiro de Apicultura (SEBRAE, 2015).

2.3 CCD (Colony Collapse Disorder) ou SÍNDROME DO COLAPSO DE DESORDEM DA COLÔNIA

Conforme vanENGELSDORP et al. (2007, 2008, 2010, 2011), entre os anos de 2006 e 2010, estudos consecutivos realizados em colmeias manejadas de *A.*

mellifera, registraram perda de cerca de 30% de colônias nos Estados Unidos e em determinados países da Europa (Laurent et al., 2015). No inverno de 2006–2007 foram feitos os primeiros registros, nos quais colônias apresentavam características bem definidas de colapso, embora não se conhecesse a causa (Pires et al., 2016).

Através de um conjunto de sintomas e pelo reconhecimento do fenômeno só após o acontecimento, ele passou a ser tratado como uma síndrome e recebeu a denominação de CCD (Distúrbio do Colapso das Colônias). Os sintomas são: perda acelerada de abelhas operárias, com enfraquecimento ou morte da colônia que possui número maior de crias do que de abelhas adultas; o exterior e interior da colmeia sem crias e abelhas adultas mortas; pragas, como por exemplo, traças deixam de invadir a colmeia de forma imediata. Em associação à CCD está o estresse causado por agentes patogênicos, manejo de forma incorreta das colônias, uso indiscriminado de agrotóxicos, má nutrição e todos estes fatores combinados (vanENGELSDORP et al., 2009).

Em 2007, a Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo (Apta, SAA- SP), em colaboração com a Universidade Federal de Viçosa enviou as primeiras amostras de abelhas *A. mellifera* africanizadas, vindas Sudeste brasileiro, colônias com sintomas de enfraquecimento e produção apresentando queda , ao Bee Research Laboratory, USDA, Beltsville, EUA, , para que patógenos fossem identificados com a utilização das mesmas técnicas moleculares utilizadas nas amostras diagnosticadas com CCD nos EUA. Os dados dos patógenos e características observadas nessas colônias, naquele período não relacionaram mortalidades registradas nos apiários brasileiros à CCD (Pires et al., 2016).

A possibilidade de que patógenos e parasitas estejam envolvidos nas causas do CCD foram focos de pesquisas desenvolvidas no Brasil (Teixeira et al., 2008a, 2008b, 2012, 2013; Santos et al., 2014; Schwarz et al., 2014); além do aumento da vulnerabilidade das abelhas, devido à redução de mecanismos de defesa em casos de coinfeção (Cox- Foster et al., 2007; vanEngelsdorp et al., 2009).

Contudo, o escasso conhecimento sobre onde estão localizados os apiários, impede um levantamento sobre os patógenos de abelhas existentes no país. No Brasil, não se monitora os produtores, dificultando o acesso à informações disponíveis como por exemplo: localização de colônias, como o manejo é feito nos

apiários; o quanto a flora e culturas nos países são diversas, o uso de agrotóxicos adotado nas práticas agrícolas (Pires et al., 2016)

2.4 Ácaro *Varroa destructor*

O ácaro *Varroa destructor* (Varroidae) é um ectoparasita que se fixa no tórax e abdômen de zangões e operárias de abelhas *Apis mellifera* L., para nutrir-se da hemolinfa (DE JONG et al., 1982; DI PRISCO et al., 2011), o que gera danos à sanidade das abelhas, por comprometer a quantidade de proteínas corporais absorvidas e armazenadas, comprometendo a ação do sistema imune e longevidade, bem como no crescimento e desenvolvimento normal das crias, gerando má formação em indivíduos adultos com redução de peso e tamanho (AMDAM et al., 2004; GAREDEW et al., 2004; ROSENKRANZ et al., 2010; CAPPELARI, 2011). Ele pode ser um transmissor de vírus de forma vertical e horizontal (SUMPTER; MARTIN, 2004; CHEN et al., 2006; KEVAN, et al., 2006; MATTOS, 2011).

Sua introdução no Brasil ocorreu na década de 70 (DE JONG et al., 1982). A existência de diferentes haplótipos do ácaro, evidenciada por estudos moleculares, está relacionada à virulência: Em lugares onde os níveis de infestação é alta o haplótipo K (Coreano) é encontrado, por exemplo na Europa. Em lugares onde a taxa de infestação é menor, como no Brasil, há o predomínio do haplótipo J (Japonês) (ANDERSON e TRUEMAN, 2000; PINTO, 2012).

De quatro fases se constitui o período de desenvolvimento do *V. destructor*, dentro da célula de cria: ovo, protoninfa, deutoninfa e adulto (VIDAL, 2013). A entrada de um ácaro fêmea antecede a operculação, e por volta de três dias após, o primeiro ovo gera um macho e consecutivamente até quatro ovos de fêmeas são colocados. Conforme o período, até dois ácaros filhos desenvolvidos deixarão a célula de cria, com o ácaro fêmea que os gerou e a abelha recém-eclodida (ROZENKRANZ 2010).

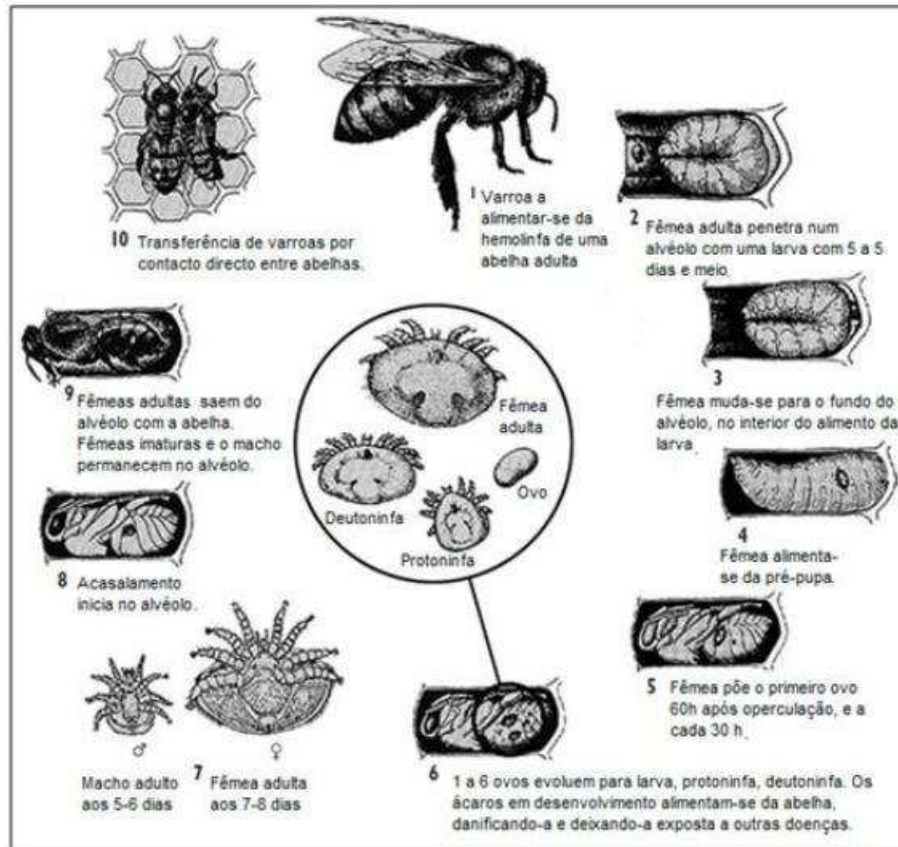


Figura 1 - Ciclo de vida do ácaro *Varroa destructor*. Fonte: PASCOAL(2012).

A ação de *V. destructor* pode ocorrer de forma direta ou indireta. Danos como redução protéica da hemolinfa, diminuição do tempo de vida das abelhas (50%), larvas deformadas; surgimento de abelhas defeituosas com encurtamento do abdômen, redução no tamanho, falta de asas ou deformação delas, que geram abelhas que não serão aptas para realizar as atividades da colmeia, sendo eliminadas, são chamados de danos diretos (TAPIA, 2010). Já a queda da resistência a produtos químicos aplicados na agricultura, acarretada pela diminuição protéica na hemolinfa, a entrada de agentes patogênicos pela perfuração causada pelo ácaro ao sugar a hemolinfa, gerando uma via de entrada para vírus, bactérias e fungos são chamados danos indiretos (TAPIA, 2010).

2.5 Vírus em *Apis mellifera*

Vinte e quatro tipos de vírus foram identificados em *A. mellifera* (BAILEY e BALL, 1991; RIBIÈRE et al, 2008) (Tabela 1). Estudos realizados a partir do sequenciamento massivo de RNA e DNA de extratos integrais de abelhas (FUJIYUKI et al, 2004; COX-FOSTER et al, 2007; CORNMAN et al., 2010; RUNCKEL et al., 2011), evidenciaram que existe semelhança entre os vírus já descritos e vírus descritos recentemente. Por estarem correlacionados vários vírus são considerados como membros de um único complexo de mesma espécie (DWV / VDV-1 / EBV; ABPv / KBV / IAPV; SBV / TSBV; BVX / BVY e LSV-1 / LSV-2), sendo 16-18 vírus verdadeiramente únicos (DE MIRANDA et al.,2013).

