

FÁBIO DE ASSIS PINTO

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

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós
Graduação em Entomologia para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P659v
2012
Pinto, Fábio de Assis, 1987-
Varroa destructor Anderson & Truemann, 2000: perfil
genético, taxas de infestação e reprodução em abelhas
Apis mellifera L. (africanizadas) no Brasil / Fábio de Assis
Pinto. – Viçosa, MG, 2012.
ix, 43f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Dejair Message.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-39

1. Ácaro. 2. Parasitismo. 3. Abelha - Criação. 4. Sociedades
de insetos. 5. Inseto - Comportamento. 6. Enzimas.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.42

FÁBIO DE ASSIS PINTO

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

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de julho de 2012.

Sérgio Oliveira de Paula

Weyder Cristiano Santana
(Coorientador)

Dejair Message
(Orientador)

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a Jesus Cristo, Ele é o senhor de todas as coisas e desde que me entreguei a tua vontade, foram muitas as alegrias e realizações, pois quem segue o teu caminho será Vitorioso!”

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus e a Jesus Cristo, por sempre guiar e iluminar meu caminho.
- A meus pais e avós, por todo o apoio, amor e consideração. Sabemos que o caminho é árduo e em muitos momentos a vida é dura. Mas com pessoas maravilhosas como vocês a meu lado, a força do amor para enfrentar os desafios é muito maior do que as adversidades.
- A minha namorada Gabriela de Oliveira de Ávila. Nosso amor começou justamente ao meu ingresso ao Mestrado e foi crucial para esta conquista. Todo suporte nos momentos difíceis, toda palavra de carinho e cumplicidade que fizeram e fazem nosso amor crescer a cada dia.
- Ao meu orientador, Dejair Message e Coorientadores, Erica W. Teixeira, Marta F. Martins e Weyder C. Santana por todo conhecimento, suporte e dedicação. Sou muito grato pela grande participação em meu processo de formação como profissional. Agradeço também aos “puxões de orelha”, pois sei que somente visam minha melhora!
- A Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio (APTA) polo de apicultura e ao CNPq, pelo acolhimento e total suporte para o desenvolvimento do experimento e obtenção de experiência no segmento laboratorial.
- Ao meu grande amigo Anderson Puker, meu mentor no mestrado. Sua bondade, paciência e dedicação criaram em pouco tempo uma grande amizade entre nós. Minha gratidão por contribuir com meu desenvolvimento profissional e pela realização desta dissertação.
- Aos meus amigos Wagner Faria Barbosa, Carlos Joulbert e Luciano Barreto Mendes pela grande amizade conquistada em pouco tempo. Os momentos de descontração, os ensinamentos e as bobearas proporcionaram momentos maravilhosos em minha vida.
- A funcionária Carmen Lucia, pela grande ajuda no deslocamento para o laboratório e apoio nas análises. Serei sempre grato por toda ajuda e amizade.
- Ao Dr. Matias Maggi, Dr. José Carlos V. Guerra-Jr., pelas amostras valiosas da Argentina e Fernando de Noronha – PE.

- Aos Técnicos da Defesa Sanitária do estado do Rio de Janeiro, João Soares Neto e Ângelo R. J. Reis e apicultor Lucino F. Costa, pela grande colaboração no fornecimento das amostras de Rio Claro – RJ e por toda boa vontade a serviço da apicultura brasileira.
- Aos apicultores das regiões analisadas neste trabalho e funcionários da APTA por todo apoio no fornecimento de amostras, suporte e informações para o desenvolvimento da dissertação.
- Aos meus demais familiares e amigos por toda a torcida, palavra de apoio e carinho. É muito bom saber que tantas pessoas torcem pelo seu sucesso e acreditam em seu potencial.
- A CAPES pelo suporte financeiro fornecido através da bolsa.
- A Universidade Federal de Viçosa e Departamento de Entomologia pelos conhecimentos fornecidos e suporte.
- Aos professores que tive o grande prazer em conhecer, pelas ótimas aulas que contribuíram para o conteúdo e qualidade deste trabalho.

BIOGRAFIA

O escritor deste manuscrito, **Fábio de Assis Pinto** nascido em 1987 na cidade de São Paulo – SP, que, mesmo sendo uma selva de pedra, não interferiu em sua paixão adquirida desde pequeno pelo fascinante mundo da biologia. Em meio de carrinhos e bonecos, seus brinquedos favoritos eram uma lata, besouros e formigueiros. Aos 10 anos mudou-se para o município de Pindamonhangaba – SP, o qual pôde adquirir um contato maior com o verde, cruzando pastos de sítios e fazendas “enchendo-se” de carrapatos para poder pescar com seus colegas, sem ao menos imaginar que trabalharia com “carrapatos de abelhas”!

Aos 18 anos, realizou seu sonho de infância e entrou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade de Taubaté. Em pouco tempo de curso soube que a Biologia era sua vocação e durante o segundo ano de graduação, Deus promoveu a oportunidade de ingressar no Centro de Estudos Apícolas, dirigido pela Prof. Dra. Lídia M. R. C. Barreto. Após conhecer um pouco do fascinante mundo da apicultura, foi direcionado a realizar um trabalho de Iniciação Científica com o ácaro *Varroa destructor*, até então desconhecido pelo autor.

Passaram-se três anos de muitas experiências boas, trabalhos, amigos e congressos. Como exigência para receber o título de Bacharel, realizou monografia avaliando taxas de infestação de varroa em diferentes regiões do Vale do Paraíba – SP e pouco antes de se formar, foi convidado pela Dra. Érica W. Teixeira e Prof. Dr. Dejair Message para unir-se ao grupo de pesquisa do Laboratório de Sanidade Apícola da APTA de Pindamonhangaba. Adquirindo experiência nos segmentos de sanidade apícola, após seis meses candidatou-se ao Mestrado em Entomologia da UFV e ao ser selecionado, realizou mais um grande sonho e passo como profissional. Mudou-se para Viçosa – MG, local onde adquiriu conhecimento, maturidade e conheceu grandes amigos. Após um ano, retornou a Pindamonhangaba para realização da parte prática deste trabalho. Sempre pela direção de Jesus, em Julho de 2012 defendeu sua Dissertação, obtendo o título de Mestre e foi selecionado para o Doutorado em Entomologia desta Universidade, continuando a traçar seu caminho e realizar seu sonho de lecionar como professor universitário.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
APTA	Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio
CCD	<i>Colony Collapse Disorder</i>
IAPV	<i>Israeli Acute Paralysis Virus</i>
Haplótipo <i>J</i>	Haplótipo Japonês-Tailandês
Haplótipo <i>K</i>	Haplótipo Coreano-Russo
DWV	<i>Deformed Wing Virus</i>
APV	<i>Acute Paralysis Virus</i>
SAA	Secretaria da Agricultura e Abastecimento
COI	Subunidade I da Citocromo c Oxidase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>XhoI</i>	Enzima de restrição obtida do gene de <i>Xanthomonas holcicola</i>
<i>SacI</i>	Enzima de restrição obtida do gene de <i>Streptomyces achromogenes</i>
“pb”	Pares de Bases
SMR	<i>Suppression Mite Reproduction</i>
ABPV	<i>Acute Bee Paralysis Virus</i>
KBV	<i>Kashmir Bee Virus</i>
SBV	<i>Sacbrood Virus</i>

RESUMO

PINTO, Fábio de Assis. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. ***Varroa destructor* Anderson & Truemann, 2000: Perfil genético, taxas de infestação e reprodução em abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas) no Brasil.** Orientador: Dejair Message. Coorientadores: Erica Weinstein Teixeira, Marta Fonseca Martins e Weyder Cristiano Santana.

O ácaro *Varroa destructor* (Mesostigmata – Varroidae) (Anderson & Truemann, 2000) é um dos maiores problemas na apicultura mundial. Além de ser o vetor de vírus que têm sido frequentemente relacionados à síndrome do desaparecimento das abelhas (CCD), causa mortalidade de colônias em níveis elevados de infestação. Seus danos dependem de uma série de fatores bióticos e abióticos e, acredita-se que, variações genótípicas (haplótipo) são uma das principais causas. No Brasil, o ácaro aparentemente não causa grandes danos às colônias, mantendo-se em níveis baixos de infestação, contudo, com a entrada do haplótipo *K* no país, especula-se um possível aumento na taxa reprodutiva do ácaro, a exemplo do que vem sendo relatado em outros países. Nesse contexto, realizamos identificações do perfil genético de *Varroa destructor* em 58 municípios brasileiros, distribuídos em 14 estados juntamente com avaliações nas taxas de infestação e potencial reprodutivo do parasita em *Apis mellifera* L. africanizada (Hymenoptera – Apidae). O haplótipo *J*, genótipo considerado menos problemático, foi encontrado somente em quatro localidades, muito embora o H. *K* também tenha sido identificado nestes municípios, exceto na Ilha de Fernando de Noronha-PE, onde apenas o H. *J* foi identificado. Os níveis de infestação do total de amostras analisadas variaram de $0,33 \pm 0,55\%$ a $15,3 \pm 9,2\%$, enquanto que o potencial reprodutivo variou de 0 a $1,5 \pm 0,2$. Observamos diferenças significativas ($P < 0,001$) na dinâmica de infestação do ácaro nos diferentes municípios avaliados, embora os níveis encontrados tenham sido consideravelmente baixos quando comparados aos encontrados em outros países. Tais variações não puderam ser atribuídas ao padrão de haplótipos (*K* ou *J*), uma vez que não foi constatada diferença entre os mesmos para o parâmetro avaliado. Aparentemente, fatores não envolvendo diferenças no genótipo mitocondrial, como variações climáticas entre regiões, manejo e seleção para comportamento higiênico possuem maior relação às variações na dinâmica de infestação do ácaro no Brasil.

ABSTRACT

PINTO, Fábio de Assis. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. ***Varroa destructor* Anderson & Truemann, 2000 in africanized honey bees (*Apis mellifera* L.): Genetic profile, infestation rates and reproduction in Brazil.** Adviser: Dejour Message. Co-Advisers: Erica Weinstein Teixeira, Marta Fonseca Martins and Weyder Cristiano Santana.

