

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EDEGAR KRÜGER**

**OCORRÊNCIA DE *Nosema ceranae*, *Nosema apis* E DE *Varroa destructor* EM  
ABELHAS AFRICANIZADAS: CARACTERÍSTICAS DE TOLERÂNCIA E  
PRODUTIVIDADE DAS COLÔNIAS  
(OCCURRENCE OF *Nosema ceranae*, *Nosema apis* AND *Varroa destructor* IN  
AFRICANIZED HONEYBEES: FEATURES OF TOLERANCE AND PRODUCTIVITY  
OF THE COLONY)**

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS  
2015**

**EDEGAR KRÜGER**

**OCORRÊNCIA DE *Nosema ceranae*, *Nosema apis* E DE *Varroa destructor* EM  
ABELHAS AFRICANIZADAS: CARACTERÍSTICAS DE TOLERÂNCIA E  
PRODUTIVIDADE DAS COLÔNIAS**

**(OCCURRENCE OF *Nosema ceranae*, *Nosema apis* AND *Varroa destructor* IN  
AFRICANIZED HONEYBEES: FEATURES OF TOLERANCE AND PRODUCTIVITY  
OF THE COLONY)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, área de concentração: Saúde, Tecnologia e  
Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina  
Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira

Co orientador: Prof. Dr. Adhemar Pegoraro

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2015**

**EDEGAR KRÜGER**

**OCORRÊNCIA DE *Nosema ceranae*, *Nosema apis* E DE *Varroa destructor* EM  
ABELHAS AFRICANIZADAS: CARACTERÍSTICAS DE TOLERÂNCIA E  
PRODUTIVIDADE DAS COLÔNIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração: Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Professor 1 (Titulação e nome completo)

Instituição 1

---

Professor 2 (Titulação e nome completo)

Instituição 2

---

Professor 3 (Titulação e nome completo)

Instituição 3

São José dos Pinhais \_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015

AGRADECIMENTOS .....	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	ix
RESUMO GERAL.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xv
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO II	
REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 INTRODUÇÃO .....	5
2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE PERDA DE COLÔNIAS.....	6
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Nosema</i> spp. (MICROSPORIDIA).....	9
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Varroa</i> .....	11
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE ABELHAS AFRICANIZADAS.....	13
CAPÍTULO III	
ARTIGO CIENTÍFICO (Resumo).....	15
3.1 INTRODUÇÃO.....	17
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.2.1 Delineamento experimental.....	18
3.2.2 Avaliação das perdas de colônias.....	20
3.2.3 Coleta de amostras de abelhas operárias e determinação da infecção por <i>Nosema</i> .....	20
3.2.3.1 Contagem de esporos de <i>Nosema</i> spp. ....	21
3.2.3.2 Número de abelhas com esporos de <i>Nosema</i> .....	24
3.2.4 Determinação da taxa de infestação por <i>varroa</i> e o percentual de operárias transportando pólen nas corbículas.....	25
3.2.5 Análise histopatológica.....	26
3.2.6 Determinação da espécie de <i>Nosema</i> via genotipagem.....	27

3.2.7 Avaliação da produção de mel nas colmeias.....	30
3.2.8 Análise estatística.....	31
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.3.1 Perda de colônias.....	32
3.3.2 Achados laboratoriais.....	32
3.3.3 Produção de mel.....	43
3.3.4 Taxa de infestação forética por <i>Varroa destructor</i> em operárias forrageiras.....	44
3.3.5 Chegada de pólen na colmeia.....	45
3.3.6 Correlação entre esporos de <i>Nosema</i> , <i>Varroa</i> e pólen.....	46
3.3.7 Discussão geral.....	48
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>APÊNDICES E ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## Dedicatória

Esta dissertação é dedicada a todas as pessoas que me apoiaram durante todo período de estudo e de pesquisa, em especial à minha esposa e companheira Maria Claudia, ao meu filho João Gabriel, e à eterna memória ao meu falecido avô Carl Paul Herman Krüger que me conduziu a lidar com abelhas desde a minha infância, e que com certeza me assiste nesta jornada, que descanse em paz. Também registro o meu reconhecimento às amadas abelhas, que com resiliência partiram envolvidas neste projeto para o bem da maioria e do próximo. Que Deus perdoe a todos nós.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Humberto M.F. Madeira, que mesmo com todas as suas atribuições, ofereceu a atenção e entusiasmo no desenvolvimento deste estudo, além do incondicional apoio e conhecimento na área pesquisada.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Adhemar Pegoraro, que da mesma forma abraçou a participação direta nos estudos de campo, cuja profícua experiência levará à continuidade de estudos e trabalhos relacionados à vida e à saúde das abelhas.

Agradeço aos estudantes estagiários da UFPR que mesmo durante os finais de semana, dispuseram esforços e interesse em participar nas atividades de campo. Da mesma forma aos colegas de mestrado Rafael Pinto e a laboratorista Marlise Teresinha Mauerwerk pela eterna e constante participação e troca de experiência durante o período de estudo.

Agradeço especialmente aos apicultores que de maneira feliz e prospectiva entenderam e participaram do estudo, cedendo suas estruturas, alterando rotinas e atividades profissionais e tornando o trabalho leve e, principalmente racional e menos custoso. A pesquisa brasileira agradece e precisa dos seus exemplos.

Por fim, meu agradecimento à Instituição Ministério da Agricultura (MAPA) pela oportunidade oferecida em poder compartilhar trabalho e aprendizado na área de saúde animal, os insetos. E também à APTA de Pindamonhangaba SP pelo fornecimento de material como o DNA para o controle positivo, técnicas laboratoriais e demais aprendizados utilizados no meu estudo.

Nada se assemelha à alma como a abelha.  
Esta voa de flor para flor, aquela de estrela  
para estrela. A abelha traz o mel, como a  
alma traz a luz.

(Victor Hugo, 1802-1885.

## FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral que inclui a importância econômica das abelhas e da apicultura, a situação da apicultura no Brasil e no Estado do Paraná, a justificativa e os objetivos desta dissertação.

O capítulo 2 traz a revisão de literatura sobre os principais itens do estudo e versa sobre as abelhas africanizadas no Brasil, sobre os Microsporídios e sobre a perda de colônias de abelhas *Apis mellifera*.

O capítulo 3 apresenta um artigo em estágio de publicação em periódico científico.

No capítulo 4 constam conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e com sugestões para aplicação para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

As abelhas *Apis mellifera* são importantes animais domésticos da cadeia produtiva de alimentos, de produtos terapêuticos e fundamentais no processo de polinização de angiospermas, sendo responsáveis, direta ou indiretamente, pela produção de dois terços dos alimentos que consumimos. Após o episódio da CCD (*colony collapse disorder*) em 2006, o mundo tem sido alertado sobre o risco da diminuição ou mesmo o desaparecimento de insetos polinizadores. Estudos e monitoramentos implantados por vários países demonstram que a perda de colônias durante o outono e inverno tem sido a principal causa relacionada à diminuição de abelhas melíferas que ocorrem em regiões de clima temperado. A participação de patógenos como o parasita *Varroa destructor*, microsporídios, vírus, fatores nutricionais, manejo de colmeias e o uso de agrotóxicos são apontados como fatores envolvidos no complexo sistema perda de colônias. A nosemose, causada por *Nosema apis* e, mais recentemente, por *Nosema ceranae*, é reconhecida como doença de abelhas *Apis mellifera* da linhagem europeia (*European honeybee* - EHB). No Brasil, a apicultura está fundamentada em abelhas africanizadas (*africanized honeybee* - AHB) e estudos recentes têm demonstrado a presença do agente *Nosema ceranae* nessas abelhas. Dada a carência de dados relacionando esse agente com a perda de colônias que ocorre na Região Sul do país durante o outono e inverno, o objetivo deste estudo foi verificar o papel da *Nosema* spp. na perda de colônias de abelhas durante o outono-inverno em condições de campo da Região Metropolitana de Curitiba. Para comprovar a hipótese do envolvimento desse agente, foi delineado um estudo longitudinal prospectivo envolvendo 116 colônias de 07 apiários comerciais divididos em três grupos, conforme a forma de suplementação alimentar fornecida: sem suplementação, suplemento pastoso e suplemento líquido. Em um apiário as abelhas foram coletadas mensalmente durante um ano para determinar a distribuição anual da infecção. Os demais apiários foram analisados nos meses de maio a agosto de 2014 para verificar a infecção por *Nosema* e as perdas de colônias durante o período. Outras variáveis como a infestação por *Varroa*, o número de operárias que carregavam pólen e a produção de mel das colmeias também foram avaliados. As análises demonstraram a presença do agente *Nosema* em todos os apiários e na maioria das colônias do estudo, sem sazonalidade.