Várias espécies de vírus podem parasitar abelhas africanizadas, embora elas possuam maior resistência a doenças. Esses vírus persistem de forma natural nas colônias, em baixos títulos e sem sintomas aparentes. A principal maneira de detectar as doenças nos apiários é através dos sintomas, mas eles não são aparentes, principalmente em títulos virais baixos, o que pode diminuir a longevidade das abelhas em diferentes níveis (DE MIRANDA et al.,2013).

| VÍRUS | | PROPRIEDADES FÍSICAS | | | | | |
|---|-------|----------------------|-----------|-----------------------|----------------|-------------------|------------------|
| | | FORMA | TAMANHO | PROTEÍNAS DO CAPSÍDEO | ÁCIDO NUCLEICO | TAMANHO DO GENOMA | TAXONOMIA |
| Vírus da Paralisia Aguda | ABPV | Icosaedro | 30nm | 35-9-33-24KDa | ssRNA | 9.5KB | Dicistroviridae |
| Vírus da Caxemira | KBV | Icosaedro | 30nm | 37-6-34-25KDa | ssRNA | 9.5KB | Dicistroviridae |
| Virus Israelense da Paralisia Aguda | IAPV | Icosaedro | 30nm | 35-7-33-26KDa | ssRNA | 9.5KB | Dicistroviridae |
| Vírus da Realeira Negra | BQCV | Icosaedro | 30nm | 31-14-29-30KDa | ssRNA | 9.5KB | Dicistroviridae |
| Aphid lethal paralysis virus | ALPD | Icosaedro | 30nm | 25-7-32-28KDa | ssRNA | 10KB | Dicistroviridae |
| Big Sioux River Virus | BSRV | Icosaedro | 30nm | 28-5-29-30KDa | ssRNA | 10KB | Dicistroviridae |
| Vírus Deformador da Asa | DWV | Icosaedro | 30nm | 32-2-44-28KDa | ssRNA | 10KB | Iflaviridae |
| Vírus Varroa destructor-1 | VDV1 | Icosaedro | 30nm | 32-2-46-28KDa | ssRNA | 10KB | Iflaviridae |
| Vírus Egípsio | EBV | Icosaedro | 30nm | 32-2-41-25KDa | ssRNA | NI | Iflaviridae |
| Vírus da Cria Ensacada | SBV | Icosaedro | 30nm | 31-2-32-30KDa | ssRNA | 9KB | Iflaviridae |
| Vírus da Cria Ensacada Tailandês/Chinês | TSBV | Icosaedro | 30nm | 31-2-32-30KDa | ssRNA | 9KB | Iflaviridae |
| Slow bee paralysis virus | SBPV | Icosaedro | 30nm | 27-2-46-29KDa | ssRNA | 9.5KB | Iflaviridae |
| Vírus da Paralisia Crônica de Abelha | CBPV | Icosaedro | 30-60nm | 23-(30/50/75?)Kda | ssRNA | 2.3KB/3.7KB | Não Classificado |
| Chronic bee paralysis satellite virus | CBPSV | Anisométrico | 17nm | 15KDa | ssRNA | (3x)1.1KB | satellite |
| Cloudy wing virus | CWV | Icosaedro | 17nm | 19KDa | ssRNA | 1.4KB | NI |
| Bee virus-X | BVX | Icosaedro | 35nm | 52KDa | ssRNA | NI | NI |
| Bee virus-y | BVY | Icosaedro | 35nm | 50KDa | ssRNA | NI | NI |
| Lake Sinai virus-1 | LSV-1 | NI | NI | 63KDa* | ssRNA | 5.5KB | Não Classificado |
| Lake Sinai virus-1 | LSV-2 | NI | NI | 57KDa* | ssRNA | 5.5KB | Não Classificado |
| Arkansas bee virus | ABV | Icosaedro | 30nm | 43KDa | ssRNA | 5.6KB | NI |
| Berkely bee picorna-like virus | BBPV | Icosaedro | 30nm | 37-?-35-32KDa | ssRNA | 9KB | NI |
| Varroa destructor Macula-like virus | VdMLV | Icosaedro | 30nm | 24KDa* | ssRNA | 7KB | Tymoviridae |
| Apis mellifera filamentous virus | AmFV | Linear | 150x450nm | 12x(13-70KDa) | dsDNA | NI | Baculoviridae |
| Apis iridescent virus | AIV | Poliedro | 150nm | NI | dsDNA | NI | Iridoviridae |

*Genoma Predito NI=Não Informado (Incerto)

Tabela 1 - Propriedades físicas dos vírus de *Apis mellifera* conhecidos. Modificado de De Miranda et al. (2013).

Vários vírus de abelhas foram descritos em *A. mellifera*, mas somente alguns são considerados como capazes de causar doenças, assim sendo estes vírus estudados com mais frequência: Vírus da Paralisia Crônica (CBPV), Vírus da Paralisia Aguda (ABPV), Vírus Deformador da Asa (DWV), Vírus da Realeira Negra (BQCV), Vírus da Cria Ensacada (SBV), Vírus Caxemira (KBV), SBPV (Slow Bee Paralysis Virus), VDV1 (Vírus V. destructor -1) e, mais recentemente, o Vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV) (BACANDRITSOS et al., 2012). Estes vírus estão associados à perdas de colônias em vários locais do mundo, como o vírus ABPV, KBV, IAPV e o grupo de vírus deformador da asa (DWV) (BACANDRITSOS et al., 2012).

2.5.1 ABPV (Vírus da Paralisia Aguda), Vírus Caxemira (KBV) e Vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV)

O Vírus da Paralisia Aguda das abelhas (ABPV), o Vírus Caxemira (KBV) e o Vírus da Paralisia Aguda Israelense (IAPV) estão incluídos num complexo de vírus intimamente relacionados pertencentes à família Dicistroviridae, Estes vírus estão associados a perdas de colônias de abelhas, especialmente quando as colônias estão infestadas com o ácaro parasita *V. destructor* (MIRANDA, CORDONI, & BUDGE, 2010).

Além de sua estreita relação genética, tais vírus compartilham uma série de características biológicas, como as principais vias de transmissão, uma prevalência baixa e generalizada com uma etiologia predominantemente subclínica, que contrasta fortemente com a patologia extremamente virulenta encontrada em títulos elevados, induzidos artificialmente ou encontrados naturalmente (MIRANDA et al., 2010). Esses vírus são altamente variáveis, complicando tanto o diagnóstico como a classificação de maneira confiável (MIRANDA et al., 2010) e possuem distribuição mundial como pode ser visto na figura 2 (ALLEN & BALL, 1996; ELLIS & MUNN, 2005).

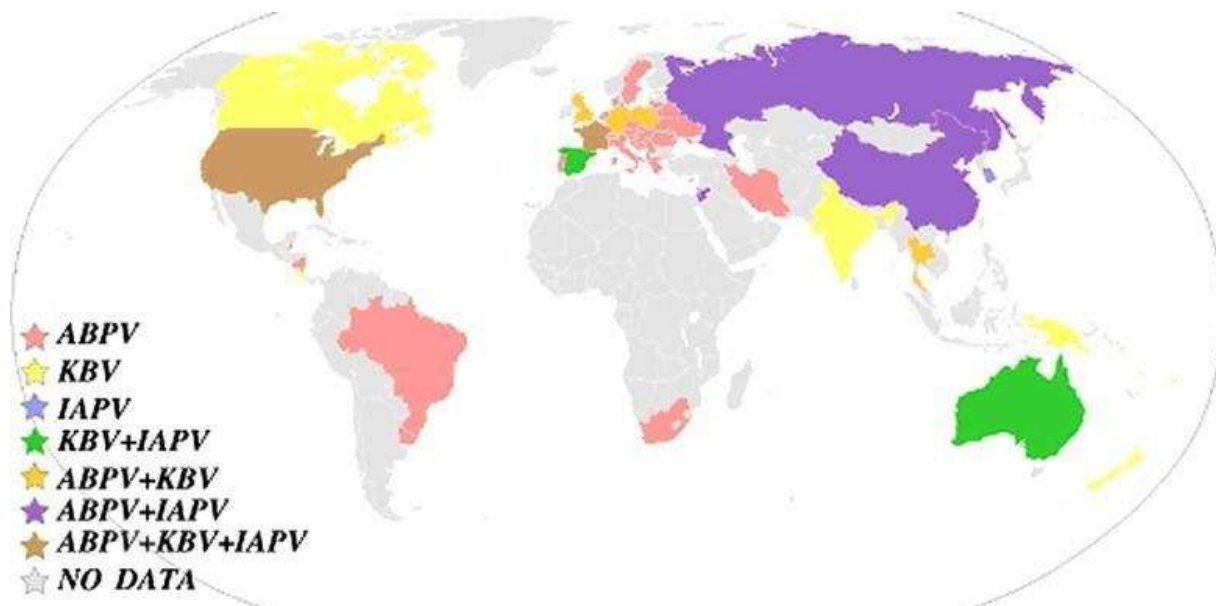


Figura 2 - Distribuição mundial de ABPV, KBV e IAPV por país. Fonte: de Miranda et al. (2010).

O ABPV foi descoberto de forma involuntária durante estudos de transmissão do Vírus da Paralisia Crônica de Abelhas (CBPV) (BAILEY et al., 1963; RIBIÈRE et al., 2010). O KBV foi de forma semelhante, descoberto em 1974, como um contaminante nas preparações de *Apis iridescente*, vírus da abelha asiática (*Apis cerana*), que se multiplicou quando injetados ou alimentados por operárias de *A. mellifera* (BAILEY et al., 1976, 1979). O IAPV foi inicialmente purificado em 2002 a partir do extrato de uma única abelha vinda de um conjunto de abelhas mortas encontradas em frente à colméias em Alon Hagalil em Israel (MAORI et al., 2007a, b).