The mite *Varroa destructor* (Mesostigmata – Varroidae) (Anderson & Truemann, 2000) is a major problem in the apiculture. Besides being the vector of viruses related to Colony Collapse Disorder (CCD), causes mortality of colonies at high levels of infestation. Its damage depends upon a number of biotic and abiotic factors, in which the variation in the pattern of haplotypes is believed to be a key. In Brazil, the mite does not appear to cause major damage to the colonies, remained at low levels of infestation, however with the entry of haplotype *K* in the country, in example of other countries, we speculate a possible increase in reproductive rate of the mite. In this context, we analyzed the genetic profile in 58 municipalities, divided into 14 states along with evaluations of infestation rates and reproductive potential of the parasite in Africanized honeybee (Hymenoptera – Apidae). The Haplotype *J*, considered less problematic mitochondrial genotype was found only in four localities, yet the *K* haplotype was also identified in these counties, except the island of Fernando de Noronha, Pernambuco. Infestation levels ranged from $0.33 \pm 0.55\%$ to $15.3 \pm 9.2\%$, while the reproductive potential ranged from 0 to 1.5 ± 0.2 . There were significant differences ($P < 0,001$) in the dynamics of mite infestation in the different municipalities assessed, although the levels found are considerably low compared to most other countries that use chemical treatment, and such variations could not be attributed to the pattern of haplotypes. Apparently factors not involving differences in mitochondrial genotype as climatic variations between regions, management and selection for hygienic behavior are related to variations in the dynamics of mite infestation in Brazil.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
BIOGRAFIA DO AUTOR	v
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. APICULTURA NO BRASIL	1
1.2. PAROLOGIA APÍCOLA	2
1.3. <i>Varroa destructor</i>	3
1.4. OBJETIVOS	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	6
2.2. EXTRAÇÃO DE DNA	7
2.3. TÉCNICAS MOLECULARES	9
2.4. SEQUENCIAMENTO	10
2.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL REPRODUTIVO E INFESTAÇÃO	11
2.6. ESTATÍSTICA	12
3. RESULTADOS	13
3.1. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	13
3. TABELA 1	15
3.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL REPRODUTIVO E INFESTAÇÃO	15
3. TABELA 2	17
4. DISCUSSÃO	23
4.1. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	23
4.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL REPRODUTIVO E INFESTAÇÃO	26
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apicultura no Brasil

A apicultura destaca-se por ser uma atividade causadora de baixos impactos ambientais e contribuinte para polinização de cultivares e plantas nativas. No Brasil, a apicultura é uma atividade rentável e em franco crescimento devido a fatores como o clima favorável à prática, o uso da abelha *Apis mellifera* L. africanizada (Hymenoptera – Apidae) e aumento da exportação de mel e outros produtos apícolas (Perosa et al. 2004). Em um estudo para avaliar os parâmetros de competitividade do mel brasileiro, Perosa et al. (2004) verificaram um aumento de 66% na produção de mel no Brasil entre 1990 a 2002. Com o incentivo de órgãos voltados para comercialização de produtos, no ano de 2011, 22.398.577 kg de mel foram exportados arrecadando o valor de U\$ 70.868.550, com aumento de 22,32% comparado a 2010 (SEBRAE, 2011).

Considerando-se a importância de tais insetos como polinizadores e ainda o potencial de mercado e crescimento acelerado de produção e exportação de produtos apícolas brasileiros, torna-se necessário o investimento em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de técnicas que priorizem a produção. Assim, pesquisas na área de sanidade apícola são importantes e necessárias, tanto no que se refere a entender os mecanismos envolvidos nas relações patógeno-inseto, como em relação à qualidade do produto apícola e os possíveis riscos a saúde do consumidor.

1.2. Patologia apícola

No Brasil, poucos são os registros de epizootias causando mortalidade de colônias de *A. mellifera* em larga escala. Um fator que contribui para esta condição é a africanização das abelhas utilizadas na prática da apicultura no país. Aparentemente essas abelhas possuem uma maior tolerância a parasitas como o ácaro *Varroa destructor* Anderson e Truemann, 2000 (De Jong, 1996; Rosenkranz, 1999; Rosenkranz et al., 2010). No entanto, devido às deficiências na fiscalização de produtos apícolas importados e utilização de agrotóxicos, há um risco constante na manutenção da condição sanitária privilegiada das abelhas no Brasil. O manejo inadequado, juntamente com a entrada de patógenos exóticos e uso desnecessário de quimioterápicos nas colônias podem afetar drasticamente o promissor mercado da apicultura brasileira.

Vários organismos podem parasitar abelhas na fase imatura ou adulta podendo levar a colônia ao colapso, dependendo de seu grau de virulência (Bailey e Ball 1991; Ellis e Munn 2005). Atualmente registros de perdas de colônias no Hemisfério Norte trouxeram grandes preocupações para a comunidade científica pela importância da atividade polinizadora desenvolvida pelas abelhas (Neumann e Carreck 2010). Esse fenômeno denominado CCD (*Colony Collapse Disorder*) foi identificado inicialmente nos Estados Unidos em 2006 com registros de 23% de apiários afetados com perdas, em média, de 45% das colônias (Cox-Foster et al. 2007). A causa da CCD ainda não é totalmente clara, especulava-se que interações entre patógenos como o vírus IAPV e Microsporídeos (*Nosema ceranae*, Fries et al. 1996) tinham relações com a síndrome (Cox-Foxter et al. 2007). No entanto,

Bromenshenk et al. (2010) observaram colônias com os mesmos sintomas e sem a presença de IAPV, sugerindo caráter multifatorial da CCD e ação conjunta e oportunista do ácaro *V. destructor* e dos patógenos descritos acima favorecendo a mortalidade das colônias nos EUA.

Após os registros de grandes perdas de colônias nos EUA, mortalidades de colônias com sintomas semelhantes foram relatados em diferentes países, inclusive o Brasil. Teixeira et al. (2008a) observaram declínios na população de abelhas na região sudeste do país e ao analisarem abelhas vindas da região identificaram a presença de 3 vírus de abelhas com prevalência de até 37% nas amostras. Em outro trabalho Teixeira et al. (2008b) ao realizarem a primeira análise metagenômica em abelhas no Brasil, além dos vírus encontrados no trabalho anterior, identificaram a presença do vírus IAPV em 26% das amostras.

Além da ação de patógenos, a aplicação de substâncias químicas para o combate de doenças pode ser outro grande problema devido à possibilidade de selecionar populações de patógenos resistentes além de contaminar os produtos apícolas e causar possíveis riscos à saúde humana (Lodesani et al. 2008). Diante desse fato existe uma forte tendência mundial para o investimento em melhoramento genético visando obtenção de colônias resistentes em detrimento do uso de controles químicos para produzir produtos mais seguros para o consumidor (Rosenkranz et al. 2010; Pinto et al. 2011a)

1.3. *Varroa destructor*

O ácaro *V. destructor* é um dos parasitas de insetos mais estudado no mundo. Anteriormente conhecido como *Varroa jacobsoni* Oudemans, era encontrado

parasitando abelha oriental, *Apis cerana* F. (Hymenoptera – Apidae) em baixos níveis de infestação, contudo, entrou em contato com *Apis mellifera* L. e se espalhou rapidamente pelos demais continentes (Bailey e Ball 1991; Anderson e Truemann 2000; Rosenkranz et al. 2010). Devido a variações no comportamento, morfologia e dinâmica de infestação, Anderson e Truemann (2000) realizaram análises morfológicas e genéticas em ácaros de diversos países identificando 18 genótipos mitocondriais do ácaro e separando-os em duas espécies distintas: *V. jacobsoni* e *V. destructor*, sendo que somente dois haplótipos da última espécie, conhecidos como Coreano-Russo ou *K* e Japonês-Tailandês ou *J*, são encontrados em *A. mellifera*. Segundo os autores, o haplótipo *K* possui potencial reprodutivo maior em relação ao *J*, e geralmente é predominante em regiões onde o ácaro causa grandes danos, contudo são necessários trabalhos mais detalhados avaliando o efeito do perfil genético do ácaro em relação ao seu potencial reprodutivo e dano às colônias.

A fêmea de *V. destructor* entra em uma célula de cria e após a operculação realiza a postura dos ovos. Tanto a fêmea como sua prole alimenta-se da hemolinfa do hospedeiro. Ao atingir a maturação sexual, as fêmeas jovens são fecundadas pelo macho consanguíneo ou um macho filho de outra fêmea que tenha invadido a mesma célula de cria. Posteriormente, as fêmeas já adultas, saem da célula de cria juntamente com a abelha hospedeira (Bailey e Ball 1991; Calderón et al. 2010; Rosenkranz et al. 2010). Ao alimentar-se, o ácaro interfere no desenvolvimento e expectativa de vida da abelha, além de atuar como vetor de vários vírus como DWV, IAPV e APV (Bailey e Ball, 1991; Chen e Siede, 2007; Boecking e Genersch, 2008; Rosenkranz et al. 2010).

Devido ao seu sucesso reprodutivo em colônias com baixa tolerância e interação com vírus, o *Varroa* causa grandes problemas para a apicultura mundial

forçando a utilização de acaricidas para seu controle em determinadas regiões (Rosenkranz et al. 2010). No entanto, em algumas regiões como exemplo o Brasil, mesmo com a presença do ácaro, suas taxas de infestação mantêm-se baixas, não causando grandes danos às colônias e não sendo necessário o uso de acaricidas para o controle (De Jong e Gonçalves, 1998; Martin e Medina, 2004; Pinto et al. 2011a).

Acredita-se que o ácaro foi introduzido no Brasil no início dos anos 70 por apicultores japoneses que trouxeram colônias de abelhas do Japão para o Paraguai e posteriormente para o Brasil; e no início dos anos 80, observaram-se as primeiras colônias infestadas na região de Ribeirão Preto, São Paulo (De Jong e Gonçalves, 1981). Após elevada infestação inicial, em poucos anos as taxas de infestação diminuíram para uma média de 3%, valor considerado baixo (De Jong e Gonçalves, 1998). As Abelhas africanizadas utilizadas amplamente na apicultura brasileira, possuem várias características que podem ter favorecido para a tolerância ao ácaro, como seu comportamento ativo frente às condições climáticas do Brasil (Moretto et al. 1991), tamanho da célula de cria (Message e Gonçalves, 1995) e alta taxa de comportamento higiênico (Peng et al., 1987; Spivak, 1996; Harbo e Harris, 2009).

Como dito anteriormente, variações genéticas dentro da espécie do ácaro pode ser outro fator que favoreceu aos baixos níveis de infestação. Acredita-se que o haplótipo *J* do ácaro foi o primeiro a entrar em contato com as abelhas africanizadas no Brasil. Contudo, Garrido et al. (2003) verificaram um aumento na taxa reprodutiva do ácaro e a predominância do haplótipo *K* no estado de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Recentemente Strapazzon et al. (2009), encontraram total prevalência do haplótipo *K* em apiários de Santa Catarina, e o haplótipo *J* em 100% das amostras oriundas do arquipélago de Fernando de Noronha. A prevalência do haplótipo *J* na referida região foi motivada, possivelmente, pelo isolamento

geográfico. Contudo não há levantamentos que abrangem várias regiões do país para averiguar o atual perfil na distribuição de haplótipos e taxas de infestação do ácaro em abelhas *A. mellifera* africanizada.

1.4. Objetivos

Nesse contexto, tivemos como objetivo neste trabalho:

- Verificar a ocorrência dos haplótipos *K* e *J* de *V. destructor* em apiários de diferentes regiões do país;
- Verificar a possibilidade da presença de outras espécies de ácaros ectoparasitas em apiários de diferentes regiões do país;
- Comparar e determinar as diferenças da dinâmica de infestação do ácaro *V. destructor* em tais apiários, avaliando o potencial reprodutivo e níveis de infestação atuais dos haplótipos presentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho, excetuando-se aquelas oriundas da Argentina e de Fernando de Noronha, foram analisadas junto ao Laboratório de Sanidade Apícola do Pólo Regional do Vale do Paraíba/APTA/SAA-SP, local onde foram devidamente armazenadas e avaliadas nos seguimentos de dinâmica de infestação e perfil genético.

As coletas das amostras foram realizadas, em sua maioria, pelo serviço veterinário oficial dos diferentes estados da federação, além de apicultores, extensionistas e pesquisadores colaboradores. As coletas efetuadas em 58 municípios, pertencentes a 14 estados brasileiros (Tabela 2), foram oriundas de localidades onde, na maioria dos casos, não havia relatos registrados sobre a presença do ácaro em colônias de *Apis mellifera*. As amostras de Fernando de Noronha – PE, foram fornecidas gentilmente pelo Prof. Dr. José Carlos Vieira Guerra-Jr da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Além das amostras brasileiras, amostras de ácaros de dois municípios da Argentina (Buenos Aires e Mar del Plata), cedidas pelo Prof. Dr. Matias Maggi da Universidad Nacional Mar del Plata, foram analisadas para comparação do perfil genético. A variação da quantidade de municípios dentre os estados avaliados está relacionada principalmente a disponibilidade de contatos com os apicultores de cada região. Amostras de favo com ~ 3 x 10 cm, contendo crias operculadas (pupas de olhos marrons) foram retiradas por colônia de um a três apiários por cidade. As amostras foram devidamente embaladas em papel de jornal, mantidas refrigeradas e estocadas a -20 °C até a realização das análises.