Entretanto, apiários suplementados com alimentação líquida apresentaram maior número de esporos, mas sem interferir na perda de colônias durante o período e no subsequente estoque de mel nas colmeias do apiário. Durante o período analisado, a infestação por *Varroa* em operárias forrageiras diminuiu enquanto o transporte de pólen aumentou em todos os apiários avaliados. A caracterização genotípica por PCR multiplex demonstrou o envolvimento da espécie *Nosema ceranae* em todas as infecções e, em alguns casos (8,6%), também da *Nosema apis*. Análises histopatológicas comprovaram a infecção de órgãos intestinais de abelhas operárias. Conclui-se que o nível de infecção não teve influência direta na perda de colônias que ocorre durante o outono e inverno e não alterou o subsequente estoque de mel das colmeias. O número de indivíduos infectados foi a causa das variações no número de esporos de *Nosema* spp. na colônia. Apesar da convivência entre o hospedeiro e o parasito, a elevada diferença observada no número de esporos entre os grupos de diferentes suplementos fornecidos alerta para a sensibilidade dessa interação, podendo a prática de manejo alimentar interferir na transmissão horizontal intracolônia.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*. Suplemento alimentar. Perda de colônias. PCR multiplex.

## ABSTRACT

The honeybees *Apis mellifera* are important domestic animals in the food chain, therapeutic production and fundamental in angiosperm pollination process. Being directly or indirectly responsible, for the production of two-thirds of the food we eat. After the episode of the CCD (colony collapse disorder) in 2006, the world has been warned of the risk of reduction or even the disappearance of pollinating insects. Studies and monitoring programs deployed by various countries show that the colony losses during the fall and winter has been the main cause related to the decrease of honeybees that occur in temperate regions. The participation of pathogens such as the *Varroa destructor* parasite, microsporidia, viruses, nutritional factors, management of hives and the use of pesticides are mentioned as factors involved in the complex system of honeybee colony losses. The Nosemosis caused by *Nosema apis* and more recently by *Nosema ceranae*, is recognized as a disease of European honeybees *Apis mellifera*

(European honeybee - EHB). In Brazil, beekeeping is based on Africanized bees (Africanized honeybee - AHB) and recent studies have shown the presence of *Nosema ceranae* spores in these bees. Given the lack of data relating this agent with the loss of colonies occurring in southern Brazil during the fall and winter, the objective of this study was to investigate the role of *Nosema* spp. to the loss of honeybee colonies during the autumn-winter under field conditions in the metropolitan region of Curitiba in Paraná State. To prove the hypothesis of the involvement of this agent, a prospective longitudinal study was designed, involving 116 colonies of 07 commercial apiaries divided into three groups according to the form of food supplementation provided: without supplementation, paste supplement and liquid supplement. In an apiary bees were collected monthly for a year to determine the annual distribution of infection. The other apiaries were analyzed in the months from May to August 2014 to verify the *Nosema* infection and the loss of colonies during the period. Other variables such as the *Varroa* infestation, the number of worker bees carrying pollen and honey production were also evaluated. The analyzes showed the presence of *Nosema* in all apiaries and most of the colonies of the study, without seasonal difference. However, apiaries supplemented with liquid feed showed a higher number of spores without interfering with the colony losses during the period and the subsequent honey stock in the hives. During the reporting period, the *Varroa* infestation in forage bee workers declined while the pollen transport increased in all evaluated apiaries. The genotypic characterization by multiplex PCR has demonstrated the involvement of *Nosema* *Nosema* species in all infections and, in some cases of *Nosema apis* were detected (8.6%). Histopathological analysis confirmed the infection of intestinal honeybees organs. It is concluded that the level of infection evaluated had no direct influence on the colony losses that occurred during the fall and winter and did not affect the subsequent honey stocked in the hives. The number of infected bees has been the cause of the difference in the number of *Nosema* spp spores in the colony. Despite the coexistence between the host and the parasite, the high difference observed in the number of spores between groups of different supplements provided an alert to the sensitivity of this interaction, and the food management practice can interfere with the horizontal transmission in the hive.

**Keywords:** *Apis mellifera*. Supplemental feeding. Colony losses. Multiplex PCR.

## LISTA DE FIGURAS

## Página

Figura 1- Diversidade fisionômica das abelhas africanizadas do Brasil.....	14
Figura 2- Alimentadores utilizados na suplementação.....	19
Figura 3 - Colônias perdidas.....	20
Figura 4 - Ilustração da coleta de abelhas forrageiras na colmeia.....	21
Figura 5 - Preparo de amostras de abelhas para contagem de esporos....	23
Figura 6 - Abelhas operárias com <i>Varroa</i> e grãos de pólen.....	25
Figura 7 - Processamento de abelhas para histopatologia.....	27
Figura 8 - Rompedor de células <i>beadbeater</i> .....	28
Figura 9 - Distribuição mensal anual de esporos de <i>Nosema</i> spp.....	33
Figura 10 - Interação entre tempo e média do número de esporos.....	34
Figura 11 - Produtos amplificados em gel de agarose.....	39
Figura 12 - Aspectos do Intestino médio e posterior de abelhas.....	41
Figura 13 - Cortes histopatológicos de ventrículo de abelhas.....	42
Figura 14 - Interação entre tempo e infestação por <i>Varroa</i> .....	45
Figura 15 - Interação entre tempo e abelhas operárias com pólen.....	46
Figura 16 - Localização das colônias amostradas.....	71

<b>LISTA DE TABELAS e QUADROS</b>	<b>Página</b>
Tabela 1 - Reagentes empregados na amplificação do RNAr 16S.....	30
Tabela 2 - Col. Perdas durante o outono/Inverno.....	32
Tabela 3 - Média de esporos nos grupos e meses de out./inv.....	34
Tabela 4 - Número e percentual de amostras com esporos de <i>Nosema</i> spp. nos grupos.....	35
Tabela 5 - Média de esporos e espécie de <i>Nosema</i> nas colônias perdidas e não perdidas.....	36
Tabela 6 - Colônias com esporos de <i>Nosema</i> durante outono e inverno....	36
Tabela 7 - Abelhas infectadas em junho e julho no grupo LIQ.....	37
Tabela 8 - Esporos em abelhas forrageiras e moribundas.....	37
Tabela 9 - Médias da produção de mel da primeira colheita nos 3 grupos...	43
Tabela 10 - Média da taxa de infestação por <i>Varroa</i> .....	44
Tabela 11 - Média do percentual de operárias com pólen.....	45
Tabela 12 - Dados da correlação entre os fatores envolvidos.....	46
Quadro 1 - Síntese de atividades do experimento.....	69
Tabela 13 - Componentes da suplementação alimentar .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPV	<i>acute bee paralysis virus</i>
AHB	abelha africanizada ( <i>africanized honeybee</i> )
ATP	adenosina trifosfato
BQCV	<i>black queen cell virus</i>
CAPA	Canadian Association of Professional Apiculturists
CBPV	<i>chronic bee paralysis virus</i>
CCD	síndrome do desaparecimento de colônias ( <i>colony collapse disorder</i> )
Cfb	Clima temperado úmido com verão temperado segundo Köpen-Geiger
Col.	Colônias
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DWV	vírus da asa deformada ( <i>deformed wing virus</i> )
EHB	abelha europeia ( <i>European honeybee</i> )
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization
Fig.	Figura
HE	Hematoxilina-Eosina
IAPV	<i>Israeli acute paralysis virus</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Inv.	Inverno
log.	Logaritmo
OIE	Escritório Internacional de Epizootias ( <i>Office International des Epizooties</i> )
Out.	Outono
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SBV	vírus da cria ensacada ( <i>sacbrood virus</i> )
SDS	dodecil sulfato de sódio ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Supl.	Suplemento
UFPR	Universidade Federal do Paraná

# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A abelha social, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) e o seu principal produto, o mel, acompanham a relação entre o homem e os animais desde a pré-história. Há registros históricos em figuras rupestres que ilustram a extração do mel e a manipulação de abelhas pelos nossos ancestrais. A gradual substituição da forma extrativista por colmeias e práticas para não matar os enxames e, por fim, aumentar a produção de mel, constituiu a apicultura. A palavra colmeia vem do grego colmo, uma espécie de balaio feito de palha em forma de sino, onde recolhiam os enxames (Wiese, 1984; Crane, 1975).

A interação entre as abelhas e os vegetais ganhou tal importância que, em alguns locais na Europa, durante a Idade Média, as árvores foram consideradas propriedade do governo, e proibidas de serem derrubadas por servirem de abrigo às abelhas. Enxames eram devidamente registrados e fruto de heranças, e atribuído pena de morte ao roubo de abelhas (Crane, 1975).

A atividade econômica ligada aos produtos da apicultura movimentou mercados mundiais, com destaque para o mel, cujos dados estimados ultrapassam um milhão de toneladas produzidas anualmente. A China, seguida pela Argentina, lidera o ranking como maiores produtores e exportadores (FAO, 2014). Nos últimos anos, o Brasil tem aparecido no cenário mundial de produção e comercialização de mel, ocupando uma posição entre os dez maiores produtores e exportadores de mel, com produção anual em torno de 40 mil toneladas (IBGE, 2013).

Outro produto da apicultura cuja importância vem crescendo no Brasil e acrescentando receita às exportações é a própolis que, apesar de não haver dados econômicos deste produto da apicultura, é reconhecido e valorizado em várias partes do mundo pela sua qualidade e composição diversificada, fazendo o país ser o principal agente econômico em relação ao produto (SEBRAE, 2014).

As abelhas, juntamente com outros polinizadores, são fundamentais para o serviço de polinização de vegetais angiospermas, ao carregarem o pólen para o

estigma das flores envolvidas na fecundação. Portanto, participam diretamente na manutenção da diversidade da flora ambiental e na produção de alimentos, aumentando a produtividade e a qualidade de frutos e grãos da agricultura. Estima-se que 90% dos cultivos realizados nos EUA dependem de alguma forma dos insetos para a sua polinização (Martin EC, 1975). No Brasil, o reconhecimento e a exploração dessa atividade ainda é pequena, restringindo-se a aplicação em alguns cultivos de frutíferas, como a maçã no sul, e nas culturas de cucurbitáceas, especialmente o melão no nordeste brasileiro (Almeida et al., 2003) e, eventualmente, em frutíferas como nos laranjais e abacateiros de São Paulo.

O estado do Paraná ocupa o segundo lugar na produção nacional de mel, com registro anual de aproximadamente cinco mil toneladas, sem grandes modificações nos últimos anos (IBGE, 2013).

O modelo antrópico de ocupação inicial do território paranaense, caracterizado pela ocupação da floresta subtropical com a introdução da cultura do café na região Noroeste e no Norte Pioneiro, e das culturas anuais de milho, soja e trigo, entre outras, no Oeste e Sudoeste – culturas diversificadas mas produzidas de forma pouco intensiva – propiciou um ambiente favorável para as abelhas. Contudo, a implantação de um modelo agrícola intensivo, com o uso de máquinas e insumos em grande escala, interferiu no habitat das abelhas, fazendo com que a atividade da apicultura se desenvolvesse mais intensamente em locais de menor interferência antrópica, regiões que hoje são considerados como pólos de produção de mel no estado do Paraná (Krüger 2003). A região central paranaense é a maior produtora de mel, e o município de Ortigueira, juntamente com União da Vitória, são os municípios que se destacam como os maiores produtores. Outras regiões como a sul e a região metropolitana de Curitiba também merecem destaque, especialmente pela estabilidade da produção, o que demonstra que a cadeia apícola regional está implantada e estruturada nesta área (IBGE, 2013).

A perda de colônias de abelhas é considerada o maior problema da apicultura mundial na atualidade. Esta apresenta duas características distintas, sendo uma delas conhecida como perda de colônias durante os meses de inverno e, a outra, que ocorreu nos Estados Unidos e em alguns países do hemisfério norte a partir de 2006, é conhecida como CCD, do inglês *colony collapse disorder* ou síndrome do desaparecimento de colônias. Esta tem características próprias e diferentes de outras perdas, por haver abandono da colônia pelas abelhas, deixando para trás determinada

reserva de mel e pólen e muitas vezes, alguns indivíduos ou castas como a rainha e algumas operárias e a rejeição ao saque das reservas na colmeia abandonada (Ellis, 2007; USDA, 2014).

Após o aparecimento da CCD, e a preocupação com a diminuição da população ou mesmo o risco do desaparecimento das abelhas, vários países implantaram monitoramentos e registros dessas perdas, além de mobilizar governos, instituições e cientistas internacionais a desenvolverem estudos e pesquisas sobre as causas e impactos na produção de alimentos.

Entre as causas atribuídas à CCD e à perda de colônias de abelhas durante o inverno, os resultados de estudos recentes convergem para uma causa multifatorial envolvendo patógenos, parasitos, deficiência e falta de diversidade alimentar, manejo e uso de produtos químicos utilizados na colmeia e na agricultura (vanEngelsdorp et al., 2009; Pettis et al., 2013). Dentre os patógenos, a *Varroa destructor* (Anderson e Trueman, 2000), e a *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae) (Fries et al., 1996) são citados como os principais agentes envolvidos na CCD (Higes et al., 2006; Cox-Foster et al., 2007; Parvanov et al., 2014).

Há dois anos não se tem mais registros de CCD nos EUA, apesar das elevadas perdas de colônias que também ocorrem fora do período de outono e inverno e que poderiam estar incluídas nesta característica. No Brasil, ainda não há notificações sobre a ocorrência dessa síndrome, mas da mesma forma algumas notícias e relatos de ocorrências similares são eventualmente comentados.

No Brasil, existem poucas pesquisas sobre as perdas de colônias de abelhas, alguns trabalhos recentes que envolveram o tema, realizados na região Sul que incluíram informações sobre perda de colônias durante o período de outono e inverno apresentaram índices próximos aos registros internacionais, que estão na ordem de 20% a 30% ao ano (Nunes, 2011; Pegoraro et al., 2013).

A presença do parasita *Varroa* nos apiários brasileiros é reconhecida há mais de três décadas e vários estudos vêm sendo realizados envolvendo o agente. Mais recentemente, também a presença da *Nosema ceranae* vem sendo pesquisada e registrada em vários locais. A importância da qualidade do pólen em relação a infecção por *N. ceranae* foi pesquisada por Lodesani et al. (2012), e constataram menor nível de esporos em colônias abastecidas com pólen de melhor qualidade, e reduzindo a perda de colônias no inverno subsequente.