A doença viral causada pelo o ABPV tem sintoma bem definido: as abelhas se movem de maneira brusca e tremida, principalmente o corpo e as asas, não permitindo o seu vôo. Apresentam aparência de cor cintilante, devido à falta de pelos. (CAP – Departamento Técnico, 2007).

2.5.2 DWV (Vírus Deformador da Asa)

O Vírus Deformador da Asa (DWV, Iflavirus), é um dos muitos vírus que infectam *A. mellifera* e um dos mais investigados devido à sua estreita associação com a Síndrome do Colapso de Colônias (CCD) de abelhas, induzida por *V. destructor*. Na ausência de infecção por DWV, não há sintomas visíveis ou aparentes impactos

negativos na condição física do hospedeiro. No entanto, por razões que ainda não são totalmente compreendidas, a transmissão de DWV por *V. destructor* para pupas em desenvolvimento causa sintomas clínicos, incluindo a morte pupal e abelhas emergentes com asas deformadas, abdômen inchado e descoloração. Essas abelhas não são viáveis e morrem logo após o surgimento (MIRANDA & GENERSCH, 2010).

DWV foi primeiramente chamado de Vírus da Abelha do Egito (EBV), foi isolado de abelhas adultas assintomáticas no Egito em 1977 (BAILEY et al., 1979). Logo após, em 1982, no Japão, um vírus isolado de abelhas adultas deformadas foi encontrado, distantemente relacionado a EBV por sorologia, e brevemente chamado de isolado japonês de EBV, sendo renomeado Vírus Deformador da Asa pelos sintomas com que estava intimamente associado (MIRANDA & GENERSCH, 2010).



Figura 3 - Exemplo de uma abelha adulta apresentando asas deformadas. Um dos ácaros que parasitou a pupa ainda apegado à ela. Fonte: de Miranda & Genersch et al. (2010).

2.5.3 CBPV (Vírus da Paralisia Crônica)

CBPV é um vírus não classificado filogeneticamente que está entre a Família *Nodaviridae* de vírus de insetos e peixes e a Família *Tombusviridae* de vírus de plantas (RIBIERE et al., 2010; GISDER & GENERSCH, 2017). É um vírus bastante incomum de abelhas que possui um genoma constituído de duas cadeias simples de RNA de senso positivo (GISDER & GENERSCH, 2017).

Foi isolado pela primeira vez em 1963 a partir de abelhas doentes, apresentando sintomas de paralisia como incapacidade de voar, ataxia e tremor (BAILEY et al., 1963). O vírus mostra neurotropismo por *A. mellifera* (OLIVIER et al., 2008), o que explica os

sintomas neurológicos encontrados nas abelhas infectadas. Está distribuído mundialmente nas populações de *A. mellifera* (RIBIERE et al., 2010), mas também foi encontrado em *Apis cerana* (WANG et al., 2015), em *Bombus terrestris* (CHOI et al., 2010) e *Bombus impatiens* (SACHMAN-RUIZ et al., 2015). Além disso, o CBPV é capaz de infectar formigas (*Formica rufa*, *Camponotus vago*) e *V. destruidor* (CELLE et al., 2008), o qual serve como vetor de vírus na população de abelhas (GISDER & GENERSCH, 2017).

2.5.4 BQCV (Vírus da Realeira Negra)

O Vírus da Realeira Negra (BQCV) foi pela primeira vez isolado na Austrália, a partir de larvas e pulpas de rainhas que foram encontradas mortas em suas células. O BQCV é classificado no gênero Cripavirus dentro da família Dicistroviridae e seu nome é devido às áreas escurecidas das paredes das células em que haviam pulpas infectadas, Figura 4 (Bailey e Woods, 1977). As partículas desse vírus possuem um genoma com RNA de fita simples de 8550 nucleotídeos, composto de 2 (ORFs): a ORF 5' proximal (ORF1) que codifica uma possível replicase e uma ORF 3' proximal (ORF2) que codifica uma poliproteína do capsídeo (Leat et al., 2000). BQCV é frequentemente associado a um parasita Microsporidian, *Nosema apis* (ALLEN & BALL, 1996; BAILEY et al., 1983) e pode ocasionar a mortalidade de abelhas infestadas com esse parasita.



Figura 4 - Célula da rainha infectada com o BQCV. Fonte: Rob Snyder BeeAWere (2017).

2.5.5 SBPV (*Slow Bee Paralysis Virus*).

O SBPV (*Slow Bee Paralysis Virus*) é um dos vários vírus de abelhas (*A. mellifera*) ligados à alta mortalidade de colônias infestadas com o ácaro *V. destructor* (CARRECKET al., 2010; MARTIN et al., 1998).

SBPV foi descoberto pela primeira vez na Inglaterra em 1974, em um experimento feito por Bailey & Woods após injetá-lo em abdomens de abelhas adultas, dez dias após a injeção, ele induziu a paralisia nos dois pares de pernas anteriores, com alto acúmulo de vírus na cabeça, glândulas hipofaríngeas, mandibulares e salivares, intestino médio, reto e tórax (DENHOLM, 1999). SBPV é um vírus de RNA que possui forma icosaédrica de 30 nm, cujo genoma possui três proteínas principais do capsídeo: 46, 29 e 27 kDa (BAILEY & BALL, 1991).

Por outro lado, ao contrário de outros vírus de abelhas, o SBPV parece ser extremamente raro, tendo sido apenas encontrado na Grã-Bretanha, Fiji e Samoa Ocidental (ALLEN & BALL, 1996; ANDERSON, 1990; CARRECK et al., 2010; MARTIN et al., 1998), apesar de serem incluídos nas pesquisas da Austrália (HORNITZKY, 1987), Nova Zelândia (TODD et al., 2007), Escandinávia (NORDSTRÖM et al., 1999) e Polônia (TOPOLSKA et al., 1995). Somente na Grã-Bretanha já foi associado à mortalidade das colônias (CARRECK et al., 2010).

2.5.6 SBV (*Vírus da Cria Ensacada*).

O Vírus da Cria Ensacada (SBV) é caracterizado pela sua capacidade de rápida propagação e em amplos territórios (YAN & HAN, 2008; LIU et al., 2010). Este foi identificado pela primeira vez em *A. mellifera* nos Estados Unidos em 1913, e está presente em colônias de abelhas em todo o mundo (ALLEN & BALL, 1996). O SBV infecta principalmente larvas de 2-3 dias e leva-as à morte (SUN, LI, FEI, HU & MA, 2017). É um vírus de RNA de cadeia simples de senso positivo da ordem Picornavirales; pertence ao gênero de flavírus, da família recentemente estabelecida Iflaviridae (KING et al., 2011). O sintoma clínico típico do SBV é um acúmulo de líquido rico em partículas de SBV em bolsas sub-cuticulares, que gera inchaço, formando o saco característico que dá o nome à doença, Figura 5 (BLANCHARD et al., 2014).



Figura 5 - Sintomas típicos da Cria Ensacada em larvas de operárias. Fonte: ADA (2018).

2.5.7 VDV1 (Vírus *V. destructor* -1)

O Vírus *V. destructor* 1 (VDV-1) compartilha 84% de identidade de seu genoma e 94% de seus aminoácidos com o vírus DWV (ONGUS et al., 2004). O seu genoma codifica um único polipeptídeo grande que é clivado para produzir proteínas não estruturais e estruturais (MIRANDA & GENERSCH, 2010). A principal diferença entre DWV e VDV-1 está localizada na região 5' UTR do genoma viral, embora também existam várias diferenças entre nucleotídeos das regiões codificadoras destes vírus, que resultam em alterações de aminoácidos em suas proteínas. Devido ao alto grau de similaridade com DWV, VDV-1 pode ser considerado uma variante genética dele (MIRANDA & GENERSCH, 2010). Não está claro se VDV-1 é patogênico para a *A. mellifera* ou *V. destructor* (ZIONI, SOROKER, & CHEJANOVSKY, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de vírus que acometem *A. mellifera* africanizadas em apiários de Minas Gerais.

3.2 Objetivos Específicos

- Coletar abelhas de apiários de sete mesorregiões de Minas Gerais.
- Padronização da PCR para identificação molecular de nove vírus de abelhas.
- Identificação e análise de frequência dos vírus em abelhas de apiários de Minas Gerais.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta de amostras de *Apis mellifera* africanizada

A coleta de amostras de *A. mellifera* foi feita em sete mesorregiões do estado de Minas Gerais, totalizando treze cidades, mostrada no mapa da Figura 6.



Figura 6 - Cidades do Estado de Minas Gerais onde foram coletadas as abelhas. Fonte: Google maps.

As amostras foram coletadas em colônias distintas, em apiários cujo número variou entre 1 e 3 por mesorregião. Tubos tipo Falcon estéreis e frascos de álcool etílico absoluto foram enviados do Laboratório de Infectologia Molecular Animal, instalado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), localizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV) a apicultores para que estes fizessem a coleta de operárias adultas e as enviassem novamente ao laboratório para as análises. Cada apicultor enviou as amostras pelas agências de Correios. A figura 7 mostra as Mesoregiões de MG e as cidades de onde foram enviadas as abelhas. Os dados sobre as coletas estão sumarizados na Tabela 2.