2.2. Extração de DNA

Os ácaros adultos, bem como os descendentes encontrados nas amostras foram separados e acondicionados em microtubos de 1,5 mL com álcool 70%. Para cada amostra, selecionamos três ácaros adultos coletados de diferentes células de cria. Nas amostras de favo onde não encontramos ácaros, utilizamos ácaros oriundos de abelhas adultas da mesma colônia que o favo analisado. Para extração do material

genético dos ácaros, utilizamos um método *In house* de extração de DNA em larvas de carrapato, adaptado do manual de procedimentos técnicos da Embrapa Gado de Leite (2009), conforme descrito abaixo:

Cada grupo de três ácaros foi transferido para tubos de 1,5 mL e macerado com 300 µL de tampão de maceração. Posteriormente acrescentou-se 300 µL de tampão de lise, resfriando as amostras em gelo por 15'. Após este período, adicionou-se 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL). Em seguida as amostras foram colocadas em banho-maria a 55°C por 60'. Após os 60', acrescentou-se 300 µL de clorofórmio/isoamil (24:1) e 300 µL de fenol e o produto foi centrifugado a 17.000 \times g, a 8 °C por 5'. Após a centrifugação, a fase superior de cada amostra foi transferida para microtubos de 2 mL e foram acrescentados 600 µL de clorofórmio/isoamil (24:1) e novamente o produto foi centrifugado a 17.000 \times g, 8 °C, por 5'. A fase superior foi transferida para tubos de 1,5 mL, onde se acrescentaram 60 µL de NaCl 5M e 1000 µL de etanol absoluto. Após estocagem a -20 °C *overnight* para a precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas a 17.000 \times g, a 8 °C, por 30' e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi resuspendido com 60 µL de álcool 70% e submetido a uma nova centrifugação a 17.000 \times g, a 8 °C, por 5'. Novamente a fase superior foi descartada, o *pellet* foi submetido à secagem em temperatura ambiente por 30' e posteriormente resuspendido em água ultra-pura *nuclease-free* (Ambion®).

2.3. Técnicas moleculares

2.3.1 Determinação da espécie do ácaro

Para a determinação dos haplótipos, o gene COI do genoma mitocondrial do ácaro *V. destructor* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers: F 5'-TACAAAGAGGGAAGAAGCAGCC-3' e R 5'-GCCCCTATTCTTAATACATAGTGAAAATG-3' descritos por Navajas et al. (2002). Realizamos a técnica de PCR utilizando 7 µl de água ultra-pura nuclease-free Ambion®, 1 µl de primer F e R, 10 µl de *SYBR Green*® e 1µl de DNA extraído de cada amostra. As reações de PCR foram realizadas em termociclador *Applied Biosystems Veriti*® com as seguintes condições: desnaturação inicial por 4 min a 92 ° C, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 92 ° C por 1 min, anelamento a 52 ° C por 1 min e 30 s e alongamento a 72 ° C por 1 min e 30 s. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com *SYBR Safe*® *Life Technologies*®, em cuba de eletroforese para géis de 96 poços. A visualização do gel foi feita por transluminador de luz azul Invitrogen® e as imagens foram capturadas por câmera digital de 10 mega pixels.

2.3.2 Determinação do haplótipo do ácaro e confirmação de espécie

Após comprovação da amplificação do fragmento desejado por eletroforese, à identificação dos haplótipos *J* e *K* do ácaro *V. destructor* foi realizada com base em produtos da digestão com enzimas de restrição, *XhoI* e *SacI*, descrita por Anderson e Fuchs (1998). Ambos os haplótipos têm sítio de clivagem para a enzima *XhoI*, mas apenas o padrão Japonês mostra clivagem pela enzima *SacI*. No entanto, torna-se

necessário o uso da enzima *XhoI* para confirmação da espécie, pois a espécie *Varroa jacobsoni*, não possui sítio de clivagem para essa enzima. Para cada enzima, efetuamos reações separadas, portanto, para cada amostra, realizamos duas reações, uma com a enzima *XhoI* e outra com a enzima *SacI*, ambas da empresa Promega®.

Em cada uma das reações utilizamos 12,5 µl de água ultra pura nuclease-free Ambion®, 2 µl de tampão 10x (J para *SacI* e D para *XhoI*), 0,2 µl de BSA 10x e 5 µl do resultado de PCR. Após homogeneização por pipetagem, adicionamos 0,3 µl (3U) de cada uma das respectivas enzimas de restrição. Após a adição da enzima, as amostras foram submetidas a 37°C em termociclador por 2 horas. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 2% corado com *SYBR Safe Life Technologies*®.

Conforme citado anteriormente, nos casos em que foram confirmadas as presenças de ambos os haplótipos na mesma colônia, ou seja, onde se visualizou a formação de três bandas na presença de *SacI*, para confirmar a veracidade do resultado, efetuamos mais duas reações por amostra e como prova final, extraímos individualmente o DNA de 10 fêmeas adultas do ácaro e sua respectiva prole de cada amostra para identificação individual por célula de cria.

2.4. Sequenciamento

Com base nos resultados das enzimas de restrição, resultados da PCR de cada haplótipo (*K* e *J*), foram sequenciados pela empresa de biotecnologia Helixxa®. As sequências foram editadas e organizadas pelo pacote de programas Lasergene®, posteriormente foram identificadas e comparadas com sequências de ambos haplótipos presentes no *genbank*® pela ferramenta BLAST® do NCBI (*National*

Center for Biotechnology Information). Como último passo, as sequências foram alinhadas entre si para comparação (Tabela 1, mais detalhes em Anexo 2).

2.5. Avaliação do perfil reprodutivo e infestação

Para obtenção da taxa reprodutiva e da taxa de infestação do ácaro, analisamos 100 células de cria por amostra de favo, identificando-se ácaros adultos e a prole (De Jong et al. 1982a). Com base nos dados obtidos, avaliamos o número total de fêmeas adultas por amostra, o número de células de cria infestadas (% total de células infestadas), o número de células infestadas com prole (% células infestadas com prole), o número de descendentes viáveis produzidos por fêmea adulta, além do potencial reprodutivo calculado pela seguinte fórmula:

$$\left(\frac{N^{\circ} \text{ de descendentes viáveis}}{N^{\circ} \text{ de fêmeas adultas}} \right)$$

Os descendentes deixam a célula de cria quando a abelha termina sua fase de desenvolvimento, contudo para que uma fêmea jovem sobreviva e produza descendentes, ela deve deixar a célula de cria na fase adulta já fecundada e com sua camada externa rígida e pigmentada (Fig. 1f) (Rosenkranz et al. 2010). Levando em consideração a idade das abelhas analisadas (pupas de olhos marrons) e o tempo que ainda lhe restava para terminar seu desenvolvimento, foi possível constatar os descendentes viáveis, no caso os indivíduos que se encontravam a partir da fase de deutoninfa (Fig. 1b) (Martin, 1994).

Em localidades onde os haplótipos *K* e *J* coexistem em uma mesma colônia, realizamos análises extras para comparar diferenças nos cinco parâmetros descritos acima. Em cada amostra positiva, para ambos os haplótipos, analisamos 10 células de cria infestadas, visando obter o potencial reprodutivo dos ácaros e verificar a

presença dos haplótipos na mesma célula de cria. Para mais detalhes consultar Anexo 2.

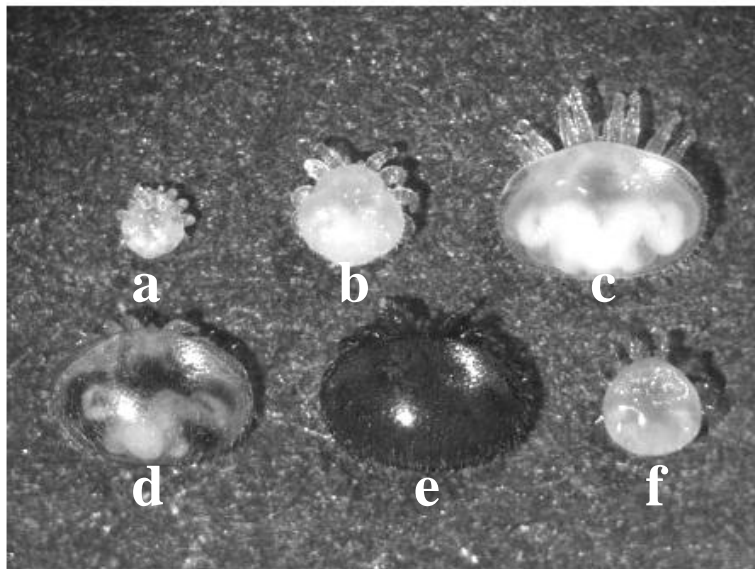


Figura 1: Fases de desenvolvimento do ácaro *V. destructor*: a=protoninfa, b=deutoninfa, c=deutocrisálida, d=fêmea jovem, e=fêmea adulta, f=macho. Foto: Rosenkranz, et al. (2010).

2.6. Estatística

Os resultados dos cinco parâmetros estudados foram submetidos ao teste de Análise de variância (ANOVA) para verificar diferenças significativas nos municípios analisados. Utilizamos os municípios como variável explicativa e os cinco parâmetros (% total de células infestadas, % de células infestadas com prole, total de adultos, descendentes viáveis e potencial reprodutivo) como resposta. Os dados referentes aos cinco parâmetros foram analisados com base do “Generalized Linear Model” (GLM) (Crawley, 2002), seguido por ANOVA ($\alpha < 0.05$). Nos casos de ambos haplótipos coexistindo na mesma colônia, realizamos o mesmo esquema descrito acima, contudo considerando o padrão de haplótipos como variável

explicativa e o potencial reprodutivo de cada ácaro como resposta. Todos os GLMs foram submetidos à análise de resíduos para avaliar a adequação da distribuição de erros (Crawley, 2002). Essas análises foram realizadas utilizando-se o Software Livre R (R Development Core Team, 2009).

3. RESULTADOS

3.1. Identificação genética

Amostras de DNA de três fêmeas adultas de cada uma das 154 amostras obtidas foram amplificadas por PCR, gerando fragmento de aproximadamente 376 pb (Fig. 2). Além destas, amostras de ácaros de Fernando de Noronha (Pernambuco, Brasil), Garuva (Espírito Santo, Brasil), Buenos Aires e Mar del Plata (Argentina) foram também utilizadas, totalizando 158 amostras e mais de 500 ácaros analisados (Tabela 2).