A hipótese do presente estudo é de que o patógeno *Nosema* spp. participa na causa da perda de colônias que ocorre durante o período de outono/inverno em apiários localizados na região metropolitana de Curitiba.

O objetivo geral deste trabalho foi de diagnosticar a presença e a infecção por *Nosema* spp. em apiários colonizados com abelhas africanizadas localizadas em clima tipicamente temperado. Os objetivos específicos foram de: a) determinar a distribuição mensal da infecção por *Nosema* em apiário utilizando-se do número de esporos por abelha na colmeia; b) determinar a espécie do agente envolvido via genotipagem por PCR multiplex; c) relacionar a infecção com a perda de colônias durante o período de outono/inverno (meses de maio a agosto) em apiários cujas colmeias estavam submetidas a diferentes manejos de suplementação alimentar, prática recomendada e utilizada para amenizar o risco de perdas.

O estudo é observacional e o método utilizado pode ser definido como estudo de coorte na classificação de pesquisa epidemiológica (Coeli e Faerstein, 2009), ressalvada a questão da amostra utilizada, impossibilitada de ser delineada por não haver registro de dados sobre a população de colmeias e apiários na região.

O estudo observacional se justifica dado à extensa lista de pesquisas relacionando a infecção por *N. ceranae* a problemas com a saúde das abelhas, porém muitas delas desenvolvidas em laboratório e com abelha europeia. O simples diagnóstico laboratorial da presença de esporos de *Nosema* spp. na colmeia pode levar a interpretações e intervenções não apropriadas ou mesmo desnecessárias. Em condições de campo e em abelhas africanizadas utilizadas nas criações locais, as respostas às intervenções pode ser bem diversa, dados os mecanismos de compensação, tolerância e resistência de uma colônia, que é considerada a entidade epidemiológica das abelhas.

Outras variáveis complementares passíveis de análise, como a infestação pelo parasito *Varroa* e a chegada de pólen carregado pelas operárias forrageiras, foram consideradas no presente estudo. Para essas variáveis adicionais, os métodos empregados para obtenção dos resultados foram adaptados para as condições do experimento.

O manuscrito da dissertação está dividido em quatro capítulos: o primeiro, tratado como introdução, traz um relato da situação da apicultura local e os principais problemas que afetam a sanidade e a sobrevivência das colônias de abelhas. O segundo capítulo é uma revisão de literatura dividida em itens relacionados aos temas

em estudo da pesquisa. O terceiro capítulo trata especificamente do trabalho de pesquisa desenvolvido. O quarto capítulo apresenta uma conclusão geral.

## **CAPÍTULO II**

### **2 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

A importância das abelhas na produção de alimentos vai muito além dos produtos extraídos da colmeia, ao participarem no processo de polinização de vegetais angiospermas. Estima-se que 90% dos cultivos realizados nos EUA dependem de alguma forma dos insetos para a sua polinização e da mesma forma participam na ecologia da diversidade ambiental (Martin EC, 1975).

A síndrome do desaparecimento de colônias (*colony collapse disorder*) relatada nos EUA após o ano de 2006, e a perda de colônias durante o inverno são os principais temas que acometem a apicultura e põem em risco a sobrevivência das abelhas no mundo. As suas prováveis causas, tais como parasitos, patógenos, pesticidas, deficiência nutricional e estresse de manejo, são destaque em países do hemisfério norte, onde o tema vem sendo tratado como alerta de estado (CAPABEE, 2014; vanEngelsdorp et al., 2014; Pohorecka et al., 2014; Nazzi et al., 2014).

Desde 1956 o cruzamento da abelha africana *Apis mellifera scutellata* com as abelhas europeias locais deu origem às abelhas africanizadas (*africanized honeybee* - AHB) que atualmente ocupam todo o território brasileiro, exceto a Ilha de Fernando de Noronha (Kerr, 1994; Gonçalves, 2006).

No Brasil tem-se comprovada a presença de alguns parasitos de *Apis* como a *Varroa destructor* (Carneiro et al., 2007), e de patógenos como a *Nosema ceranae* (Klee et al., 2007; Teixeira et al., 2013). A *N. ceranae* é citada como causa direta da perda de colônias de abelhas na Espanha (Higes et al., 2006; Higes et al., 2008), e também relacionada entre as várias causas de perda de colônias no Canadá (CAPABEE, 2014) e Bulgária (Parvanov et al., 2014). Entretanto, alguns estudos envolvendo a infestação pelo parasita *Varroa destructor* e a abelha africanizada têm demonstrado maior tolerância desta linhagem de abelhas em relação ao parasitismo quando comparados com abelhas europeias (*European honeybee* - EHB) (Guerra et

al., 2000; Medina-Flores et al., 1999). Maior tolerância, que para a *Varroa*, foi relacionada a fatores como melhor comportamento higiênico ao removerem mais pupas infestadas (Guerra et al., 2000), ou a menores habilidades reprodutivas ao parasitarem abelhas africanizadas (Medina-Flores et al., 1999).

Esta relação e a possível tolerância ainda não foi estudada na infecção por *Nosema spp.* em abelhas africanizadas. No Uruguai Mendoza et al. (2014a) encontraram menores infecções de *N. ceranae* em abelhas africanizadas do que em abelhas de origem europeia. Contudo, o efeito da presença do agente na colônia e a possível relação com a perda de colônias que ocorrem durante o período de outono/inverno ainda carecem de investigação.

## **2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE PERDA DE COLÔNIAS**

Desde 2006 a CCD e a perda de colônias durante o inverno centralizam as discussões e preocupações com a diminuição de abelhas no mundo. Consequentemente, instituições foram envolvidas e a comunidade científica mobilizada para buscarem soluções. Com o mundo interligado pelas comunicações, as notícias chegam a todos e em todos os lugares rapidamente e geram interpretações diversas. Passados dois anos sem registros de CCD, os esforços se concentram para esclarecer e diminuir as perdas de colônias durante o inverno. Alguns países como EUA, Canadá, e vários outros países de clima frio do Hemisfério Norte criaram seus sistemas para o monitoramento dessas perdas. Os EUA implantaram um sistema que avalia a perda anualmente, incluindo dados de perdas dos meses de período frio – de 1º de outubro a 1º de abril – e os outros meses do ano, consideradas como perdas de verão. As perdas inverniais nos EUA estão entre 20% e 36%, sendo que perdas na ordem de 19% são consideradas aceitáveis e normais (vanEngelsdorp et al., 2014), apesar das oscilações sofridas durante anos relatados pelo mesmo autor.

Os esforços científicos para determinação das causas das perdas de colônias convergem para uma relação de causas multifatoriais, envolvendo parasitos, patógenos, resíduos de agrotóxicos, aspectos nutricionais, de manejo e ambientais (vanEngelsdorp, 2009, Pohorecka et al., 2014, Nazzi et al., 2014). É importante citar que na revisão de publicações e eventos apícolas a partir de 1980, esses mesmos temas centravam a pauta de pesquisas e debates dos problemas da apicultura no Brasil, no entanto, novos agentes e patógenos vão sendo incluídos na lista.

Apesar de alguns relatos de perdas com características de CCD, ainda não temos registro da ocorrência dessa síndrome no Brasil. Por outro lado, a perda de colônias durante o inverno é tema frequente e recorrente no meio apícola da região sob estudo, mas não há até o momento um sistema de registro das perdas. Os dados contidos nos estudos científicos relacionam-se a casos focais e dirigidos experimentalmente (Pegoraro et al., 2013; Nunes, 2011).