MESORREGIÕES DE MINAS GERAIS



Figura 7 - Mesoregiões do estado de Minas Gerais onde foram feitas as coletas de abelhas, os pinos verdes indicam as cidades. Fonte: Mapas para colorir.

| MESOREGIÃO | CIDADE | DATA DA COLETA |
|---------------------------------|--------------------|-----------------|
| NORTE | LONTRA | 03/10/2017 |
| SUL | PASSA QUATRO | 01 e 03/08/2017 |
| | TRÊS PONTAS | 31/07/2017 |
| | CARMO DA CACHOEIRA | 31/07/2017 |
| METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE | DOM JOAQUIM | 24/08/2017 |
| | CONGONHAS | 10/08/2017 |
| | ITABIRA | 26 e 28/09/2017 |
| JEQUITINHONHA/MUCURI | DIAMANTINA | 14/12/2017 |
| | RIO VERMELHO | 19/09/2017 |
| | ARAÇUAÍ | 22/10/2017 |
| RIO DOCE | CARATINGA | 23/11/2017 |
| ZONA DA MATA | VIÇOSA | 26/04/2017 |
| CENTRO- OESTE | DIVINÓPOLIS | 20/11/2017 |

Tabela 2 - Datas das coletas em cada cidade do estado de Minas Gerais.

4.2 Extração de RNA total de *A. mellifera*

O RNA total presente em seis abdômens (*pool*) de *A. mellifera* por apiário/localidade foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante e eluído em 40 μ L de H₂O estéril RNase *free*. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita com FIREScript RT cDNA Syntesis® KIT (Solis Biodyne) a partir de 5 μ g de RNA total, exceto para a cidade de Viçosa em que foi utilizado o kit Platus Transcriber RNase H-cDNA First Strand Kit® (Sinapse inc). A figura 8 mostra as etapas de preparação para a extração do RNA.



Figura 8 - Etapas prévias para a extração de RNA de abelhas antes de ser adicionado o reagente Trizol. O passo 1 equivale à separação de seis abelhas, seguido da retirada dos seus abdômens (passo 2) e maceração com pipeta de 1 mL (RNase *free*) ou pistilo de plástico (passo 3).

4.3 Identificação de vírus presentes em *A. mellifera* por RT-PCR

O cDNA obtido foi utilizado para a amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR) (Veriti™ Thermal Cycler®, Applied Biosystems). Foram utilizados 10 pares de primers em reações feitas de forma individual, nas quais nove pares foram específicos para vírus e um par para amplificação de gene endógeno controle (Tabela 3), sendo estes: Vírus da Paralisia Aguda (ABPV), da Realeira Negra (BQCV), da Paralisia Crônica (CBPV), *Slow Bee Paralysis Virus* (SBPV), da Asa Deformada (DWV), o Vírus Israelense da Paralisia Aguda (IAPV), o Vírus Caxemira (KBV), Vírus Varroa

Destructor -1 (VDV-1), da Cria Ensacada (SBV) e actina de *A. mellifera* (controle endógeno). Cada reação teve um volume final de 20 μL : 12,5 μL de mix contendo a enzima Taq-polimerase (Invitrogen™), 3,5 μL de H_2O (EQUIPLEX), 1,0 μL de cada primer (R e F) a 10 μM e 2,0 μL de cDNA, cuja concentração variou entre 50 e 200 ng/ μL . As configurações da reação de PCR, feita a partir de primers já publicados previamente, foram estabelecidas de acordo com a literatura (Tabela 3): desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 50 segundos; hibridização a 58°C durante 1 minuto (para os vírus VDV1 e SBPV), a 55°C (para os vírus CBPV, ABPV, BQCV, SBV), a 50°C (para o vírus KBV), a 51.5°C (para o vírus DWV/VDV1/KV) e a 60°C (para o controle Actina), seguida de extensão a 72°C por 1,5 minutos. No fim do ciclo, a reação concluiu-se com uma fase de extensão final durante 10 minutos a uma temperatura de 72°C. Para o vírus IAPV a configuração de ciclagem da PCR foi: desnaturação inicial a 94°C durante 1 minuto; com a temperatura de hibridização reduzindo 1°C durante os primeiros 15 ciclos de 65°C para 51°C e depois continuando com 25 ciclos com um perfil de ciclagem de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e extensão de 72°C durante 1 minuto. Após a amplificação, os produtos da PCR foram visualizados sob luz UV em eletroforese de gel de agarose 1%, corado com GelRed™.

| VÍRUS | | PRIMERS (5'→3') | TAMANHO DO FRAGMENTO | REFERÊNCIA | Nº DE ACESSO AO GENBANK |
|--------|--------------|---------------------------|----------------------|--|--------------------------------------|
| ABPV | ABPV - F | TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA | 900 | CHEN et al., 2006 | AF150629 |
| | ABPV - R | GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT | | | |
| BQCV | BQCV - F | TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC | 700 | BENJEDDOU et al., 2001 | JN542437 JN542438 JN542438 |
| | BQCV - R | GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC | | | |
| CBPV | CBPV - F | TCAGACACCGAATCTGATTATTG | 570 | BLANCHARD et al., 2008 | AF682799 |
| | CBPV - R | ACTACTAGAAAACCTCGTCGCTTCG | | | |
| IAPV | IAPV - F | CGATGAACAACGGAAGGTTT | 767 | COX-FOSTER et al., 2007; BLANCHARD et al., 2008; PALACIOS et al., 2008 | NC-009025 |
| | IAPV - R | ATCGGCTAAGGGGTTTGT | | | |
| KBV | KBV - F | GATGAACGTCGACCTATTGA | 276 | CHOE et al., 2012 | JN-542433 JN-542434 |
| | KBV - R | CAGTTAAGGGGTGTTGTTGC | | | |
| VDV1 | VDV1 - F | CGAAACGAAGAGCATGTAT | 1129 | GARCIA et al., 2014 | KC-786222 |
| | VDV1-R | CGACTCTCCCCAGCTAAG | | | |
| SBV | SBV - F | ACCAACCGATTCTCAGTAG | 128 | CHOE et al., 2012 | JN-542440 JN-542440 JN-542442 |
| | SBV - R | TCTTCGTCCACTCTCATCAC | | | |
| SBPV | SBPV - F | AGCGCTTAGTTCAATTGCC | 623 | GARCIA et al., 2014 | GU-938761 |
| | SBPV - R | AGACATCATTTTCAGGCTGC | | | |
| ACTINA | ACTINA-F | TGCCAACACTGTCCTTCTG | 156 | LOURENÇO et al., 2008 | AB023025 |
| | ACTINA-R | AGAATTGACCCACCAATCCA | | | |
| DWV | DWV-VP1 a-F | CTCGTCATTTGTCCCGACT | 424 | WILLIAMS et al. 2009 | AB721535.1 |
| | DWV -VP1 a-R | TGCAAAGATGCTGTCAAACC | | | |

Tabela 3 - Primers utilizados na reação de PCR. Modificado de GARCIA et al. (2014).

4.4 Clonagem dos produtos de PCR e extração de DNA plasmidial

Após a amplificação por PCR, cada fragmento gerado foi purificado com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), de acordo com recomendações do fabricante e, posteriormente inserido no vetor pGEM-T Easy (Promega). A inserção no vetor foi feita da seguinte maneira: em um microtubo de 200 μL foi adicionado 5 μL de 2X Rapid Ligation Buffer (Promega), 1 μL pGEM-T Easy (50ng), com até 3 μL do produto purificado da PCR, 1 μL T4 DNA ligase, e a reação incubada por 1 hora a temperatura ambiente. O vetor com o inserto foi inserido em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , por meio de transformação com choque térmico, com a mistura de células ao vetor por 1 min a 42°C, logo depois 2 min em gelo. Foi adicionado 1mL de meio de cultura, meio Luria-Bertani (LB) (Fisher) líquido e as bactérias incubadas sob agitação por 1 hora a 37°C. O meio com as bactérias foi centrifugado a 13.000 g, e aproximadamente 900 μL do sobrenadante foi descartado. As bactérias foram suspendidas em 100 μL de meio Luria-Bertani (LB) (Fisher) líquido e plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido (Fischer), com ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), X-gal (80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e IPTG a 0,5 mM e incubadas a 37°C, por 16 horas. Após o crescimento, as colônias brancas foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (Fisher) líquido por 14 horas a 37°C, sob agitação de 180 rpm e por fim foi feita a purificação dos plasmídeos, com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, para que fossem enviadas para sequenciamento. A confirmação dos clones com o fragmento gerado foi feita repetindo-se a PCR do item 4.3 sob as mesmas condições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de RNA total de *A. mellifera*

Após a maceração de seis abdômens de *A. mellifera* (pool) e extração de RNA total com o reagente Trizol (Invitrog.e) de acordo com recomendações do fabricante, foi feita a quantificação do RNA presente nas abelhas utilizando o Nanodrop® TM (Thermo Fisher Scientific), conforme feita a quantificação, o rendimento da extração de seis abdomens variou entre 700 e 3000 ng/μL a partir do protocolo de extração utilizado (Tabela 4) . Para a síntese de cDNA foram utilizados 5 μg de RNA total de cada cidade.

| MESOREGIÃO | CIDADE | Quantidade de RNA extraído |
|---------------------------------|--------------------|----------------------------|
| NORTE | LONTRA | 1146,3 ng/μL |
| SUL | PASSA QUATRO | 2,567,8 ng/μL |
| | TRÊS PONTAS | 945,6 ng/μL |
| | CARMO DA CACHOEIRA | 3000 ng/μL |
| METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE | DOM JOAQUIM | 783,1,3 ng/μL |
| | CONGONHAS | 1122,2 ng/μL |
| | ITABIRA | 1853,5ng/μL |
| JEQUITINHONHA/MUCURI | DIAMANTINA | 1258,5ng/μL |
| | RIO VERMELHO | 1786,5ng/μL |
| | ARAÇUAÍ | 2049 ng/μL |
| RIO DOCE | CARATINGA | 1348,1 ng/μL |
| ZONA DA MATA | VIÇOSA | 2550,6 ng/μL |
| CENTRO- OESTE | DIVINÓPOLIS | 2120,9 ng/μL |

Tabela 4 – Análise da quantidade de RNA total extraído de *A. mellifera*. A quantidade é por cada pool de 6 abdômens de abelhas.