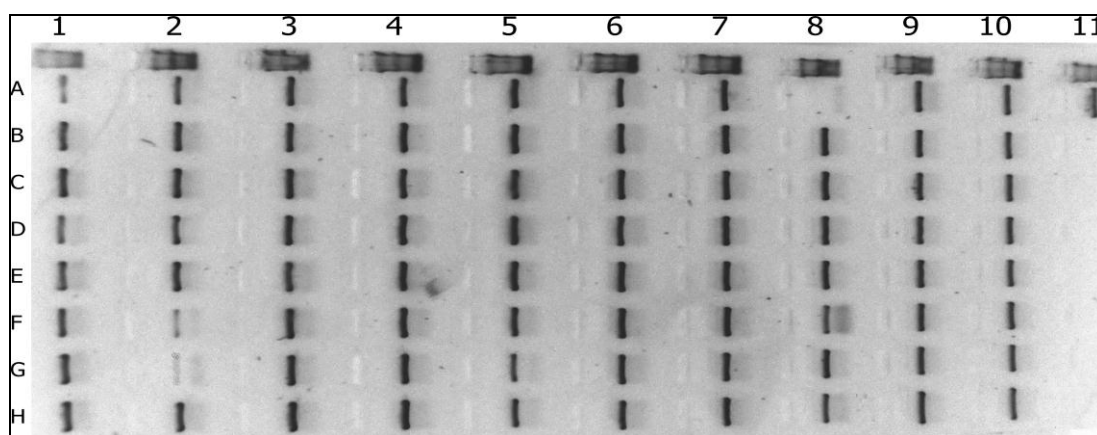


Figura 2: Gel de agarose a 2%, com 90 amostras de DNA mitocondrial do Gene COI amplificado. Após o PCR todas as amostras foram submetidas à eletroforese para verificar a amplificação da região desejada.

Os resultados de PCR de todas as amostras apresentaram sítio de clivagem (5' C/TCGAG 3') na presença da enzima *XhoI*, gerando fragmentos de aproximadamente ~150 e ~226pb, confirmando *V. destructor* (Fig. 3). Na presença da enzima *SacI*, 148 não apresentaram sítio de clivagem (5' GAGCT/C 3'), resultado que caracteriza ácaros do haplótipo *K* (Fig. 3). Das seis amostras que apresentaram clivagem, a amostra de Fernando de Noronha (PE), uma amostra de Bananal (SP) e uma amostra de Areais (SP) apresentaram dois fragmentos de aproximadamente 128/124 e 252/256 pb caracterizando ácaros do haplótipo *J*. As três amostras de Rio Claro (RJ) apresentaram três fragmentos, sendo o primeiro fragmento gerado pela reação de PCR (376 pb) e dois fragmentos do tamanho descrito acima (Fig. 3, 4, 5, 6), indicando a presença dos dois haplótipos nas colônias.

Para avaliar a veracidade dos resultados em Rio Claro (RJ), realizamos mais duas coletas em diferentes estações do ano, analisando os perfis genéticos individualmente em ácaros de 10 diferentes células de cria por amostra. Tais resultados comprovaram a presença de ambos haplótipos (*K e J*), muito embora não tenham sido encontrados ambos os haplótipos coexistindo em uma mesma célula de cria.

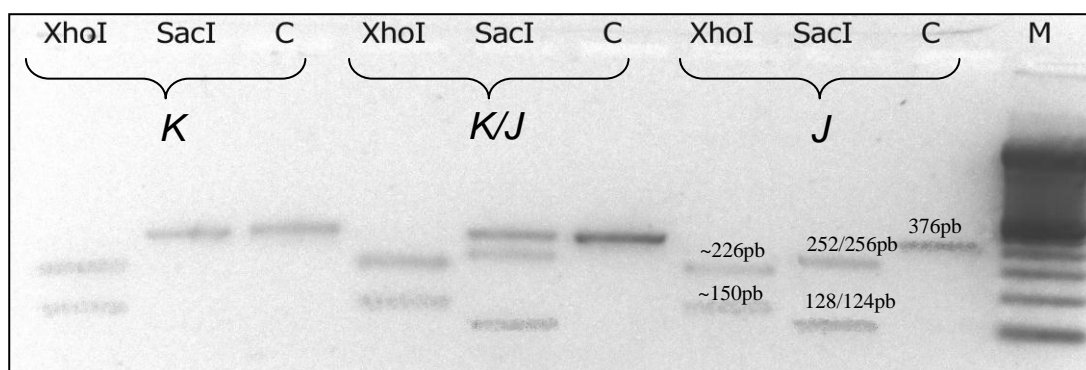


Figura 3: Resultados de enzimas de restrição da região COI do DNA mitocondrial de ácaros *V. destructor*. As chaves indicam os resultados de cada amostra. M= Marcador; C= Controle (Resultado de PCR sem adição de enzima); *SacI*= enzima de restrição com sítio de clivagem para *J*. *XhoI*= enzima de restrição com sítio de clivagem para ambos haplótipos de *V. destructor*. Gel de agarose 2% corado com SYBR® Safe, Life Technologies®.

Para confirmação da técnica de enzimas de restrição, amostras referentes a ácaros do haplótipo *K* e *J* foram sequenciadas. As sequências do tipo *K* foram idênticas à sequência previamente publicada do genoma mitocondrial completo do ácaro *Varroa* de Avignon, França (NCBI *accession number* AJ493124; Navajas et al. 2002), enquanto que as sequências do tipo *J* obtiveram 98% de identidade a sequência do haplótipo *J* de Taiwan e EUA (NCBI *accession number* AJ784872; Solignac et al. 2005). O alinhamento das sequências (*K* e *J*) demonstrou divergência de 12,7 e 10,9% respectivamente da espécie *V. jacobsoni* (NCBI *accession number* AF106909.1; Anderson e Truemann, 2000) e de 1,3% entre os alelos (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação de divergência entre sequências realizada por método Clustal W – Mega Align®.

	Haplótipo <i>K</i>	Haplótipo <i>J</i>	<i>V. jacobsoni</i>
Haplótipo <i>K</i>		1,3%	12,7%
Haplótipo <i>J</i>	1,3%		10,9%
<i>V. jacobsoni</i>	12,7%	10,9%	

3.2. Avaliação do perfil reprodutivo e infestação

Um total de 154 amostras, oriundas de 56 municípios pertencentes a 13 estados diferentes foram analisadas (Tabela 2). Houve diferenças significativas em relação aos municípios nos cinco parâmetros analisados: % total de células infestadas ($F_{52,92} = 2,2934$; $p < 0,001$); % células infestadas com prole ($F_{52,92} = 1,7609$; $p < 0,01$); total de fêmeas adultas ($F_{52,92} = 3,5539$; $p < 0,0001$); descendentes viáveis ($F_{52,92} = 2,5085$; $p < 0,0001$) e potencial reprodutivo ($F_{52,92} = 2,3475$; $p < 0,001$).

Contudo, não houve diferenças em relação ao potencial reprodutivo comparado ao padrão de haplótipos em colônias com ambos haplótipos do município de Rio Claro - RJ ($p > 0,05$), apresentando baixos níveis reprodutivos independente do perfil genético do ácaro.

Tabela 2: Média do número de fêmeas adultas, células de cria infestadas por amostra, número de células infestadas com prole, número de descendentes viáveis produzidos por fêmea adulta, potencial reprodutivo e perfil genético (haplótipo).

Município	Estado	N° de Amostras	Fêmeas adultas - total	Cels. Inf. - Total (%)	Cels. Inf. com Prol. (%)	Desc. Viáveis	P. Reprodutivo	Haplótipo
B. Aires	ARG	0£	-	-	-	-	-	K
M. D. Plata	ARG	0£	-	-	-	-	-	K
Salvador	BA	3	7,3±4	6,7±2,9	6,7±2,9	10±4,4	1,4±0,2	K
Fortaleza	CE	3	11±8,2	9,6±6	8±6	5,7±2	0,3±0,3	K
D. Martins	ES	1	6	6	2	0	0	K
Goiânia	GO	1	8	7	6	12	1,5	K
Maracaçumé	MA	3	10,3±14,4	9,3±12	6,7±9	5,7±6,2	0,7±0,3	K
Maranhãozinho	MA	3	8,6±5	8,7±5	8,7±5	13,7±8,5	1,5±0,2	K
Junco do MA.	MA	3	3,3±0,8	3,3±0,8	3±0	3±0	0,9±0,3	K
Muzambinho	MG	3	8±6	8±6	7±5,5	14,6±15,6	1,3±1,1	K
S.J. Evangelista	MG	3	2±2,6	2±2,6	1,7±2,9	0,7±1,2	0,1±0,2	K
Viçosa	MG	3	10,7±12	8,3±8	6,7±7,4	8,3±11	0,8±0,3	K
Guaraciaba	MG	3	7±4,4	6,7±3,8	6,3±3,2	7,3±4,2	1,1±0,4	K
Janaúba	MG	3	1,3±1,5	1,3±1,5	1,3±1,5	2±2	1,1±1	K
Bocaiuva	MG	3	1	1	1	2±2	0,3±0,6	K
R. Machados	MG	3	1,3±2,3	1,3±2,3	0,7±1,1	0	0	K
Sete Quedas	MS	1	21	19	17	24	1,1	K
Campo grande	MS	3	3±3,6	2,7±3	2,3±2,5	3,7±3,5	1±1	K
Sinop	MT	3	1,7±1,5	1,3±1,5	1,3±1,5	1±1	0,4±0,5	K
F. de Noronha	PE	0£	-	-	-	-	-	J

Irati	PR	3	19,6±13,2	15,3±9,2	3±2,6	4,7±4,5	0,3±0,4	K
Tamarana	PR	3	20±8	13,6±5,3	2,3±2,3	6,3±3,2	0,4±0,3	K
R. Claro	RJ	3	4,3±2,5	4,3±2,5	3,3±1,1	0,7±1,1	0,2±0,3	K/J**
S. Gabriel	RS	3	13,7±3,5	12,3±4	14±3,6	17±5,3	1,2±0,2	K
Balneário	SC	3	17±5,5	14±4,5	9,6±4	5,7±2	0,3±0,2	K
Bom retiro	SC	3	1,3±1,5	1±1	1±1	2±2,7	0,9±0,8	K
Caçador	SC	1	0,6±0,5	1	0,6±0,5	0	0	K
Criciúma	SC	3	6±1,7	5,6±1,5	5±1,7	5±1	0,9±0,5	K
Garuva	SC	0£	-	-	-	-	-	K
Florianópolis	SC	3	17,6±10	15±7	13±6,5	11,3±2,9	0,7±0,3	K
Itainópolis	SC	3	7,3±7,5	5±3,4	3±4,3	0	0	K
M. Costa	SC	3	5,6±4	5,3±3,5	4±4,3	4±4	0,9±1	K
Mafra	SC	1	1	1	1	1	1	K
Orleans	SC	3	0,3±0,5	0,33±0,55	0,3±0,5	0,3±0,6	0,3±0,6	K
Papanduva	SC	1	53	16	0	0	0	K
Rio negrinho	SC	3	4±0	3,5±0,7	1,5±0,7	1,5±2,1	0,4±0,5	K
São José	SC	3	5±4,2	5±4,2	3,5±2,1	2,5±0,7	0,7±0,4	K
Urupema	SC	2	0,5±0,71	0	0,5±0,71	0	0	K
Xanxerê	SC	3	3,3±5,7	3±5,1	3±5,1	1,3±2,3	0,1±0,2	K
Bocaina do sul	SC	3	2,7±1,2	2,7±1,2	0,7±1,2	0,3±0,6	0,1±0,1	K
Araras	SP	2	1±0	1	1	1,5±0,7	1,5±0,7	K
Areias	SP	3	10±6	9,3±5,5	2,3±3,2	3,7±6,3	0,3±0,5	K/J*
Bananal	SP	3	7±10,4	6,6±9,8	5,3±8,3	3,3±5,7	0,2±0,3	K/J*
Botucatu	SP	3	2,3±0,5	2±1	1±1	1±1,7	0,3±0,6	K
Corumbataí	SP	3	2,3±2,3	2,3±2,3	1,6±1,1	2±1	1,4±1,3	K
Cunha	SP	3	7,3±2,8	8,3±4	5,3±5,8	2,3±1,5	0,3±0,2	K
Descalvado	SP	3	4,3±5,8	3,3±4,9	0,6±0,1	0,7±1,1	0,1±0,1	K