Durante a investigação epidemiológica da doença cria pútrida americana em 2007, envolvendo apiários de uma considerável área geográfica na região metropolitana de Curitiba, foram detectadas perdas na ordem de 20% durante o inverno, (Krüger, dados não publicados). Em outro estudo experimental (Pegoraro et al., 2013), verificou-se a perda de 38,8% de colônias durante o inverno de 2010. Esses índices se aproximam aos números registrados nos EUA, que está entre 30 a 35% (vanEngelsdorp et al., 2014), e aos registros atuais do Canadá, de 25% (CAPABEE, 2014). Na Europa, Chauzat et al. (2014) relatam índices que variam de 3,5% a 33,6% entre os vários países analisados pelo programa de monitoramento implementado pela União Europeia. Entretanto, o autor também cita que os níveis de perdas considerados aceitáveis mudam conforme o país e o ano.

Por outro lado, numa análise retrospectiva anual de registros, a perda de colônias vem apresentando declínio, e a população mundial de abelhas criadas, apresenta um leve e gradual aumento nos últimos anos (FAO, 2014). No Brasil não existem dados sobre o número de colônias e de apiários existentes, mas desde a última década registra-se gradual aumento na produção e exportação de mel (IBGE, 2013) e de própolis (SEBRAE, 2014), indicando que as perdas de colônias que ocorrem e seus impactos são repostos, seja pela intervenção técnica de quem cuida das abelhas ou por elas próprias.

A participação de patógenos e sua ação isolada ou conjunta com outros fatores na perda de colônias têm sido demonstradas e comprovadas em estudos científicos (vanEngelsdorp, 2009; Nazzi et al., 2014; Pohorecka et al., 2014).

O parasita *V. destructor*, muitas vezes associado a viroses como o *deformed wing virus* (DWV) e *black queen cell virus* (BQCV) vem sendo considerado o principal agente envolvido na perda de colônias em regiões de clima frio (Dainat et al., 2012; Locke et al., 2014). A maioria dos países que se destacam na apicultura tem adotado medidas de controle via tratamento antiparasitário contra a *Varroa*.

Até o momento, não há produtos registrados e liberados com indicação de tratamento da varroatose em abelhas no Brasil, apesar de alguns apicultores e organizações recomendarem ou adotarem produtos naturais como os ácidos orgânicos ou mesmo essências vegetais para o controle deste parasita. Estudos científicos são necessários para comprovar a necessidade dessas intervenções, sua real eficácia ou mesmo os efeitos que tais produtos podem acarretar no desenvolvimento da resistência e na presença de resíduos nos produtos apícolas. As pesquisas realizadas envolvendo *Varroa* com abelhas africanizadas sugerem a possível convivência destas, devido à maior tolerância dessa subespécie ao parasito (Guerra et al., 2000; Muli et al., 2014). Mesmo assim, as constantes mudanças ambientais, a associação com outros patógenos, ou mesmo a possível reintrodução de novos tipos (haplotipos) do parasito, podem alterar as condições anteriores (Carneiro et al., 2007).

Dentre as viroses, além da DWV e BQCV, que têm epidemiologia associada à presença de *Varroa*, o *israeli acute paralysis virus* (IAPV) está mais relacionado à CCD (Cox-Foster et al., 2007, Hou et al., 2014). Outras viroses como o *sacbrood virus* (SBV), o *chronic bee paralysis virus* (CBPV), e o *acute bee paralysis virus* (ABPV) são doenças em estudo e com comprovação de presença nas abelhas, inclusive no Brasil, e parecem desempenhar um papel auxiliar de outras fatores, muitas vezes agravando o efeito de outras doenças nas causas da morte ou perda de colônias (Cox-Foster et al., 2007; vanEngelsdorp et al., 2009).

A nosemose das abelhas, apresentada no item seguinte, causada pela *N. apis* e *N. ceranae*, vem sendo apresentada como causa direta ou indireta com a perda de colônias (Higes et al., 2006; Higes et al., 2008; Chen et al., 2009; Parvanov et al., 2014; CAPABEE, 2014).

Outros agentes e fatores de risco associados à sobrevivência da abelha *A. mellifera*, muitas vezes associados aos patógenos, são os compostos químicos utilizados na agropecuária. Há evidência de que algumas moléculas de inseticidas do grupo químico dos neonicotinóides têm envolvimento mais acentuado na gradativa perda e poderiam levar à CCD (Lu et al., 2014). Estudos divergem quanto ao efeito de sub-doses dessas moléculas sobre a colmeia. A possibilidade desses produtos causarem efeitos distintos daqueles descritos e estudados na sua prescrição (Sandrock et al., 2014) tornou-se motivo de suspensão desse grupo químico de inseticidas por alguns países europeus, e ainda a suspensão parcial no Brasil (MAPA, 2012).

A intensificação da apicultura e suas práticas de manejo, como o transporte de colmeias na apicultura migratória e a falta de nutrição suficiente ou diversificada também devem ser considerados em qualquer investigação ou estudo que envolva problemas sanitários apícolas. O clima frio e chuvoso, e temperaturas abaixo de 13° C, afeta negativamente o voo das abelhas (Gary NE, 1975), ação essencial para o aporte de alimentos, a remoção de resíduos e principalmente para a higienização, ao permitir a excreção longe da colmeia, evitando ou diminuindo a possível recontaminação por agentes como os esporos.

### **2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Nosema* spp. (MICROSPORÍDIA)**

Por muito tempo os microsporídios foram classificados como protozoários parasitos do filo Apicomplexa (Hirt et al., 1999; Keeling et al., 2002). Porém, a partir de pesquisas filogenéticas, o filo Microsporidia é hoje incluído no reino dos fungos (Adl et al., 2005), mas a questão ainda não está totalmente resolvida e novos estudos genéticos em curso deverão permitir uma classificação taxonômica mais precisa.

Porém, sabe-se que são parasitos intracelulares obrigatórios de células eucarióticas. A proximidade com as organelas e o metabolismo desenvolvido pelas células parasitadas fez com que esses parasitos adquirissem habilidades para o seu suprimento próprio.

Algumas espécies, como o *Enterocytozoon bieneusi*, que causa a microsporidiose em humanos e o *Encephalitozoon cuniculli*, que parasita vários mamíferos e o homem, têm seu tamanho celular e genoma bastante reduzido, realiza importantes atalhos bioquímicos, codificando apenas duas enzimas para o metabolismo do carbono, indicando que todo o ATP necessário é desviado do seu hospedeiro, além da não detecção de genes spliceossômicos relacionados à remoção de introns (Akiyoshi et al., 2009; Keeling et al., 2010).

Os microsporídios da família Nosematidae, especialmente o gênero *Nosema*, desenvolveram a habilidade de parasitar células de insetos, razão pela qual também têm sido testados para uso no controle biológico de insetos pragas, a exemplo da *Diatraea saccharalis* e *Cotesia flavipes* da cana de açúcar (Simões, 2012).

Como exemplos de parasitos de insetos domésticos de interesse econômico, podemos citar a *Nosema bombycis*, que causa a doença pebrina no bicho da seda *Bombyx mori* (Ma et al., 2013) e que vem sendo detectada em outras espécies de

abelhas como as mamangavas (Plischuk et al., 2009), e a nosemose de abelhas melíferas causados pelas *Nosema apis* (Zander, 1909) e a *Nosema ceranae*.

A *N. apis* é conhecida por parasitar abelhas europeias *Apis mellífera*. A infecção aguda apresenta sinais clínicos relacionados à disenteria geralmente demonstrada com manchas de fezes marrons na entrada da colmeia. Outros sinais, como abelhas rastejando na frente da colmeia sem poder voar são citados na infecção por *Nosema*, mas podem confundir-se com outras enfermidades ou intoxicações (Gochnauer et al., 1975).

A *N. ceranae*, inicialmente identificada como parasito de abelhas asiáticas da espécie *Apis ceranae* (Fries et al. 1996; Chen et al. 2009), foi descrita infectando abelhas *A. mellifera* na Espanha (Higes et al., 2006).