5.2 Identificação de vírus presentes em *A. mellifera* por RT-PCR

Inicialmente pretendia-se analisar amostras de três cidades por Messorregião. Tubos falcons estéreis de 50 mL foram enviados a apicultores que se disponibilizaram a fornecer as amostras de abelhas. Devido à dependência do envio por parte dos apicultores, não foi possível cobrir o objetivo inicial de atingir três

idades por mesorregião. Apenas três Mesorregiões tiveram apiários de três cidades analisadas, sendo elas: Metropolitana de Belo Horizonte, Jequitinhonha/Mucuri e Sul do estado. As demais: Rio Doce, Norte, Zona da Mata e Centro-Oeste tiveram uma cidade de cada uma analisada e o Noroeste, Vale do Mucuri, Triângulo e Alto Parnaíba não tiveram cidades analisadas.

No total foram coletadas amostras de treze cidades de sete Mesorregiões diferentes (Figura 7). Em cada cidade, o número de apiários foi igual a um e o número de colônias por apiário variou entre um e três. A primeira cidade onde foi feita a identificação de vírus presente em *A. mellifera* foi Viçosa, localizada na Zona da Mata Mineira. O fato do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa estar localizado próximo ao local de execução do presente trabalho facilitou a coleta de amostras que serviram para padronização da metodologia. Após extração de RNA, síntese de cDNA e PCR, um amplicon para o vírus CBPV foi gerado com tamanho entre 500 e 600 pares de bases (bp). De acordo com referência prévia (BLANCHARD et al., 2008), o tamanho do amplicon gerado utilizando estes primers foi de aproximadamente 570 bp, evidenciando a possível presença do CBPV (Figura 9).

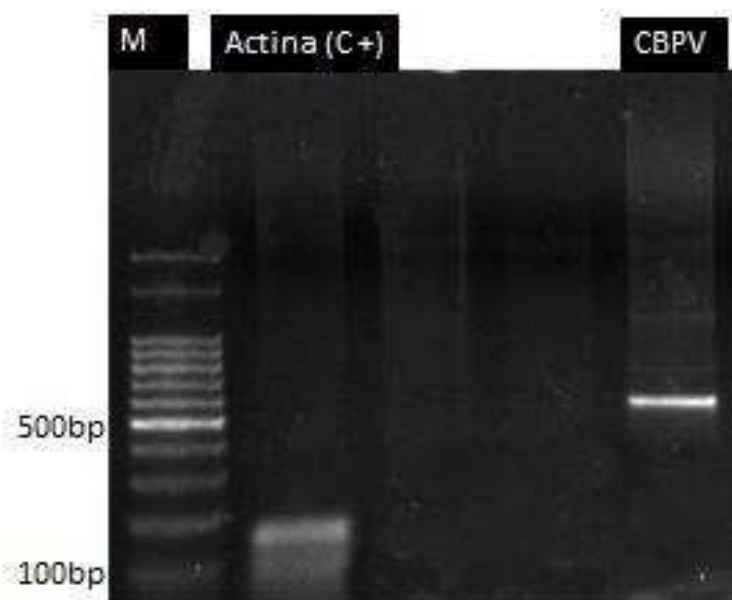


Figura 9 – Gel de Agarose a 1% dos produtos de PCR de amostra de *Apis mellifera*, corado com Gel RedTM. M-Marcador de peso molecular (100- 12000 bp).

Em seguida foram feitas as demais extrações de RNA total, sínteses dos respectivos cDNAs e reações de PCR com todas as amostras enviadas para este trabalho. A figura 10 mostra a síntese dos resultados obtidos a partir da análise da presença viral nas treze cidades mineiras de sete Mesorregiões. Verificou-se a presença do vírus ABPV e BQCV na cidade de Passa Quatro. Amplicons para o vírus CBPV também foram gerados nas cidades de Viçosa, Dom Joaquim, Araçuaí, Caratinga, Divinópolis e Diamantina (Figura 11). Para os vírus DWV, IAPV, KBV, SBPV, SBV e VDV1 não foram obtidos amplicons.

| MESOREGIÃO | CIDADE | ACTINA | ABPV | BQCV | CBPV | DWV | IAPV | KBV | SBPV | SBV | VDV1 |
|---------------------------------|--------------------|--------|------|------|------|-----|------|-----|------|-----|------|
| NORTE | LONTRA | | | | | | | | | | |
| SUL | PASSA QUATRO | | | | | | | | | | |
| | TRÊS PONTAS | | | | | | | | | | |
| | CARMO DA CACHOEIRA | | | | | | | | | | |
| METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE | DOM JOAQUIM | | | | | | | | | | |
| | CONGONHAS | | | | | | | | | | |
| | ITABIRA | | | | | | | | | | |
| JEQUITINHONHA/MUCURI | DIAMANTINA | | | | | | | | | | |
| | RIO VERMELHO | | | | | | | | | | |
| | ARAÇUAÍ | | | | | | | | | | |
| RIO DOCE | CARATINGA | | | | | | | | | | |
| ZONA DA MATA | VIÇOSA | | | | | | | | | | |
| CENTRO-OESTE | DIVINÓPOLIS | | | | | | | | | | |

Figura 10 - Análise da presença dos vírus ABPV, BQCV, CBPV, Multi- Virus VP1a, IAPV, KBV, SBPV, SBV e VDV-1 em 13 cidades do estado de Minas Gerais. O RNA foi extraído e foi feita a síntese de cDNA seguida da PCR. Como controle positivo foi utilizado a Actina de *Apis mellifera* e a visualização foi feita sob luz UV em gel de Agarose 1% corado com GelRed™.

Após a obtenção de reações positivas para os vírus ABPV, BQCV e CBPV ilustradas na Figura 10, foi feita a repetição da PCR usando os cDNAs das cidades de Passa Quatro, Viçosa, Dom Joaquim, Araçuaí, Caratinga, Divinópolis e Diamantina como mostra a Figura 11.

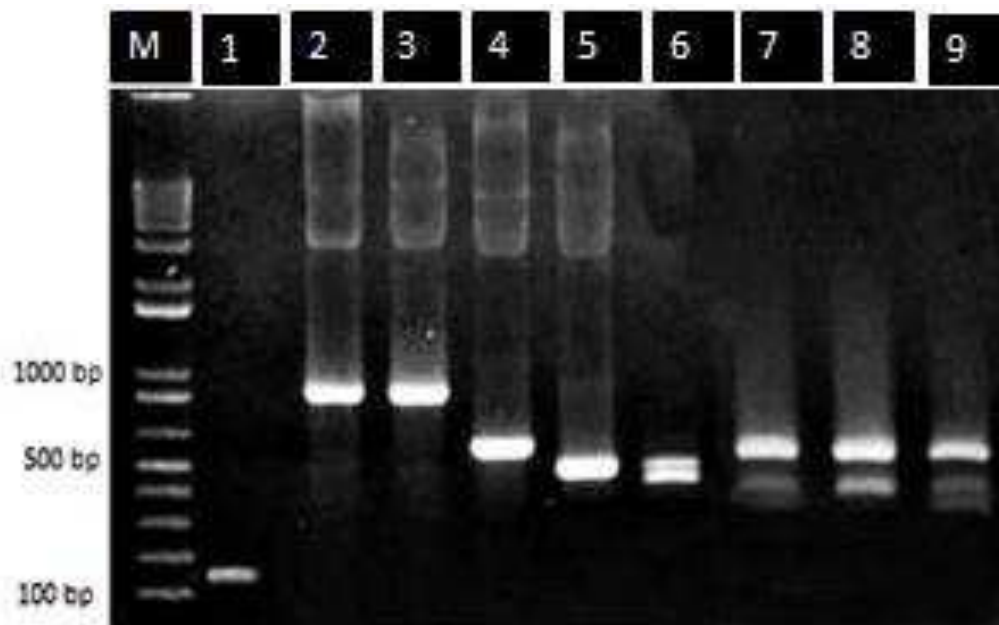


Figura 11 - Análise da presença dos vírus ABPV, BQCV e CBPV em sete cidades mineiras. A visualização foi feita em gel de agarose 1%, sob luz UV corado com GelRed™ após PCR. (M) - Marcador Molecular; (1) - Controle (+) (Actina) - **156 bp**; (2) - ABPV em Passa Quatro - **900bp**; (3) - BQCV em Passa 4 - **700 bp**; (4) - CBPV em Viçosa - **570 bp**; (5) - CBPV em Dom Joaquim - **570 bp**; (6) - CBPV em Araçuaí - **570 bp**; (7) - CBPV em Caratinga- **570 bp**; (8) - CBPV em Divinópolis - **570 bp**; (9) - CBPV em Diamantina - **570 bp**.