Lagoinha	SP	3	5,6±3	4,6±2,5	3±2,6	1±1,7	0,1±0,2	<i>K</i>
M. Lobato	SP	3	10±4,5	9±4	4±3,6	4,7±4,1	0,5±0,5	<i>K</i>
Paraibuna	SP	3	9,6±8,3	9±7,2	3±4,3	3,3±5	0,2±0,2	<i>K</i>
Pindamonhangaba	SP	3	5±1	5±1	1,3±1,5	1±1,7	0,2±0,4	<i>K</i>
Pirassununga	SP	3	4,3±3,5	3,6±2,5	3±3	1,7±1,5	0,3±0,2	<i>K</i>
Redenção	SP	3	2,6±1,5	2,6±1,5	1±1,7	0	0	<i>K</i>
Rio claro	SP	3	5±0	4,6±0,5	3±1	4±1	0,8±0,2	<i>K</i>
S. F. Xavier	SP	3	6,3±2,9	5,3±2,5	4,3±2,5	2,3±1,5	0,4±0,1	<i>K</i>
S.L. Paraitinga	SP	3	5,3±3,8	5±3,4	4±2,6	2,3±2,3	0,6±0,4	<i>K</i>
S.J. Campos	SP	3	4,6±0,6	4,6±0,5	2,3±2,3	1±1	0,2±0,2	<i>K</i>
Taubaté	SP	3	3±0	3	1±1,7	0	0	<i>K</i>
Tremembé	SP	3	5,3±3,2	5±2,6	2,3±4	0,7±1,1	0,1±0,1	<i>K</i>
Ubatuba	SP	3	5±0	4,6±0,5	4,3±0,5	5,7±1,1	1,1±0,2	<i>K</i>

*K/J** = Ambos os haplótipos encontrados no mesmo município, no entanto em apiários/amostras diferentes.

*K/J*** = Ambos os haplótipos encontrados na mesma colônia/amostra.

£ = Não houve avaliações em favos de cria, somente avaliações genéticas a partir dos ácaros.

Análises de 100 células de cria por amostra.



Figura 4: Foto de satélite indicando os municípios analisados. Fonte: NASA 2012®, Google Inc.®.

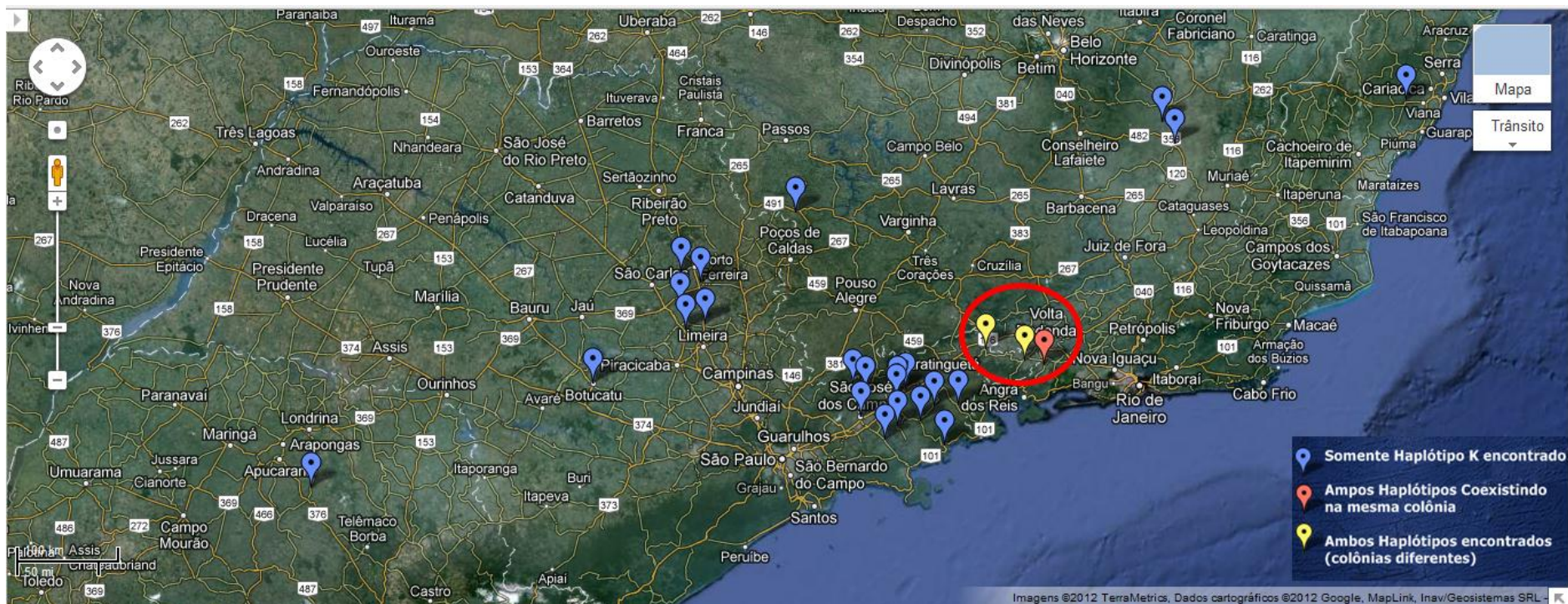


Figura 5: Foto de satélite dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, evidenciando a área de endemismo do haplótipo J. Fonte: NASA 2012®, Google Inc.®.

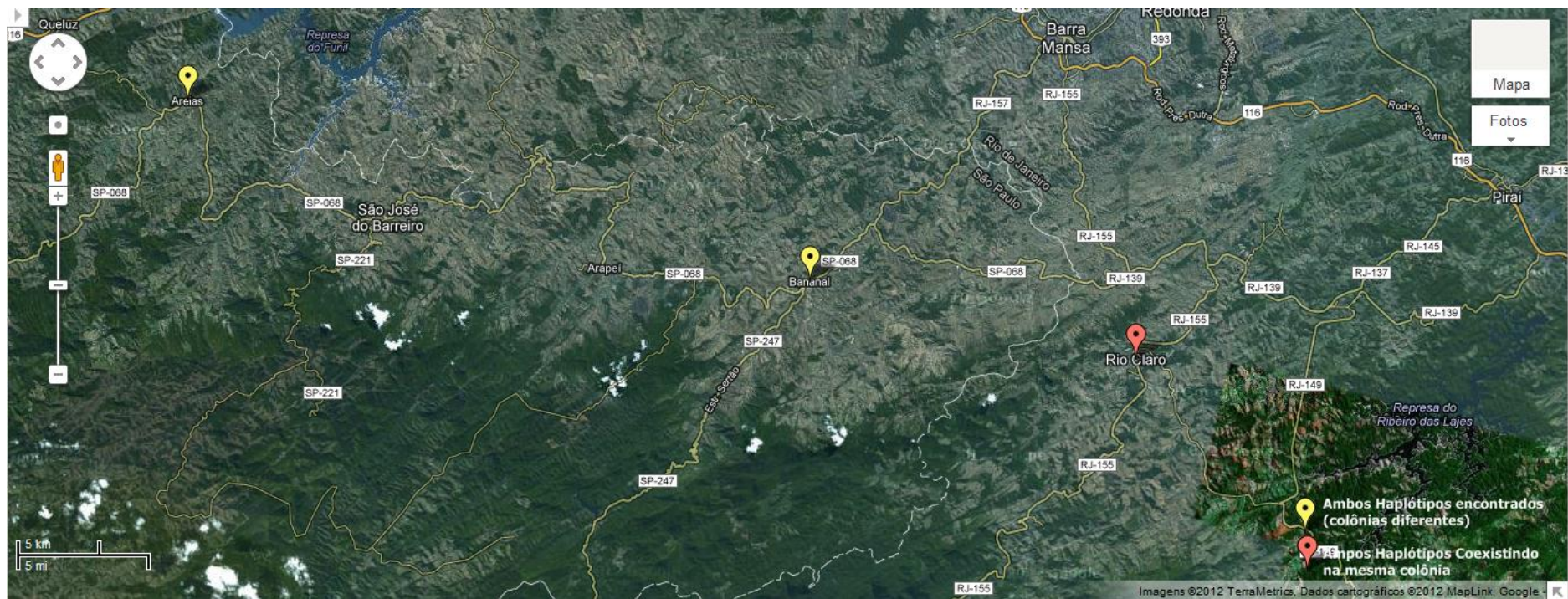


Figura 6: Foto de Satélite – região de endemismo do haplótipo *J*: divisa entre Vale do Paraíba, São Paulo e Sul Fluminense, Rio de Janeiro.
Fonte: NASA 2012®, Google Inc.®.

4. DISCUSSÃO

4.1. Identificação genética

A variação genética de *V. destructor* é amplamente estudada no mundo visando o entendimento da dinâmica de infestação e mapeamento dos diferentes genótipos do ácaro. Anderson e Truemann (2000), por meio análises genéticas e morfológicas avaliaram ácaros vindos de 38 países, fato que possibilitou dividi-los em duas espécies: *Varroa jacobsoni*, com nove haplótipos encontrados parasitando somente *A. cerana* e *Varroa destructor* com 18 haplótipos, mas somente dois haplótipos encontrados parasitando *A. mellifera* (*K* e *J*). De oito países do continente americano avaliados, somente amostras do Brasil apresentaram ambos haplótipos, contudo as amostras haviam sido coletadas na década de 90, possivelmente a mesma da entrada do haplótipo *K* no país. Aparentemente o haplótipo *J* foi o primeiro genótipo mitocondrial do ácaro na América do Sul, vindo através de rainhas de abelhas infestadas originalmente do Japão introduzidas no Paraguai e posteriormente do Paraguai para o Brasil nos anos 70 (De Jong e Gonçalves, 1998), contudo não há relatos de avaliações genéticas do ácaro no país no período de sua introdução, fato que dificulta as investigações de origem e situação atual do haplótipo em seu possível local de origem no continente.

Anteriormente acreditava-se que o genótipo mitocondrial predominante no Brasil seria o haplótipo *J*, geralmente presente em regiões onde não há problemas com o ácaro (Anderson e Truemann, 2000). Contudo, Garrido et al. (2003) ao analisarem ácaros provenientes do município de Ribeirão Preto – SP e Florianópolis – SC encontraram ambos haplótipos em amostras da década de 90 e somente o

haplótipo *K* em amostras mais atuais, indicando uma substituição e alta prevalência deste no país. Tais resultados foram reiterados por Strapazzon et al. (2009) que encontraram total prevalência do haplótipo *K* em 5 municípios de Santa Catarina, contudo os autores também encontraram predominantemente o haplótipo *J* em colônias da Ilha de Fernando de Noronha - PE.

Como outros autores, nossos resultados demonstram que a prevalência do haplótipo *K* é alta no País sendo o padrão genético amplamente predominante (Fig. 4). Em trabalho semelhante, Maggi et al. (2012) avaliaram o perfil genético do ácaro em 6 diferentes províncias da Argentina encontrando 100% de prevalência do haplótipo *K*. Os mesmo valores foram encontrados por Anderson e Truemann (2000) no Uruguai, enquanto que Solignac et al. (2005) obtiveram 97,8% no Chile e contrariamente aos resultados de outros países, somente 40% de prevalência do haplótipo *K* na Guiana Francesa. A presença do haplótipo *J* em algumas regiões pode estar relacionada principalmente a fatores de isolamento como barreiras geográficas, tipo de apicultura, manejo fornecido às colônias e padrão genético das abelhas.