A infecção por *N. ceranae* tem patologia parecida com a da *N. apis*. Esses microrganismos invadem e parasitam as células do sistema digestório de abelhas adultas com diferentes respostas e sinais para a colônia (Higes et al., 2008; Fries et al., 2013) mas a nosemose causada por *N. ceranae* apresentam sinais clínicos distintos da diarreia manifestada pela *N. apis* (Huang et al., 2007; Higes et al., 2008). A manifestação da infecção tem diversas descrições, geralmente associada a maior mortalidade de abelhas (Paxton et al., 2007), e envolvidos na causa direta da CCD (Higes et al., 2006; Parvanov et al., 2014) ou associada a outros fatores nas perdas de colônias durante o inverno (Dainat et al., 2012). Ambas possuem a morfologia dos esporos muito similares, sendo impossível a diferenciação visual sob microscópio óptico. No entanto apresentam algumas diferenças na composição genômica, sendo possível diferenciá-los por técnicas moleculares.

A forma contaminante é o esporo que, em contato com a célula alvo, no caso o enterócito do ventrículo intestinal, germina expondo o tubo polar utilizado para a introdução no interior da célula.

No interior da célula infectada, participam do metabolismo celular provendo substâncias para a multiplicação do parasito. Em infecção experimental, com 6 a 10 dias as células epiteliais estão ocupadas com novos esporos (Gochnauer et al., 1975).

Apesar de estarem na lista das doenças de notificação obrigatória (MAPA, 2013; OIE, 2013) ainda não se tem uma definição sobre o que é considerado como doença nosemose em um apiário ou numa colônia.

A presença da *N. ceranae* em alguns países da América do Sul foi confirmada por alguns estudos no Brasil (Klee et al., 2007), no Uruguai (Invernizzi et al., 2009) e na

Argentina (Medici et al., 2012). No Chile, Bravo et al. (2014) relataram a presença de *N. ceranae* em 100% das colônias pesquisadas em 2011 e 2012, mas a *N. apis* não foi detectada.

Ainda no Brasil, Teixeira et al. (2013) extraíram DNA de *N. ceranae* de zangões preservados em álcool 70% desde 1978 e oriundos do Rio Grande do Sul, sugerindo que este agente está presente no País há muito tempo.

No estado do Paraná, durante o inverno de 2010 e 2011, foram realizadas algumas coletas e análises laboratoriais em apiários que apresentaram mortalidade de abelhas, nos quais foram diagnosticadas a presença do agente *N. ceranae* em várias amostras, e de *N. apis* em uma amostra.

## **2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Varroa***

A *Varroa* é um ácaro ectoparasita visível a olho nu, que se alimenta da hemolinfa de pupas e da fase adulta de abelhas melíferas. Primeiramente descrita pelo holandês Oudemans em 1904 com o nome de *Varroa jacobsoni*, tem como hospedeiras as pupas de abelhas asiáticas *Apis cerana* na ilha de Java (Denmark, 1991). Em 1963 foi descoberta parasitando abelhas *Apis mellifera* em Hong Kong e Filipinas (Delfinado, 1963). Na América do Sul foi detectada pela primeira vez no Paraguai em 1973 (Montiel, 1984), e no Brasil foi descrita pela primeira vez em 1975 por Alves et al. (1975).

Em 2000, foi reclassificada como uma nova espécie e passou a denominar-se *Varroa destructor* por Anderson e Trueman (2000), dentro da qual dois distintos haplótipos, denominados J e K, foram identificados.

A infestação das pupas por *Varroa* causa redução na concentração de proteínas e carboidratos corporais e a diminuição do peso das abelhas ao emergirem (Bowen-Walker e Gunn, 2001). O ciclo de infestação em abelhas ocorre em dois estádios, sendo uma fase forética, quando as fêmeas adultas parasitam o corpo de abelhas operárias adultas, alimentando-se da hemolinfa ao perfurarem as zonas brandas do corpo da abelha. A outra fase, chamada reprodutiva, começa quando a fêmea abandona o corpo da operária e ingressa nas células das crias de abelhas, misturando-se ao alimento das larvas para manter-se oculta e para adquirir o cheiro do alimento, escapando à detecção. Após a operculação das larvas, alimenta-se da hemolinfa da pupa e inicia a postura dos ovos que emergem junto com as abelhas. Este ciclo tem

uma duração de aproximadamente de 5 a 6 dias para os machos e de 7 a 8 dias para as fêmeas (De Jong et al., 1982).

Atualmente, exceto na Austrália, o parasito está presente em todos os países que possuem a atividade de apicultura.

Em abelhas *Apis mellifera* europeias (EHB) a *Varroa* é considerada a principal praga associado à perda de colônias, sendo praticamente impossível a prática apícola sem o controle do parasito (Boecking e Spivak, 1999).

Em abelhas da espécie *Apis cerana*, da qual é um parasito reconhecido, multiplica-se apenas em pupas de zangão e aparenta causar pouco dano à colônia. Semelhantemente, abelhas africanas como da subespécie *Apis mellifera scutelata* tem-se demonstrado tolerantes à infestação (Ritter, 1981).

Abelhas *Apis mellifera* africanizadas (AHB) têm demonstrado maior tolerância ao parasitismo pela *Varroa*. Esta maior tolerância, foi inicialmente atribuída a menor fertilidade do ácaro na infestação de pupas em abelhas africanizadas, diminuindo a habilidade reprodutiva ao infestar esta subespécie de abelhas (Rosenkranz e Engels, 1994). Entretanto, estudos comparativos entre diferentes épocas em abelhas africanizadas localizadas no estado de Santa Catarina e São Paulo, demonstraram que esta diferença favorável em relação a habilidade reprodutiva nas abelhas africanizadas tem diminuído. Mesmo assim a taxa de infestação de abelhas adultas não sofreu as mesmas alterações (Carneiro et al., 2007). Mudanças relacionadas a modificações do parasito, como o novo haplótipo K da *Varroa* foi considerado como possível causa, mas a influência do hospedeiro na fertilidade do parasitismo não está esclarecida (Rosenkranz e Engels, 1994; Garrido et al., 2003; Carneiro et al., 2007).

Posteriormente, outros fatores como a maior remoção de pupas infestadas por *Varroa* (Guerra et al., 2000), e o mecanismo de remoção e mutilação da *Varroa* ao infestarem operárias adultas, processo conhecido como *grooming*, foram considerados auxiliares na tolerância em relação ao parasitismo, fatores esses que apresentam diferenças entre as subespécies de abelhas (Bozic e Valentincic, 1995; Stanimirovic et al., 2010).

É preciso considerar que mecanismos de defesa contra patógenos e parasitos estão interligados. Portanto, a nutrição, especialmente o pólen, necessário para o crescimento da colônia e o perfeito desenvolvimento e funcionamento dos mecanismos individuais de defesa das abelhas, faz parte do complexo sistema de proteção da espécie contra agentes externos (Degrandi-Hoffman et. al., 2010), sendo necessário o

frequente estudo e monitoramento do parasitismo e dos mecanismos envolvidos para manter a possível convivência.

## 2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE ABELHAS AFRICANIZADAS NO BRASIL

As abelhas são insetos que evoluíram separando-se das vespas da família Sphecidae, que substituíram a predação de pequenos animais pelo pólen vegetal como fonte proteica na forma adulta, desenvolveram a probóscide para coletar néctar e desenvolveram as corbículas adaptadas para o transporte do pólen até os favos.

Estudos fósseis indicam que as abelhas do gênero *Apis* tenham surgido na África antes da separação continental. Posteriormente, migraram para a Europa e Ásia, originando as espécies *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis florea*, *Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis nuluensis*, *Apis korchevniskov*, *Apis andreniformis* e *Apis nigrocicta*. Novas e recentes descobertas envolvendo técnicas genômicas a partir do sequenciamento total da *Apis mellifera* (Weinstock et al., 2006) podem contribuir no esclarecimento da origem e evolução desses insetos (Wallberg et al., 2014).