Além do amplicon do controle positivo (Actina), mais 8 amplicons foram gerados: um para o ABPV, um para o BQCV, e seis para o CBPV, apenas os enumerados de 2 a 6 da Figura 11 foram clonados no vetor pGEM®-T Easy e enviados para sequenciamento. Os demais (7,8 e 9) por serem das últimas cidades que tiveram as amostras analisadas não foram enviados para serem sequenciados.

Pode-se notar que o amplicon número 5 na Figura 11, gerado para o vírus CBPV na cidade de Dom Joaquim, da mesoregião Metropolitana de Belo Horizonte do Estado tem tamanho entre 400 e 500 pb. De acordo com as referências, o tamanho do amplicon deve possuir aproximadamente 570 bp. O amplicon número 6 da mesma figura, da cidade de Araçuaí do Vale Jequitinhonha/Mucuri apresentou duas bandas de tamanho também entre 400 e 500 bp. Neste caso uma possível causa, até que se tenha o resultado do sequenciamento é que o par de primers tenha se anelado de forma inespecífica, outra possibilidade é que haja um

polimorfismo interno na população de vírus ou alguma variante genética ainda desconhecida.. As duas cidades não foram inclusas na análise estatística como positivas para o vírus CBPV.

Nos amplicons 7, 8 e 9 gerados para o vírus CBPV nas cidades de Caratinga, Divinópolis e Diamantina, respectivamente, além de uma banda de coloração mais forte entre 500 e 600 bp, outras bandas aparentemente menores aparecem no gel, comparadas ao primeiro resultado da cidade de Viçosa (Figura 9) em que a banda é única. O que mudou na metodologia de Viçosa para as demais cidades foi a síntese do DNA complementar (cDNA) que foi feita com o kit Platus Transcriber RNase H-cDNA First Strand Kit (Sinapse inc), enquanto que nas outras foi feito com FIREScript RT cDNA Syntesis KIT (Solis Biodyne), podendo ser esta uma das causas da diferença. As três cidades foram inclusas como positivas para presença do vírus CBPV.

Abelhas apresentando sintomas típicos de ABPV (Vírus da Paralisia Aguda) foram encontradas em amostras provenientes da cidade de Passa Quatro no Sul do estado. Com um aspecto lúzido e brilhante, consequência da falta de pelos. Esta doença é bastante conhecida pela visibilidade deste sintoma, sendo este estado do enxame infectado conhecido por Abelhas Negras (CAP – Departamento Técnico, 2007).



Figura 12 - Comparação entre abelhas encontradas em diferentes cidades mineiras. Do lado esquerdo uma abelha encontrada em Passa Quatro no Sul do estado. Abelha com aspecto lúzido e brilhante, sintoma característico causado pelo Vírus da Paralisia Aguda (ABPV). Do lado direito uma abelha proveniente de Lontra, no Norte do estado onde, no presente trabalho não se identificou a presença de vírus de abelhas.

Para análise estatística, o cálculo de frequência de ocorrência dos vírus considerou que há possibilidade da presença de vírus nas seguintes localidades:

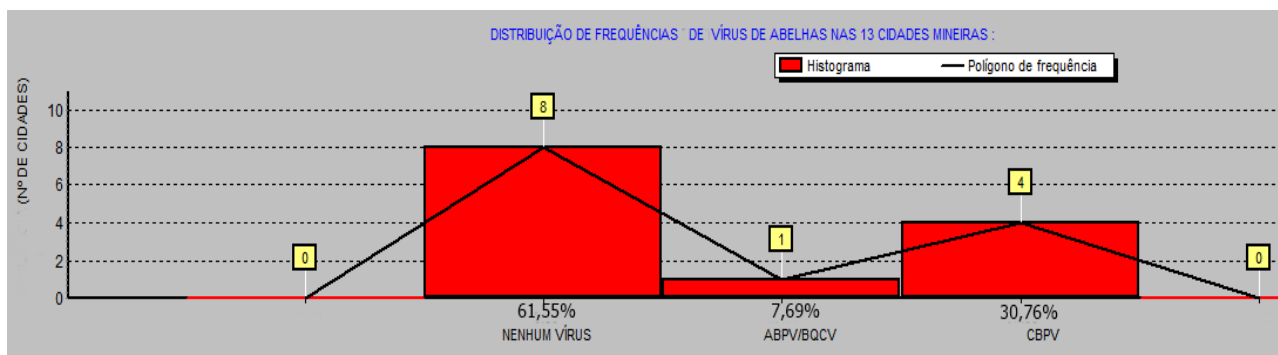


Figura 13 - Distribuição de frequência de Vírus de Abelhas nas treze cidades mineiras. Em 8 cidades não houve presença de vírus. CBPV apresentou a maior frequência, ocorrendo em quatro cidades. ABPV e BQCV ocorrem em uma cidade.

Se comprovada por sequenciamento, o que tudo indica é que a presença do CBPV se dá em maior frequência (30,76%), sendo registrada em quatro cidades mineiras: Viçosa, Caratinga, Divinópolis e Diamantina. A possível presença de ABPV e BQCV se dá em uma cidade mineira, Passa Quatro, que equivale a 7,69% da amostragem. Cerca de 61,55% das cidades analisadas não apresentaram amplicons para nove vírus testados.

5.3 Clonagem dos produtos de PCR e extração de DNA plasmidial

Amplicons gerados para os vírus ABPV (1) e BQCV (2) em Passa Quatro e para CBPV em Viçosa (3), Dom Joaquim (4) e Araçuaí (5), foram realizadas clonagens em vetor de amplificação de *E. coli*, obtenção de transformantes purificações dos plasmídeos resultantes, seguidas de PCR para confirmação da presença dos insertos nos clones (Figura 14). Todos estes foram enviados para sequenciamento. Os amplicons gerados para o vírus CBPV nas cidades de Caratinga, Divinópolis e Diamantina não foram clonados e enviados para sequenciamento por terem sido das últimas cidades recebidas para análises e sem tempo hábil para que fosse apresentado aqui.

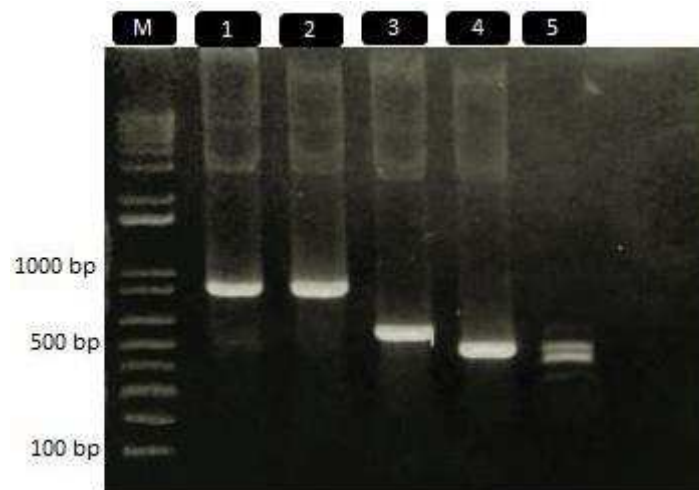


Figura 14 - Análise dos produtos de PCR após clonagem e purificação do DNA plasmidial. Gel de agarose 1% corado com GelRed™ visualizado sob luz UV.(M) Marcador;(1) ABPV -Passa Quatro;(2) BQCV-Passa Quatro ;(3) CBPV-Viçosa;(4) CBPV-Dom Joaquim;(5) CBPV Araçuaí.

Poucos estudos para a determinação do estado sanitário das abelhas africanizadas foram feitos no Brasil, onde ainda faltam dados sobre mortalidade de abelhas melíferas manejadas e nativas efetivamente registrados, no que diz respeito à presença de patógenos, exposição à agrotóxicos ou a combinação dos dois. (Pires et al., 2016).

Fazem-se necessárias medidas governamentais que visem o monitoramento de colônias, sejam elas em apiários ou em ambientes naturais, a fim de avaliar a sanidade apícola do país, devido ao importante papel ecológico e econômico que as abelhas desenvolvem.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho pode-se detectar a presença de três tipos virais: ABPV, BQCV e CBPV. Dois na cidade de Passa Quatro no Sul do Estado de Minas Gerais (ABPV e BQCV) e um (CBPV) nas cidades de Viçosa, Caratinga, Divinópolis e Diamantina. Para os vírus DWV, IAPV, KBV, SBV, SBPV e VDV1 não foram obtidos amplicons.

7. PERSPECTIVAS

Espera-se que à medida que novas amostras forem chegando dos apiários, será dada continuidade nas análises para que se possa obter uma maior amostragem e, assim, contribuir para o melhor entendimento da diversidade viral no Estado de Minas Gerais.

De posse dos resultados das amostras que foram enviadas para o sequenciamento e daquelas que ainda serão enviadas, espera-se que os dados encontrados possam confirmar as análises realizadas neste trabalho e contribuir para o entendimento de mortalidade de abelhas no estado.

REFERÊNCIAS

ABMEL. Associação brasileira dos exportadores de mel. Disponível em: <<http://brazilletsbee.com.br/abemel.aspx>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

ALLEN, M. F. & BALL, B. V. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77, 141–162.