Como exemplo, a total prevalência do haplótipo *J* em Fernando de Noronha pode ser explicada por dois fatores: i. - colônias de abelhas europeias foram levadas à ilha nos anos 70, momento inicial da infestação do ácaro na América do Sul; ii - devido ao isolamento geográfico e ausência de entrada de novas populações de abelhas e ácaros, o haplótipo conseguiu manter-se na população. Além do arquipélago, ácaros do haplótipo *J* foram encontrados em municípios de divisa entre o extremo leste do Vale do Paraíba – SP e Sul Fluminense – RJ (Fig. 5,6). Além da proximidade, tais municípios possuem condições climáticas e geográficas muito semelhantes além de fragmentos de Mata Atlântica em seus arredores, portanto essa região pode ser considerada uma área de endemismo para os remanescentes do que

se acredita ser o primeiro genótipo mitocondrial do ácaro a entrar em contato com as abelhas no Brasil.

No entanto, ácaros do haplótipo *K* também foram encontrados em apiários da região, e, em um dos casos nas mesmas colônias (Rio Claro – RJ, Fig. 6). Esse é o primeiro relato no continente americano de ambos haplótipos coexistindo na mesma colônia. A possibilidade de tal fato é discutida por Solignac et al. (2005), que enfatizam a coexistência de ambos haplótipos, contudo devido às vantagens reprodutivas do *K* e fatores de isolamento reprodutivo, ocorre uma forte tendência para a prevalência do *K* e desaparecimento do *J*. Tais autores relatam heterozigose entre os haplótipos, contudo enfatizam a baixa possibilidade de tal processo devido à necessidade de múltipla infestação na célula de cria para reprodução cruzada. Observamos em nosso trabalho a baixa frequência de infestações múltiplas nas células de cria, fator que pode ser explicado devido aos baixos níveis de infestação geralmente encontrados nas colônias. Após três coletas em diferentes estações e análises individuais para identificação genética, pudemos comprovar a presença de ambos haplótipos coexistindo nas três colônias, contudo não foram encontrados ambos haplótipos na mesma célula de cria (mais detalhes em Anexo 2). Tal fato pode ser explicado pela total ausência de múltiplas infestações nas amostras analisadas.

Os resultados obtidos nas localidades estudadas indicaram que, possivelmente, a tolerância das abelhas africanizadas no Brasil não está relacionada ao perfil genético do ácaro. Independente da maior capacidade reprodutiva do haplótipo *K*, o potencial reprodutivo e os níveis de infestação não foram relacionados com o padrão genético. O haplótipo *K* está amplamente distribuído em regiões com altas taxas de mortalidade pelo ácaro devido à sua capacidade adaptativa e reprodutiva em diferentes raças de *A. mellifera* (Rosenkranz et al. 2010). Enquanto

que o haplótipo *J* mesmo sendo capaz de parasitar *A. mellifera*, não possui a mesma capacidade e conseqüentemente torna-se mais restrito. No Brasil, o haplótipo *K* pode ser considerado cosmopolita, enquanto que o *J* restringe-se a pequenas populações isoladas ao redor do país.

4.1. Avaliação do perfil reprodutivo e infestação

Considerando a necessidade de crias operculadas para análise, nós realizamos a amostragem em períodos de produção de crias das colônias, períodos os quais geralmente com maior disponibilidade de alimento proteico (pólen) e crescimento populacional da colônia. Nessa fase, as fêmeas do ácaro saem do período forético e tendem a invadir as células de cria para procriação e conseqüentemente a manutenção de sua população nas colônias (Rosenkranz et al. 2010). Em países de clima temperado, que possuem as quatro estações bem definidas, tanto as abelhas como os ácaros aumentam suas populações na primavera/verão e no outono/inverno as abelhas diminuem a produção de crias e os ácaros mantêm-se em estado forético, alimentando-se principalmente de abelhas nutridoras (Martin, 2001a; Rosenkranz e Renz, 2003). Nessa fase, geralmente em colônias de abelhas europeias com altos níveis de infestação do ácaro, geralmente ocorre um grande enfraquecimento culminando em seu colapso (Amdam et al. 2004).

Em países de clima tropical/subtropical como o Brasil, a dinâmica de crescimento populacional de parasita e hospedeiro tende a ser diferente. Devido a temperaturas mais elevadas no outono/inverno e disponibilidade de alimento, as abelhas não cessam suas atividades (Rosenkranz et al. 2010). Portanto em regiões tropicais/subtropicais, o período de chuvas pode estar mais relacionado à dinâmica

de infestação do ácaro do que as estações propriamente ditas. Levando em consideração que cada região possui diferentes características pluviais, tais períodos influenciam na flora apícola, que por sua vez afeta a produção de crias e infestação do ácaro (Moretto et al. 1997; Pinto et al. 2011a).

Além dos fatores ambientais, a variação nos níveis de infestação entre os municípios pode ser explicada por fatores bióticos gerando diferenças entre os municípios analisados. Devido à hibridização da espécie *A. mellifera scutellata* com raças europeias, há uma grande variabilidade genética nas populações de abelhas no Brasil (Moretto et al. 1991; Collet et al. 2006) e conseqüentemente há fatores relacionados ao genótipo como comportamento higiênico e comportamento de *grooming* que também variam (Spivak, 1996; Ibrahim e Spivak, 2006; Guzman-Nova et al. 2012). Os níveis de infestação encontrados ($0,33 \pm 0,55\%$ a $15,3 \pm 9,2\%$) foram menores ao compará-los aos níveis de infestação entre 18 a 49% obtidos por Kanchev et al.(1987), 15 a 40% por Martin (1994) e 6 a 42% por Martin (2001b) analisando colônias de abelhas europeias sem tratamento com acaricidas na Bulgária, sul da Inglaterra e Reino Unido, respectivamente. Entretanto, valores mais próximos são encontrados ao comparar os resultados obtidos com trabalhos realizados em regiões com condições climáticas semelhantes. Avaliando os níveis de infestação na região da Zona da Mata Mineira, Bacha-Júnior et al. (2009) obtiveram valores entre 3,3 a 11% , enquanto que Pinto et al. (2011a) encontraram níveis de 1,1 a 11,6% na região do Vale do Ribeira (São Paulo – Brasil). Mesmo que os níveis de infestação encontrados em sua maioria possam ser considerados baixos, amostras oriundas do estado do Paraná, Maranhão, Santa Catarina e região do Vale do Paraíba – SP apresentaram valores altos, indicando possivelmente uma maior susceptibilidade ao

ácaro. Esse fator exalta a importância de avaliações periódicas nos níveis de infestação e seleção de colônias tolerantes ao ácaro.

Seguindo o mesmo preceito dos níveis de infestação, a taxa de células de cria infestadas com prole obteve variações entre os municípios. Tais valores refletem os níveis de infertilidade do ácaro, considerado importante na dinâmica da infestação e variável de acordo com uma série de fatores (Martin, 1994; Martin, 2004; Rosenkranz et al. 2010). Mondragon et al. (2006) ao compararem as taxas de mortalidade da prole de *V. destructor* em abelhas africanizadas no México observaram uma alta taxa de mortalidade principalmente na primeira prole (macho) e terceira (fêmea). Tais fatores contribuem para baixos níveis de descendentes produzidos e infertilidade. No entanto, segundo Carneiro et al. (2007), o número de fêmeas férteis tem aumentado gradativamente no Brasil. Em estudo realizado em Ribeirão Preto, SP, os autores observaram uma diminuição no nível de fêmeas inférteis de 64% nos anos 80 para 24% em 2005-2006. Garrido et al. (2003) observaram um aumento de 53 para 82% no nível de fêmeas férteis em abelhas africanizadas no país, enquanto que Strapazzon et al. (2009) encontraram níveis de fertilidade semelhantes (71%) no estado de Santa Catarina. Tais autores ao avaliarem o perfil genético dos ácaros constataram a predominância haplótipo *K*, fator que acreditaram ser um dos responsáveis pelo aumento dos níveis de fertilidade nos últimos anos.

No entanto, somente o aumento da fertilidade pode não ser suficiente para elevar os níveis de infestação do ácaro no Brasil. Mecanismos de defesa como o comportamento de *grooming* tende a aumentar, à medida que a quantidade de crias diminui e o número de ácaros foréticos aumenta (Junkes et al. 2007). Por sua vez, o aumento na mortalidade de fêmeas foréticas férteis afeta significativamente a

população de ácaros na colônia. Além do fator descrito acima, a viabilidade dos descendentes deve ser levado em consideração. A fêmea do ácaro deve estar fecundada e na fase adulta no momento da desoperculação da célula de cria, pois indivíduos jovens não possuem mecanismos adequados para se aderirem ao corpo das abelhas adultas e acabam sendo mortos por operárias (Calderón et al. 2010), devido a esse fato analisou-se somente pupas na fase de olhos escuros, pois avaliando o período de desenvolvimento atual da pupa e dos descendentes do ácaro presentes na célula de cria é possível mensurar quais fêmeas chegarão à fase adulta após a célula de cria ser aberta, conseqüentemente estas foram consideradas os descendentes viáveis. Nesse contexto, o potencial reprodutivo é calculado em relação ao número de descendentes viáveis (descendentes fêmeas que serão capazes de chegar à fase adulta) dividido pelo número de fêmeas adultas. Variações decimais desse fator podem refletir drasticamente no aumento ou diminuição populacional dos ácaros ao longo de poucas gerações em uma colônia (Milani et al. 2004; Calderón et al. 2010).

Em regiões com altos níveis de infestação, o potencial reprodutivo geralmente encontra-se acima de 1. Martin (1994) obteve a média de 1,45 em abelhas europeias na Inglaterra, enquanto que valores mais baixos foram encontrados em abelhas africanizadas no México (0,73) e Brasil (0,64, Ribeirão Preto – SP) (Medina e Martin, 1999; Corrêa-Marques, 2000). Em contrapartida, colônias selecionadas para comportamento higiênico tendem a diminuir drasticamente o potencial reprodutivo dos ácaros. Ibrahim e Spivak (2006) obtiveram valores de 0 a 0,33 em colônias de linhagem SMR (*Suppression Mite Reproduction*) e higiênicas respectivamente. O presente trabalho constatou variação no potencial reprodutivo do ácaro, inclusive com valores semelhantes aos encontrados por Martin (1994) em abelhas europeias.

Tal fato deve ser levado em consideração e medidas para seleção de colônias com alto comportamento higiênico, facilitado pela grande variabilidade genética das abelhas no Brasil podem evitar problemas futuros com o parasita.

Ectoparasitas como *V. destructor* que possuem tamanho consideravelmente grande em relação a seu hospedeiro e que atuam principalmente em períodos críticos da vida do inseto como no caso a metamorfose, podem gerar grandes impactos em seu desenvolvimento. Uma única fêmea adulta ao alimentar-se da hemolinfa do hospedeiro diminui em média 7% do peso corporal de uma operária (De Jong et al. 1982ab). Conseqüentemente, o déficit de nutrientes pode afetar diretamente na expectativa de vida, em estruturas internas e externas do hospedeiro (Amdam et al. 2004; De Jong et al. 1982ab). Além do nível individual, o efeito do parasitismo em estruturas essenciais como asas e glândulas podem gerar conseqüências para toda a colônia Pinto et al. (2011b) observaram diminuições de 11% em média na área celular de glândulas hipofaringeanas (estrutura responsável pela produção de geleia real) em abelhas parasitadas por uma única fêmea do ácaro.