No Brasil, até 1840, a criação de abelhas era praticada com espécies nativas, denominadas abelhas indígenas sem ferrão ou meliponídeos (Camargo, 1972). O padre Antônio Carneiro Aureliano foi quem trouxe os primeiros exemplares de abelhas *A. mellifera* para o Brasil e, posteriormente, mas ainda no mesmo século, os colonizadores de várias partes da Europa levaram as subespécies *Apis mellifera mellifera* da Alemanha, a *Apis mellifera ligustica* da Itália, a *Apis mellifera carnica* da Áustria e a *Apis mellifera caucasica* da Rússia para a região Sul do País. O poli-híbrido resultante dessas linhagens deu início a apicultura brasileira (Gonçalves, 2006).

Segundo relatos históricos das décadas de 1940 e 1950, a apicultura sofreu grandes danos provocados por doenças como a nosemose por *N. apis* e a cria pútrida, o que praticamente dizimou a atividade no País. Em 1956, o professor Warwick Estevan Kerr, através de apoio governamental, deslocou-se para a África com a incumbência de pesquisar a abelha africana. Em 1957, chegaram à estação experimental de Rio Claro-SP as rainhas introduzidas da África, que em função de um acidente, enxamearam, liberando essas abelhas “muito defensivas” no território

brasileiro, ganhando o nome e a marca internacional de abelhas assassinas ou abelhas brasileiras (Gonçalves, 1984; Gonçalves, 1994; Kerr, 1994).

Atualmente, exceto na Ilha de Fernando de Noronha, o cruzamento da abelha africana *Apis mellifera scutellata* com as abelhas europeias locais ocorrem em todo o território brasileiro. Segundo Gonçalves (1994), as abelhas derivadas desses cruzamentos possuem na sua composição uma grande diversidade de subespécies ou raças, sendo denominadas *africanized honeybee* (AHB), ou seja, abelha africanizada (Gonçalves, 1984; Kerr, 1994).

Por ser composta por várias raças e sem uma característica morfológica definida (Magnini, 2014), é possível serem encontrados diferentes fenótipos de abelhas no apiário ou até na mesma colônia, conforme demonstrado na Figura 1, durante o acompanhamento deste estudo.



**Figura 1.** Abelhas africanizadas (AHB) coletadas demonstrando a diversidade fenotípica encontrada na região de estudo

O manejo e a melhoria do processo de trabalho com abelhas agressivas no Brasil têm o reconhecimento mundial, e atualmente, em função dos problemas mundiais envolvendo doenças e parasitos, diversos estudos vêm comprovando a maior tolerância desta subespécie a diversos agentes. Atualmente, o Brasil é praticamente o único lugar do mundo que não utiliza medicamentos ou qualquer controle químico no tratamento de doenças que atacam as abelhas. Com conhecimento gerado pelo sequenciamento genômico completo da *A. mellifera* em 2006 (Weinstock et al., 2006), vislumbra-se a possibilidade de uso de marcadores moleculares associados às características desejáveis presentes em AHB, ou mesmo projetos visando a produção de abelhas geneticamente modificadas (O'Brochta, 2014). Este cenário demonstra a urgente e real necessidade do envolvimento das academias de pesquisa do Brasil e, especialmente, do interesse de pesquisadores na área, com vista ao avanço da apicultura.

## CAPITULO III

### RESUMO

#### **A influência das *Nosema* spp. na perda de colônias de abelhas africanizadas durante o inverno**

#### **The role of the *Nosema* spp. on Africanized Honeybee winter losses**

Edegar Krüger<sup>1</sup>; Adhemar Pegoraro<sup>2</sup>, Alvaro Tadeu Munhoz<sup>3</sup>, Marlise Teresinha Mauerwerk<sup>2</sup>, Humberto

M.F.Madeira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Ciência Animal – PUCPR, Méd. Vet. MAPA, edegar.kruger@agricultura.gov.br

<sup>2</sup>Eng. Agron. Professor UFPR,

<sup>3</sup>Eng. Agron. Apicultor especialista em Apicultura

<sup>4</sup>Eng. Agron. Professor PUCPR

Após o episódio da CCD (*colony collapse disorder*), a perda de colônias de abelhas *Apis mellifera* L. durante o inverno tem sido o principal foco de atenção relacionado a problemas com a diminuição de polinizadoras no mundo. A participação de patógenos como o parasita *Varroa destructor* tem aspectos universais, e mais recentemente, a *Nosema ceranae*, tem sido apontado como participante no complexo sistema de fatores envolvidos na perda de colônias. Recentes estudos têm demonstrado a presença do agente em abelhas africanizadas no Brasil, entretanto pouco têm sido realizado para relacionar esse agente com a perda de colônias que ocorrem no sul durante o outono e inverno. O objetivo deste estudo foi de verificar o papel da *Nosema* spp. na perda de colônias de abelhas durante o inverno em condições de campo. Para comprovar a hipótese do envolvimento deste agente, um estudo longitudinal prospectivo foi delineado envolvendo apiários comerciais estabelecidos e divididos em três diferentes grupos conforme o manejo alimentar suplementar fornecido. Os resultados demonstram que a *Nosema* spp. está presente em todos os apiários, causando infecção nas abelhas. O manejo alimentar influencia na transmissão horizontal intra colônia, contudo tal nível de contaminação não teve interferência no número de colônias perdidas. A variação em indivíduos infectados alerta para a sensibilidade do sistema de interação benigna estabelecido entre o hospedeiro e o parasito. Este é o primeiro estudo epidemiológico relacionando *Nosema* spp. a perda de colônias de abelhas africanizadas localizadas em clima temperado com inverno frio no sul do Brasil.

**Palavras-chave:** Abelhas Africanizadas, *Nosema* spp., *Apis mellifera*, perda de colônias.

## ABSTRACT

After the episode of the CCD, the winter losses has been the focus of attention to the problems of honeybees colonies *Apis mellifera* L. and the decrease of pollinating in the world. The participation of pathogens such as the parasite *Varroa destructor* has universal aspects, and most recently, the *Nosema ceranae* has been touted as a participant in the complex system of factors involved in colonies losses. In Brazil, recent studies have demonstrated the presence of the agent in Africanized honeybee hives, though no studies have been conducted to relate this agent with the colonies losses occurring during the cold winter months in the south. The aim of this study was to verify the role of *Nosema* spp. on the honeybee colonies losses during winter in field conditions. To prove the hypothesis of the involvement of this agent, a prospective longitudinal study was designed involving established commercial apiaries. Three different groups were established according of the supplementary feed management provided during the period. The results showed that *Nosema* spp. is present in all apiaries, causing infection in bees. The food management has influenced in horizontal intra colony transmission, however this level of contamination did not adversely affect the number of colonies losses. The variation of individual infected bees alert to the sensitivity of the benign interaction system established between the host and the parasite. This is the first epidemiological study relating *Nosema* spp. to Africanized honeybee winter losses, located in cold temperate climate in southern Brazil.

**Key words:** Africanized honeybee, *Nosema* spp., *Apis mellifera*, Colony losses,

### 3.1 INTRODUÇÃO

A importância das abelhas *A. mellifera* na produção de alimentos vai além dos produtos extraídos da colmeia, tem relação com o processo de polinização de vegetais angiospermas. Estima-se que 90% dos cultivos realizados nos EUA dependem de alguma forma dos insetos para a sua polinização e da mesma forma participam na ecologia da diversidade ambiental (Martin, 1975).