AMDAM, G. V.; HARTFELDER, K.; NORBERG, K.; HAGEN, A.; OMHOLT, S. W. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology*, v. 97, n. 3, p. 741-747, 2004.

ANDERSON, D. L. (1990). Pests and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Fiji. *J Apic Res* 29, 53–59
Anderson, D. L. (1990). Pests and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Fiji. *J Apic Res* 29, 53–59.

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

ANETE PEDRO LOURENÇO, ALINE MACKERT, ALEXANDRE DOS SANTOS CRISTINO, ZILÁ LUZ PAULINO SIMÕES. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, Springer Verlag, 2008, 39 (3), pp.372-385.

ASOCIACIÓN APICULTURA DE ANDALUCÍA (ADA). Disponível em: <<https://apiculturadeandalucia.wordpress.com/virus/>>. Acesso em 9 de janeiro de 2018.

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

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

BAILEY, L., GIBBS, A.J., WOODS, R.D., 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 21, 390–395.

BAILEY, L. & WOODS, R. D. (1974). Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J Gen Virol* 25, 175–186.

BAILEY, L., BALL, B.V., WOODS, R.D., 1976. An iridovirus from bees. *J. Gen. Virol.* 31, 459–461.

BAILEY, L; BALL, B V (1991) Honey bee pathology (2 nd Ed.). Academic Press; London, UK. 193 pp.

BAILEY, L., BALL, B.V., PERRY, J.N., 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* 103, 13–20.

BAILEY, L., CARPENTER, J.M., WOODS, R.D., 1979. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J. Gen. Virol.* 43, 641–647.

BAILEY, L., WOODS, R.D., 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute beeparalysis viruses. *J. Gen. Virol.* 25, 175–186.

BENJEDDOU, MONGI; LEAT, NEIL; ALLSOPP, MIKE; DAVISON, SEAN. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Applied and environmental microbiology*, v. 67, n. 5, p. 2384-2387, 2001.

BLANCHARD, P., OLIVIER, V., ISCACHE, A. L., CELLE, O., SCHURR, F., LALLEMAND, P., & RIBIÈRE, M. (2008). Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability

in French CBPV isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(2), 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.003>

BLANCHARD, P., GUILLOT, S., ANTÙNEZ, K., KÖGLBERGER, H., KRYGER, P., DE MIRANDA, J. R., RIBIÈRE, M. (2014). Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *Journal of Virological Methods*, 197, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.09.012>.

CAP- Departamento Técnico (2007). *Manual de Sanidade Apícola*, 36. DE MIRANDA, J. R., CORDONI, G., & BUDGE, G. (2010). The Acute bee paralysis vírus-Kashmir *Pathology*, 103 (SUPPL.1), S30-S47. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.2014>

CAPPELARI, F. A. Efeito do tamanho da célula do favo e da infestação do ácaro *Varroa destructor* sobre a morfometria da asa e da longevidade da sua hóspede, abelha *Apis mellifera*. 2011. 137 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2011.

CARRECKT, N. L., BALL, B. V. & MARTIN, S. J. (2010). Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J Apic Res* 49, 93–94.

CELLE, O, BLANCHARD, P., OLIVIER, V., SCHURR, F., COUGOULE, N., FAUCON, J.-P., RIBIERE, M., 2008. Detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Res*. 133, 280–284.

CHEN, Y. P. et al. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Applied and environmental microbiology*, v. 72, n. 1, p. 606-611, 2006. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/72/1/606#ref-list-1>. Acesso em 08 nov. 2016. DOI: 10.1128/AEM.72.1.606-611.2006.

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

CHOE, Se Eun et al. Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. Journal of Invertebrate Pathology, v. 109, n. 3, p. 330-333, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201112000067>. Acesso em 08 nov. 2016. DOI:10.1016/j.jip.2012.01.003.

CICCO, L. H. S. de; As abelhas e a história. Disponível em: <http://www.saudeanimal.com.br/abelha0.htm>, acessado em: 07/11/2016.

Conheça o histórico da Apicultura no Brasil, Sebrae. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/conheca-o-historico-daapicultura-nobrasil,c078fa2da4c72410VgnVCM100000b272010aRCRD>>. Acesso em 7 de novembro de 2016.

CORNMAN, S R; SCHATZ, M C; JOHNSTON, S J; CHEN, Y P; PETTIS, J; HUNT, G; BOURGEOIS, L; ELSIK, C; ANDERSON, D; GROZINGER, C M; EVANS, J D (2010) Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. BMC Genomics 11: 602. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-602>.

COX-FOSTER, D L; CONLAN, S; HOLMES, E; PALACIOS, G; EVANS, J D; MORAN, N A; QUAN, P L; BRIESE, T; HORNIG, M; GEISER, D M; MARTINSON, V; VANENGELSDORP, D; KALKSTEIN, A L; DRYSDALE, A; HUI, J; SHAI, J; CUI, L; HUTCHISON, S K; SIMONS, J F; EGHOLM, M; PETTIS, J S; LIPKIN, W I (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318: 283-287. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1146498>.

DE JONG, D.; MORSE, R. A.; EICKWORT, G. C. Mite pests of honeybees. Annual Review of Entomology, v.27, p. 229-252, 1982.

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

DE MIRANDA, J. R., & GENERSCH, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S48–S61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>.

DE MIRANDA, J. R., CORDONI, G., & BUDGE, G. (2010). The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S30–S47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014>

DENHOLM, C. H. (1999). Inducible honey bee viruses associated with *Varroa jacobsoni*. PhD thesis, Keele University, Keele, UK.

DI PRISCO, G.; PENNACCHIO, F.; CAPRIO, E.; BONCRISTIANI, H. F.; EVANS, J. D.; CHEN, Y. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, v. 92, p. 151-155, 2011. Ellis, J.D., Munn, P.A., 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86, 88–101.

ELLIS, J.D., MUNN, P.A., 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86, 88–101.

FRAZIER, J; MULLIN, CHRIS; FRAZIER, MARYANN; ASHCRAFT, S. Pesticides and their involvement in colony collapse disorder. *Am Bee J*, v. 151, p. 779-781, 2011.

FUJIYUKI, T; TAKEUCHI, H; ONO, M; OHKA, S; SASAKI, T; NOMOTO, A; KUBO T (2004) Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honey bees. *Journal of Virology* 78:1093-1100. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.3.1093-1100.2004>.

GARCIA, FERNANDA. Identificação de Vírus que Afetam *Apis mellifera* Associados ao Ácaro Ectoparasita *Varroa destructor* em Apiários do Rio Grande do Sul. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Pampa, São Gabriel. 2014.

GAREDEW, A.; SCHOMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, v. 35 p. 419-430, 2004.

GISDER, S., & GENERSCH, E. (2017). Viruses of commercialized insect pollinators. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.010>

GONÇALVES, L. S. 1974. The introduction of the African bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America. *American Bee Journal*, 114 (11): 414, 415, 419 p.

GONÇALVES, L. S. 1994. Africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. II. Capítulo 4 do livro *Venenos animais. Uma visão integrada*. Editora de Publicações Científica Ltda. EPUC. São Paulo, p. 49-63.

GONÇALVES, L.S. 2001. Impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e pela competição das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* com seu parasita obrigatório, o pseudoclone de *Apis mellifera capensis*. *Anais do V Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto*, p. 72-77.

HORNITZKY, M. A. Z. (1987). Prevalence of virus infections of honey bees in Eastern Australia. *J Apic Res* 26, 181–187.

KERR, W. E. 1957. Introdução de abelhas africanas no Brasil. *Brasil Apícola*. 3: 11-213.

KERR, W. E. 1967. The history of the introduction of africanized bees to Brazil. South African Bee Journal 39: 3-5.

KEVAN, P. G.; HANNAN, M. A.; OSTIGUY, N.; GUZMAN-NOVOA, E. A summary of the Varroa-virus diseases complex in honey bees. American Bee Journal, v. 146, n. 8, p, 694-697, 2006.

KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., CARSTENS, E.B., LEFKOWITZ, E.J., 2011. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego.

LAURENT, M.; HENDRIKX, P.; RIBIERE- CHABERT, M.; CHAUZAT, M.- P. A pan- European epidemiological study on honeybee colony losses 2012- 2014. 2015. Available at: <http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/docs/bee-report_2012_2014_en.pdf>. Accessed on: 27 Dez. 2017.

LEAT, N., BALL, B., GOVAN, V., DAVISON, S., 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. J. Gen. Virol. 81, 2111–2119.

LIU, X., ZHANG, Y., YAN, X., ET AL., 2010. Prevention of chinese sacbrood virus infection in Apis cerana using RNA interference. Curr. Microbiol. 61 (5), 422–428. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9633-2>.

MAORI, E., LAVI, S., MOZES-KOCH, R., GANTMAN, Y., PERETZ, Y., EDELBAUM, O., TANNE, E., SELA, I., 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intraand inter-species recombination. J. Gen. Virol. 88, 3428–3438.

MAORI, E., TANNE, E., SELA, I., 2007. Reciprocal sequence exchange between non-retroviruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. Virology 362, 342–349.

MARTIN, S. J., HOGARTH, A., VAN BREDA, J. & PERRETT, J. (1998). A scientific note on *Varroa jacobsoni* Oudemans and the collapse of *Apis mellifera* colonies in the United Kingdom. *Apidologie (Celle)* 29, 369–370.