Além do parasitismo, a interação com outros patógenos agravam os efeitos no *fitness* do hospedeiro. O ácaro *V. destructor* pode atuar como vetor de vírus como o IAPV, DWV, ABPV, KBV e SBV, considerados pouco problemáticos antes do contato do ácaro com *A mellifera*, no entanto tal interação tornou-se um dos maiores problemas para a apicultura contemporânea (Boecking e Genersch, 2008). O efeito sinérgico entre o parasitismo pelo ácaro e os vírus pode ser explicado pela ação imunossupressora em conjunto com a injeção direta das partículas virais na hemocele do hospedeiro, favorecendo a replicação e transmissão dos vírus (Yang e Cox-Foxter, 2007; Rosenkranz et al. 2010). Posteriormente, devido à diminuição da população de abelhas, disfunções como a perda de comportamentos sociais coordenados, como o

comportamento higiênico, colaboram para aumento nos níveis de infestação de ácaros e conseqüentemente aumentam as chances de colapso (Rosenkranz et al. 2010). No Brasil, embora boa parte dos vírus estejam amplamente presentes (Teixeira et al. 2008ab), os baixos níveis de infestação do parasita aliados ao comportamento higiênico, geralmente elevado, possivelmente previnem as colônias de graves problemas com vírus. Diante esse fato, novamente deve-se ressaltar a importância do monitoramento e medidas adequadas para o controle de *V. destructor*.

Uma das práticas para o controle do ácaro amplamente utilizada na Argentina, EUA e Europa é o controle químico (Rosenkranz et al. 2010). O uso de acaricidas para o controle de *V. destructor* possui uma série de problemas, tanto para a colônia, quanto para os produtos apícolas (Lodesani et al. 2008). Tais substâncias geram resíduos na cera e mel que em conjunto com superdosagens e aplicações preventivas desnecessárias facilitam a aquisição de resistência simples e cruzada, além de efeitos subletais em *A. mellifera*. Efeitos fisiológicos, tanto em abelhas como em ácaros, foram observados frente à aplicação de Tau-Fluvalinato, o qual aumentou os níveis de infestação do vírus DWV em crias parasitadas (Locke et al. 2012). Além desta, as substâncias Coumafós, Timol e Amitraz usadas para o controle do ácaro, demonstraram efeitos diretos na expressão gênica no sistema de defesa de abelhas, podendo comprometer a saúde das colônias aumentando sua susceptibilidade a patógenos (Boncristiani et al. 2012). Em regiões com níveis de infestações relativamente baixos e sem registros de mortalidade de colônias por *V. destructor*, como o Brasil, o uso dessas substâncias químicas potencialmente problemáticas deve ser descartado visando soluções que não afetem negativamente nem os produtos da colônia nem as abelhas.

5. CONCLUSÕES

No Brasil há diversidade da dinâmica de infestação do ácaro *Varroa destructor* em diferentes regiões, devido à sua dimensão geográfica e às variações climáticas e ambientais, associados à variabilidade genética das abelhas africanizadas. Contudo, considerando as amostras analisadas nas localidades estudadas, os resultados indicaram níveis de infestação relativamente baixos comparados aos de países de clima temperado, os quais sofrem com altos níveis de infestação do ácaro, o que os leva ao uso de acaricidas. Devido aos diversos riscos, o uso de tais substâncias deve ser evitado em território brasileiro e medidas como o monitoramento de colônias com avaliações periódicas e seleção de rainhas (colônias) para comportamento higiênico devem ser aplicadas visando à manutenção da tolerância ao ácaro no país.

Nas localidades estudadas, as variações da dinâmica de infestação não foram relacionadas ao padrão genético dos ácaros. A alta prevalência e variação no potencial reprodutivo do haplótipo *K*, considerado mais problemático, indica que tal fator não possui grande influência na dinâmica de infestação de *V. destructor* em abelhas africanizadas no Brasil. Em contrapartida, mesmo comprovando a presença do haplótipo *J* com possível endemismo na região de divisa entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, além de sua total predominância em Fernando de Noronha - PE, sua baixa ocorrência indica o impacto após a entrada do haplótipo *K* no país, que por sua vez, espalhou-se rapidamente tornando-se o padrão genético predominante do ácaro no país.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amdam GV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW (2004) Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J Econ Entomol* 97:741–747
- Anderson DL, Fuchs S (1998) Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. *J Apic Res* 37(2):69–78
- Anderson DL, Trueman JWH (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp Appl Acarol* 24:165–189
- Bacha Júnior GL, Felipe-Silva AS, Pereira PLL (2009) Taxa de infestação por ácaro *Varroa destructor* em apiários sob georreferenciamento. *Arq Bras Med Vet Zoot* 61(6):1471–1473
- Bailey L, Ball BV (1991) Honey bee pathology, Second edn. Academic Press, London, UK, p 193
- Boecking O, Genersch E (2008) Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping. *J Verbr Lebens* 3(2):221–228
- Boncristiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J, vanEngelsdorp D (2012) Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *J Ins Phys* 58:613–620
- Bromenshenk JJ, Henderson CB, Wick CH, Stanford MF, Zulich AW, Jabbour RE, Deshpande SV, McCubbin PE, Seccomb RA, Welch PM, Williams T, Firth DR, Skowronski E, Lehmann MM, Bilimoria SL, Gress J, Wanner KW,

- Cramer Jr RA (2010) Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline PlosOne 5(10):e13181
- Calderón RA, van Veen JW, Sommeijer MJ, Sanchez LA (2010) Reproductive Biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*) Exp Appl Acarol 50:281–287
- Carneiro F, Torres R, Strapazzon R, Ramirez S, Guerra J, Kolling D, Moretto G (2007) Changes in the reproductive ability of the mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in Southern Brazil. Neotrop Entomol 36:949–952
- Crawley MJ (2002) Statistical computing – an introduction to data analysis using s-plus. John Wiley & Sons, London, UK. pp 761
- Chen YP, Siede R (2007) Honey bee viruses. Adv Virus Res 70:33–80
- Collet T, Ferreira KM, Arias MC, Soares AEE, Del Lama MA (2006) Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns. Heredity 97:329–335
- Corrêa-Marques MH, Sucesso reprodutivo do ácaro *Varroa jacobsoni* em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) (2000). In: VI Encontro de Abelhas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, pp. 22–28
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan P, Briese T, Horning M, Geiser DM, Martinson V, van Engelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, van Lipkin W (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science 318:283–287

- De Jong D (1996) Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. *Bee World* 77:67–70
- De Jong D, Morse RA, Eickwort GC (1982a) Mite pests of honey bees. *Ann Rev Entomol* 27:229–252
- De Jong D, De Jong PH, Gonçalves LS (1982b) Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*. *J Apicult Res* 21:165–216
- De Jong D, Gonçalves LS (1981) The The Varroa problem in Brazil. *Am Bee J* 121:186–89
- De Jong D, Gonçalves LS (1998) The Africanized bees of Brazil have become tolerant to Varroa. *Apiacta* 33(3):67–70
- Ellis JD, Munn P (2005) The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86:88–101
- Embrapa Gato de Leite (2009) Manual de Laboratório: Procedimentos Técnicos, LGM-E-01, Juiz de Fora, Brasil, p 65
- Fries I, Martín R, Meana A, García-Palencia P, Higes M (1996) *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of microsporidian parasite of the Asian honey bees *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol* 32:356–365
- Garrido C, Rosenkranz P, Paxton RJ, Gonçalves LS (2003) Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie* 34:535–541
- Guzman-Novoa E, Emsen B, Unger P, Espinosa-Montaña LG, Petukhova T (*inpress*). Genotypic variability and relationships between mite infestation levels, mite damage, grooming intensity, and removal of *Varroa destructor*

- mites in selected strains of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). J Invertebr Pathol
- Harbo JR, Harris JW (2009) Responses to varroa by honey bees with different levels of varroa sensitive hygiene. J Apic Res 48:156–161
- Ibrahim A, Spivak M (2006) The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. Apidologie 37:31–40
- Junkes L, Guerra-Jr. JCV, Moretto G (2007) *Varroa destructor* mite mortality rate according to the amount of worker broods in africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Acta Sci. Biol. Sci. 29(3):305–308
- Kanchev B, Gurgulova K, Stoimenov V (1989) Defective bee and varoatosis. International Congress of Apiculture (ed) Program and abstract reports. Rio de Janeiro, pp 145–146
- Locke B, Forsgren E, Fries I, de Miranda JR (2012) Acaricide Treatment Affects Viral Dynamics in *Varroa destructor*-Infested Honey Bee Colonies via both Host Physiology and Mite Control. App Env Microbiol 78(1):227–235
- Lodesani M, Costa C, Serra G, Colombo R, Sabatini AG (2008) Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. Apidologie 39(3):324–333
- Maggi M, Medici S, Quintana S, Ruffinengo S, Marcángeli J, Martinez PG, Fuselli S, Eguaras M (2012) Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. Exp Appl Acarol 56:309–318
- Martin SJ (1994) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. Exp Appl Acarol 18:87–100

- Martin SJ (2001a) The role of varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modeling approach. *J Appl Ecol* 38:1082–1093
- Martin SJ (2001b) *Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK. *Exp Appl Acarol* 25:321–325.
- Martin SJ, Medina L (2004) Africanized honeybees have unique tolerance to varroa mites. *Trends Parasitol* 20:112–114
- Medina L, Martin SJ (1999) A comparative study of *Varroa jacobsoni* reproduction in worker cells of honeybees (*Apis mellifera*) in England and Africanized bees in Yucatan, Mexico. *Exp Appl Acarol* 23:659–667
- Message D, Gonçalves LS (1995) Effect of the size of worker brood cells of Africanized honey bees on infestation and reproduction of the ectoparasite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 26(5):381–386
- Milani N, Vedova G, Nazzi F (2004) (Z)-8-Heptadecene reduces the reproduction of *Varroa destructor* in brood cells. *Apidologie* 35:265–273
- Mondragon L, Martin S, Vandame R (2006). Mortality of mite offspring: a major component of *Varroa destructor* resistance in a population of Africanized bees. *Apidologie* 37:67–74
- Moretto G, Gonçalves LS, De Jong D (1997) Relationship between food availability and the reproductive ability of the mite *Varroa jacobsoni* in Africanized bee colonies *Am Bee J* 137:67–69
- Moretto G, Gonçalves LS, De Jong D, Bichuette MZ (1991) The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. infestations in Brazil. *Apidologie* 22(3):197–203
- Navajas M, Solignac M, Le Conte Y, Cros-Arteil S, Cornuet JM (2002) The complete sequence of the mitochondrial genome of the honey-bee

- ectoparasite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). *Mol Biol Evol* 19: 2313–2317
- Neumann P, Carreck NL (2010) Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49(1):1–6
- Peng YS, Fang Y, Xu S, Ge L (1987) The resistance mechanism of the Asian honey bee *Apis cerana* Fabr. to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J Invertebr Pathol* 49:54–60
- Perosa JMY, Arauco EMR, Santos MLA, Albarracín VN (2004) Parâmetros de competitividade do mel brasileiro. *Inf Econ* 34(3):41–48
- Pinto FA, Puker A, Message M, Barreto LMRC (2011a) *Varroa destructor* in Jquitiba, Vale do Ribeira, Southeastern Brazil: Seasonal Effects on the Infestation Rate of Ectoparasitic Mites in Honeybees. *Sociobiology* 57:511–518
- Pinto FA, Souza GK, Sanches MA, Serrão JE (2011b) Parasitic Effects of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) on Hypopharyngeal Glands of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 58:769–778
- R Development Core Team (2009) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL. <http://www.R-project.org>
- Rosenkranz P (1999) Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie* 30(2-3):159–172
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* 103:S96–S119

- Rosenkranz P, Renz M (2003) *Varroa destructor* infestation of adult bees, worker brood and drone brood during the season and consequences for treatment concepts. *Apidologie* 34:509–510
- Serviço Brasileiro às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) (2011) Exportações de mel têm crescimento de 38% em fevereiro. Rio de Janeiro: Reginaldo Rezende. <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobreapicultura/mercado/exportações>
- Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D, Le Conte Y, Anderson D, Evans J, Cros Arteil S, Navajas M (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honey bee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proc R Soc* 272:411–419
- Spivak M (1996) Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 27:245–260
- Strapazzon R, Carneiro FE, Guerra JCV, Moretto G (2009) Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genet Mol Res* 8(3):990–997
- Teixeira EW, Chen Y, Message D, Pettis J, Evans JD (2008a) Virus infections in Brazilian honey bees. *J Invertebr Pathol* 99:117–119
- Teixeira EW, Message D, Chen Y, Pettis J, Evans JD (2008b) First metagenomic analysis of microorganisms in honey bees from Brazil. *B Industr anim N*. 65(4):355–361
- Yang X, Cox-Foster D (2007) Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* 134:405–412

ANEXOS

Untitled
 Alignment Report of 'Untitled' - ClustalW (Slow/Accurate, IUB) : tera-feira, 3 de julho de 2012 11:30

```

  T T A C A A A G A G G G A A G A A G C A Majority
  -----+-----
                    10                    20
  -----+-----
  1 T T A C A A A G A G G G A A G A A G C A VARROA HAPLÓTIPO J
  1 T T A C A A A G A G G G A A G A A G C A VARROA HAPLÓTIPO K

  G C C T T T T G G A A A T T T A G G G A Majority
  -----+-----
                    30                    40
  -----+-----
  21 G C C T T T T G G A A A T T T A G G G A VARROA HAPLÓTIPO J
  21 G C C T T T T G G A A A T T T A G G G A VARROA HAPLÓTIPO K

  T A A T T T A C G G G C T A T A A T A A Majority
  -----+-----
                    50                    60
  -----+-----
  41 T A A T T T A C G G G C T A T A A T A A VARROA HAPLÓTIPO J
  41 T A A T T T A C G - - C T A T A A T A A VARROA HAPLÓTIPO K

  C T A C T A A T C G G T A T T T T A G G Majority
  -----+-----
                    70                    80
  -----+-----
  61 C T A - - - T C G G T A T T T T A G G VARROA HAPLÓTIPO J
  59 C T A C T A A T C G G T A T T T T A G G VARROA HAPLÓTIPO K

  T T T T A T T G T A T G G G C T C A T C Majority
  -----+-----
                    90                    100
  -----+-----
  77 T T T T A T T G T A T G A G C T C A T C VARROA HAPLÓTIPO J
  79 T T T T A T T G T A T G G G C T C A T C VARROA HAPLÓTIPO K

  A T A T A T T T A C A G T A G G A A T A Majority
  -----+-----
                    110                   120
  -----+-----
  97 A T A T A T T T A C A G T A G G A A T A VARROA HAPLÓTIPO J
  99 A T A T A T T T A C A G T A G G A A T A VARROA HAPLÓTIPO K

  G A T A T T G A T A C T C G A G C A T A Majority
  -----+-----
                    130                   140
  -----+-----
  117 G A T A T T G A T A C T C G A G C A T A VARROA HAPLÓTIPO J
  119 G A T A T T G A T A C T C G A G C A T A VARROA HAPLÓTIPO K

  T T T T A C T G C A G C T A C A A T A A Majority
  -----+-----
                    150                   160
  -----+-----
  137 T T T T A C T G C A G C T A C A A T A A VARROA HAPLÓTIPO J
  139 T T T T A C T G C A G C T A C A A T A A VARROA HAPLÓTIPO K

  T T A T T G C G G T T C C T T A C T G G Majority
  -----+-----
                    170                   180
  -----+-----
  157 T T A T T G C G G T T C C T - A C T G G VARROA HAPLÓTIPO J
  159 T T A T T G C G G T T C C T T A C T G G VARROA HAPLÓTIPO K

  T G T A A T T A A A A T T T T T C T T Majority
  -----+-----
                    190                   200
  -----+-----
  176 T - - - A T T A A A A T T T T T C T T VARROA HAPLÓTIPO J
  179 G G T A A T T A A A A A A A A T C T T VARROA HAPLÓTIPO K

  G A T T A G C A A C A A T T C A T G G T Majority
  -----+-----
                    +-----
  
```

Página 1

	210	220	Untitled
193	G A T T A G C A A C A A T T C A T G G T		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
199	G A T T A G C A A C A A T T C A T G G T		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	T C T A T A G T T A A A T T A G A T G T		Majority
	230	240	
213	T C T A T A G T T A A A T T A G A T G T		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
219	T C T A T A G T T A A A T T A G A T G T		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	C C C G A T A A T T T G A T C T T T A G		Majority
	250	260	
233	C C C G A T A A T T T G A T C T T T A G		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
239	Y C C G A T A A T T T G A T C T T T A G		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	G T T T T A T T T T T T A T T T A C T		Majority
	270	280	
253	G T T T T A T T T T T T A T T T A C T		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
259	G T T T T A T T T T T T A T T T A C T		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	T G T A G G G G T A T T A C T G G T G		Majority
	290	300	
273	T G T A G G G G T A T T A C T G G T G		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
279	T - T A G G G G T A T T A C T G G T G		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	T A A T T T T A G C T A A T T C T T C T		Majority
	310	320	
293	T A A T T T T A G C T A A T T C T T C T		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
298	T A A T T T T A G C T A A T T C T T C T		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	T A T T G A T A A T T G T T T T A C C		Majority
	330	340	
313	T A T T G A T A A T T G T T T T A C C		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
318	- A T T G A T A - T T G T T T T A - - C		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	A T G A T A C T T A T T A T G G C C C C		Majority
	350	360	
333	A T G A T A C T T A T T A T G G C C C C		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
334	A T G A T A C T - - T - - - G C C C C		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	T A T T C T T A A T A C A T A G T G A A		Majority
	370	380	
353	T A T T C T T A A T A C A T A G T G A A		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
348	T A T T C T T A A T A C A T A G T G A A		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq
	A A T G		Majority

373	A A T G		VARROA J MODIFICADO Contig 1.seq
368	A A T G		VARROA K MODIFICADO Contig 1.seq

Anexo 1: Alinhamento das sequencias obtidas de ácaros do haplótipo *J* e *K* demonstrando o sítio de clivagem das enzimas *SacI* para *J* e *XhoI* para ambos haplótipos

Anexo 2: Resultado referente a análise individual de enzimas de restrição em 30 ácaros das 3 colônias remanescentes do apiário de Rio Claro – RJ. Segue Abaixo o mapa da análise e a foto do gel.

C	C	C	C	<i>SacI</i>	<i>SacI</i>	<i>SacI</i>	<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	<i>XhoI</i>	<i>XhoI</i>	<i>XhoI</i>
1 A	9 A	7 B	5 C	1 A	9 A	7 B	5 C	1 A	9 A	7 B	5 C
2 A	10 A	8 B	6 C	2 A	10 A	8 B	6 C	2 A	10 A	8 B	6 C
3 A	1 B	9 B	7 C	3 A	1 B	9 B	7 C	3 A	1 B	9 B	7 C
4 A	2 B	10 B	8 C	4 A	2 B	10 B	8 C	4 A	2 B	10 B	8 C
5 A	3 B	1 C	9 C	5 A	3 B	1 C	9 C	5 A	3 B	1 C	9 C
6 A	4 B	2 C	10 C	6 A	4 B	2 C	10 C	6 A	4 B	2 C	10 C
7 A	5 B	3 C	C -	7 A	5 B	3 C	C -	7 A	5 B	3 C	C -
8 A	6 B	4 C	---	8 A	6 B	4 C	---	8 A	6 B	4 C	---

Em Azul: Haplótipo K

Em vermelho: Haplótipo J

C = Resultados de PCR sem adição de enzimas de restrição

SacI = Somente o haplótipo J possui sítio de clivagem para esta enzima, portanto a não clivagem na presença da enzima identifica ácaros do haplótipo K.

XhoI = Ambos haplótipos possuem sítio de clivagem para esta enzima, contudo outras espécies como *V. jacobsoni* não. Utilizada para identificação em nível de espécie.

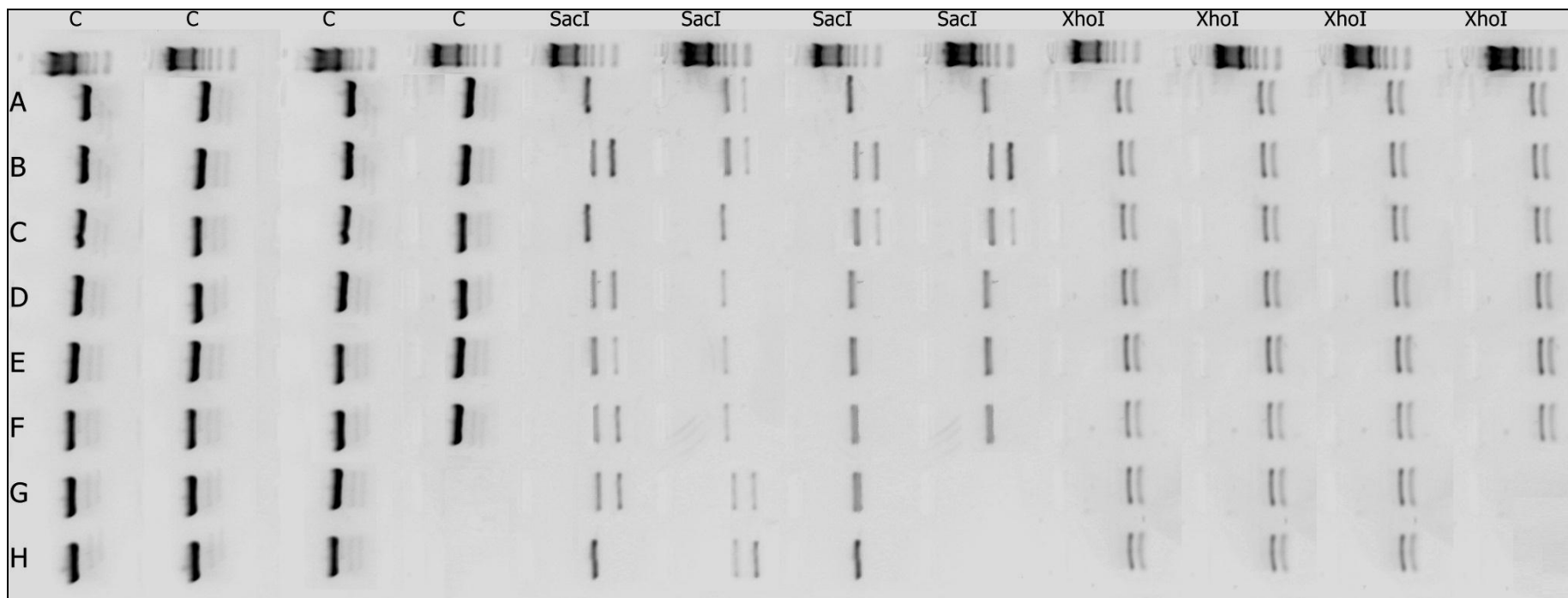


Figura: Gel com resultados de PCR e enzimas de restrição das amostras de Rio Claro – RJ. Pôde-se constatar que ambos haplótipos coexistem nas 3 colônias, contudo não foram encontradas infestação múltiplas em células de cria. Tal fato pode ser explicado pela **total ausência de múltiplas infestações** nas amostras analisadas. **não houve diferenças significativas em relação ao potencial reprodutivo** e em outros fatores relacionados a taxa de infestação entre os haplótipos.