MATTOS, I. M.; CHAUD-NETTO, J. Effects of Natural Infestations of the Mite *Varroa destructor* on the Development of Africanized Honeybee Workers (*Apis mellifera*). *Sociobiology*, v. 58, n. 1, p. 85-93, 2011.

MICHENER, C. D. The bees of the world. University of Kansas Natural History Museum and Department of Entomology. The Johns Hopkins University Press Baltimore and London. 913 p. 2000.

NOGUEIRA-NETO, P. 1972. Notas sobre a historia da apicultura brasileira. In: CAMARGO, J. M. F. (Ed.) *Manual de Apicultura: Agronômica Ceres*, p. 17-32. O início da Apicultura no Brasil, Embrapa. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/> >. Acesso em 7 de novembro de 2016.

NORDSTROM, S., FRIES, I., AARHUS, A., HANSEN, H. & KORPELA, S. (1999). Virus infections in nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infections. *Apidologie (Celle)* 30, 475–484

OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? *Acta Amazonica, Manaus*, v. 35, n. 3, p. 389-394, 2005.

OLIVIER, V., MASSOU, I., CELLE, O., BLANCHARD, P., SCHURR, F., RIBIERE, M., GAUTHIER, M., 2008. In situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *J. Virol. Method* 153, 232–237.

ONGUS, J.R., PETERS, D., BONMATIN, J.-M., BENGSCHE, E., VLAK, J.M., VAN OERS, M.M., 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.* 85, 3747–3755.

PALACIOS, G. et al. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *Journal of virology*, v. 82, n. 13, p. 6209-6217, 2008. Disponível em: <http://jvi.asm.org/content/82/13/6209.full.pdf+html>. Acesso em 08 nov. 2016.

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

PIRES, C. S. S., DE MELLO PEREIRA, F., DO RÊGO LOPES, M. T., NOCELLI, R. C. F., MALASPINA, O., PETTIS, J. S., & TEIXEIRA, É. W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: Há casos de CCD? *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 51(5), 422–442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>.

Portal Ecodebate, Importância Econômica E Social Da Produção E Consumo De Mel. Disponível em: <https://www.ecodebate.com.br/2014/08/15/importancia-economica-e-social-da-producao-e-consumo-de-mel-artigo-de-antonio-silvio-endges/> Acesso em 14 de nov de 2016.

Reprodução IE, Abelhas EM. *Varroa destructor* Anderson & Truemann, 2000: PERFIL GENÉTICO, TAXAS DE INFESTAÇÃO E REPRODUÇÃO EM ABELHAS *Apis mellifera* L. (AFRICANIZADAS) NO BRASIL. 2012.

RIBIÈRE, M; BALL, B V; AUBERT, M F A (2008) Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In Aubert, M F A; Ball, B V; Fries, I; Morritz, R F A; Milani, N; Bernardinelli, I (Eds). *Virology and the honey bee*. EEC Publications; Brussels, Belgium. pp. 15–84.

RIBIERE, M., OLIVIER, V., BLANCHARD, P., 2010. Chronic bee paralysis virus: a disease and a virus like no other? *J. Invertebr. Pathol.* 103, S120–S131

ROSENKRANZ, P.; AUMEIER, P.; ZIEGELMANN, B. Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 103, p. 96-119, 2010.

RUNCKEL, C; FLENNIKEN, M L; ENGEL, J C; RUBY, J G; GANEM, D; ANDINO, R; DERISI, J L (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, nosema, and crithidia. *PloS One* 6 (6): e20656. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>.

RUTTNER, F. 1987. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. xii + 284 pp. Springer, Berlin.

SACHMAN-RUIZ, B., NARVAEZ-PADILLA, V., REYNAUD, E., 2015. Commercial *Bombus impatiens* as reservoirs of emerging infectious diseases in central Mexico. *Biol. Invasions* 17, 2043–2053.

SANTOS, L.G.; ALVES, M.L.T.M.F.; MESSAGE, D.; PINTO, F. de A.; SILVA, M.V.G.B. da; TEIXEIRA, É.W. Bee health in apiaries in the Paraíba Valley, São Paulo state, Southeast Brazil. *Sociobiology*, v.61, p.307- 312, 2014. DOI: 10.13102/sociobiology.v61i3.307- 312.

SCHWARZ, R.S.; TEIXEIRA, E.W.; TAUBER, J.P.; BIRKE, J.M.; MARTINS, M.F.; FONSECA, I.; EVANS, J.D. Honey bee coolies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. *Microbiology. Open*, v.3, p.341- 355, 2014. DOI: 10.1002/mbo3.172.

SHEPPARD, W. S.; SOARES, A. E. E.; DEJONG, D; SHIMANUKIA, H. 1991. Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie* 22: 643-652.

SOARES, A. E. E. (2012). Abelhas Africanizadas no Brasil: Do Impacto Inicial às Grandes Transformações. *Anais da 64ª Reunião Anual da SBPC*.

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

SUN, L., LI, M., FEI, D., HU, Y., & MA, M. (2017). Chinese sacbrood virus infection in *Apis mellifera*, Shandong, China, 2016. *Virus Research*, 242(September), 96–99.

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

TEIXEIRA, E.W.; CHEN, Y.; MESSAGE, D.; PETTIS, J.;EVANS, J.D. Virus infection in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.99, p.117- 119, 2008a. DOI: 10.1016/j.jip.2008.03.014.

TEIXEIRA, E.W.; CHEN, Y.- P.; MESSAGE, D.; BONCRISTIANI,H.F.; PETTIS, J.S.; EVANS, J.D. Israeli acute paralysis virus in Africanized honey bees in southeastern Brazilian apiaries. *Journal of Apicultural Research*, v.51, p.282- 284, 2012. DOI: 10.3896/IBRA.1.51.3.11.

TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; CHEN, Y.; PETTIS, J.;EVANS, J.D. First metagenomic analysis of microorganisms in honey bees from Brazil. *Boletim da Indústria Animal*, v.65,p.355- 361, 2008b.

TEIXEIRA, E.W.; SANTOS, L.G. dos; SATTTLER, A.; MESSAGE,D.; ALVES, M.L.T.M.F.; MARTINS, M.F.; GRASSI-seLLA,M.L.; FRANCOY, T.M. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.114, p.250- 254, 2013.DOI: 10.1016/j.jip.2013.09.002.

TODD, J. H., DE MIRANDA, J. R. & BALL, B. V. (2007). Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie (Celle)* 38, 354–367.

TOPOLSKA, G., BALL, B. V. & ALLEN, M. F. (1995). Identification of viruses in bees from two Warsaw apiaries. *Med Weter* 51, 145–147.

vanENGELSDORP, D.; EVANS, J.D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B.K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D.R.; PETTIS, J.S. Colony collapse disorder: a descriptive study. *Plos One*, v.4, e6481, 2009. DOI: 10.1371/ journal.pone.0006481.

vanENGELSDORP, D.; HAYES JR., J.; UNDERWOOD, R.M.; PETTIS, J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *Plos One*, v.3, e4071, 2008. DOI: 10.1371/journal.pone.0004071.

vanENGELSDORP, D.; HAYES JR., J.; UNDERWOOD, R.M.; CARON, D.; PETTIS, J. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research*, v.50, p.1- 10, 2011. DOI: 10.3896/IBRA.1.50.1.01.

vanENGELSDORP, D.; HAYES JR., J.; UNDERWOOD, R.M.; PETTIS, J.S. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research*, v.49, p.7- 14, 2010. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.03.

vanENGELSDORP, D.; UNDERWOOD, R.; CARON, D.; HAYES JR, J. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006– 2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*, v.147, p.599- 603, 2007.

VIDAL, M.F. Efeito da Seca de 2012 Sobre a Apicultura Nordestina. *Informe Rural*.

WANG, T.-S., SHI, T.-F., LIU, F., YU, L.-S., QI, L., MENG, X.-J., 2015. Occurrence and distribution of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* in Anhui Province, China. *Chin. J. Appl. Entomol.* 52, 324–332

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

YAN, X., HAN, R.C., 2008. Diagnostic technologies of common pathogens of honeybees in China. *Chin. Bull. Entomol.* 45, 483–488.

ZIONE N., SOROKER, V., & CHEJANOVSKY, N. (2011). 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*, 417(1), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.009>.

APÊNDICES

Distribuição das frequências de Vírus que acometem *Apis mellifera* em treze cidades do Estado de Minas Gerais

Amostra original

00.ABPV/BQCV Passa Quatro

75.CBPV Diamantina

75.CBPV Divinópolis 75.CBPV

Viçosa

75.CBPV Caratinga

10.Araçuaí

10.Dom Joaquim

10.Rio Vermelho

10.Lontra

10.Três Pontas

10.Carmo da Cachoeira

10.Itabira

10.Congonhas

distribuição de frequências - Critério de Scott(1974)

LI

LS

Ponto Médio

FOi

Fri

-18.75000 |---

18.75000

0.00000

8.00000

0.61538

18.75000 |--- 56.25000 37.50000 1.00000 0.07692

56.25000 |--- 93.75000 75.00000 4.00000 0.30769

Estatísticas descritivas

n: 13
Média: 32.307692
Variância: 1010.897436
Desvio padrão: 31.794613
Coeficiente variação: 98.411898
Erro padrão da média: 8.818239
Coef. de assimetria: 0.554180
Coef. de Curtose: 1.431926
Mínimo: 0.000000
Máximo: 75.000000
Amplitude total: 75.000000
Mediana: 11.718750
Moda: 1.250000