Após o episódio da síndrome do desaparecimento de colônias (*colony collapse disorder*) relatado nos EUA em 2006 (Underwood & vanEngelsdorp 2007), o mundo tem despertado para o risco que representa a perda dos insetos polinizadores e, entre eles as abelhas *A.mellifera*.

Passados mais de dois anos sem relatos de CCD, a perda de colônias, especialmente durante o período de outono e inverno tem sido a preocupação relacionada à diminuição da população de abelhas e de polinizadores em várias partes do mundo, estados e organizações tem implantado sistemas de monitoramento dessas perdas (vanEngelsdorp et al., 2008; vanEngelsdorp et al., 2014; CAPABEE, 2014; Chauzat et al., 2014).

Entre os motivos das perdas, as conclusões dos esforços científicos têm convergido para uma relação de causas multifatoriais, envolvendo parasitos, patógenos, resíduos de agrotóxicos, nutricionais, manejo e ambientais (vanEngelsdorp, 2009; Pohorecka et al., 2014; Nazzi et al., 2014).

A *Nosema ceranae*, microsporídio parasito de abelhas asiáticas *Apis ceranae* que também infecta *A. mellifera* (Fries et al., 1996) tem sido reportada com frequência em pesquisas e investigações como causa direta da CCD e da perda de colônias de abelhas (Higes et al., 2006; Higes et al., 2008; Chen et al., 2009; Parvanov et al., 2014; CAPABEE, 2014).

Apesar do relato da presença da *N. ceranae* no Brasil (Klee et al., 2007; Teixeira et al., 2013), a sua relação com a perda de colônias de abelhas que tem ocorrido durante o período de outono e inverno não tem sido pesquisada.

A hipótese do presente estudo é de que o patógeno *Nosema* spp. participa na causa da perda de colônias que ocorrem durante o período de outono/inverno, em apiários na região metropolitana de Curitiba.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para testar a hipótese da pesquisa, foi realizado um estudo longitudinal prospectivo envolvendo sete apiários comerciais estabelecidos para a produção de mel. O levantamento de dados e a colheita de material foram realizados conforme descritos abaixo e resumidos no Quadro 1 (Apêndice):

a - Para avaliar a presença e a distribuição anual da infecção por *Nosema* spp. a coleta mensal de uma amostra composta por 30 abelhas operárias forrageiras foi efetuada, por 12 meses, com início em agosto de 2013 e término em julho de 2014, em um apiário composto por 15 colmeias, localizadas no município de Mandirituba- PR e que durante o período de outono e inverno foram suplementadas com alimento sólido.

b - Para a avaliação das perdas de colônias e a infecção por *Nosema* spp., 116 colmeias divididas em três grupos foram amostradas mensalmente de maio a julho de 2014 para o levantamento de esporos de *Nosema* spp., e de maio a agosto de 2014 para análise da perda de colônias. Os apiários foram divididos em grupos, conforme o tipo e a forma de suplementação alimentar fornecida no período, sem casualidade, da seguinte forma:

1) Grupo SEM (sem suplementação), constituído por 36 colmeias que não receberam suplementação alimentar formulada. O alimento para o período crítico de outono e inverno foi a manutenção ou o fornecimento de pelo menos dois quadros de ninho preenchidos com mel no início do inverno, durante o mês de maio.

2) Grupo SOL (suplemento sólido), constituído por 56 colmeias que receberam suplementação alimentar composta por mel, açúcar, pó de pólen com consistência pastosa, conforme tabela 12 do apêndice, embalada em sacos plásticos com volume de aproximadamente 500 gramas. O suplemento foi disponibilizado para a colônia em um espaço superior aos quadros do ninho (Figura 2A). Eventuais reposições foram feitas conforme o consumo e reserva de néctar e mel na colmeia.

3) Grupo LIQ (suplementação líquida), constituído por 24 colmeias que receberam como suplemento o fornecimento de dois litros de xarope líquido composto por água, açúcar, mel e premix proteico, conforme tabela 12 do apêndice, fornecido em dose única em alimentador de topo (Figura 2B).



**Figura 2.** Tipos de alimentadores e a forma de suplementação alimentar de inverno fornecida. A: Colmeia do grupo SOL e a seta indica o alimento fornecido na forma pastosa. B: colmeia do grupo LIQ e as setas indica o local do alimento fornecido.

As coletas mensais foram realizadas entre a última semana de cada mês e a primeira semana do mês subsequente, condição que permitiu a utilização retroativa dos dados nas futuras colônias perdidas, semelhante ao descrito por Gisder et al. (2010) e vanEngelsdorp (2015). Os meses de maio, junho, julho e agosto foram definidos para a avaliação do fator tempo na análise da variável perda de colônias, e os meses de maio, junho e julho para a variável infecção por *Nosema* spp. Todas as amostras foram coletadas mensalmente e no mesmo momento para cada apiário.

O ninho, local do núcleo reprodutivo das colônias de abelhas na colmeia, foi mantido com o mínimo de intervenções possíveis para evitar o resfriamento da colônia durante o período.

Os dados coletados incluíram também a taxa de infestação por *Varroa destructor* e a chegada de *pellets* de pólen nas corbículas das operárias forrageiras, conforme detalhado abaixo. Abelhas moribundas que durante o período de inverno eram encontradas rastejando na frente da colmeia foram coletadas e submetidas a análise individual para a detecção de esporos de *Nosema* spp.

Os apiários e as colônias sob estudo estavam localizadas na região metropolitana de Curitiba (Figura 18), cujo clima, vegetação e outras condições edafoclimáticas são semelhantes. O clima é caracterizado por invernos frios e úmidos e com altitude acima de 800 metros, incluído como clima Cfb na classificação de Köppen-Geiger (Kottek et al., 2006). A área de localização dos apiários não possui agricultura intensiva mecanizada e tem na silvicultura com eucaliptos e pinus a sua atividade

agrícola principal, além de pequenas culturas anuais em algumas propriedades ao redor dos apiários, atividades com baixa probabilidade de uso intensivo de agrotóxicos.

As práticas de manejo dos apiários eram semelhantes às aplicadas na maioria das unidades produtivas da região, sem utilização de medicamentos ou controle químico de doenças e parasitas.

A coleta de material nos apiários teve autorização e participação dos proprietários. Não houve necessidade de aprovação da pesquisa por comissão de ética no uso de animais pelo fato do estudo envolver invertebrados.

### 3.2.2 AVALIAÇÃO DAS PERDAS DE COLÔNIAS

Foram consideradas colônias perdidas as colmeias que durante a inspeção mensal a) não continham abelhas vivas (Figura 3 A); ou b) no final do período, em agosto, apresentaram-se órfãs, isto é, sem a rainha e eventualmente zanganeiras, indicada pela ausência das fases de cria de operárias e geralmente com um pequeno número de indivíduos e castas, insuficientes para o pleno desenvolvimento reprodutivo da colônia (Figura 3 B).



**Figura 3.** Colmeias com colônias perdidas. A: Colônia que morreu ou abandonou a colmeia. B: colônia em colapso com alguns indivíduos na colmeia.

### 3.2.3 COLETAS DE AMOSTRAS DE ABELHAS OPERÁRIAS E DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO POR NOSEMA

Dias ensolarados durante as horas com maior luminosidade foram escolhidos para realizar a operação no apiário. A entrada da colmeia foi obstruída com uma tira

de esponja e, após o acúmulo de pelo menos 30 operárias forrageiras que retornavam do voo de trabalho, estas foram aspiradas com um aparelho sugador desenvolvido para tal propósito (Figura 4 A; Figura 4 B) e imediatamente transferidas para um frasco com volume de 250 mL de etanol 70% (Figura 4 C), segundo o método preconizado na literatura (Teixeira et al., 2010; Traver et al., 2012; Botias et al., 2013; Madras-Majewska et al., 2013; Pohorecka et al., 2014; Shutler et al., 2014).

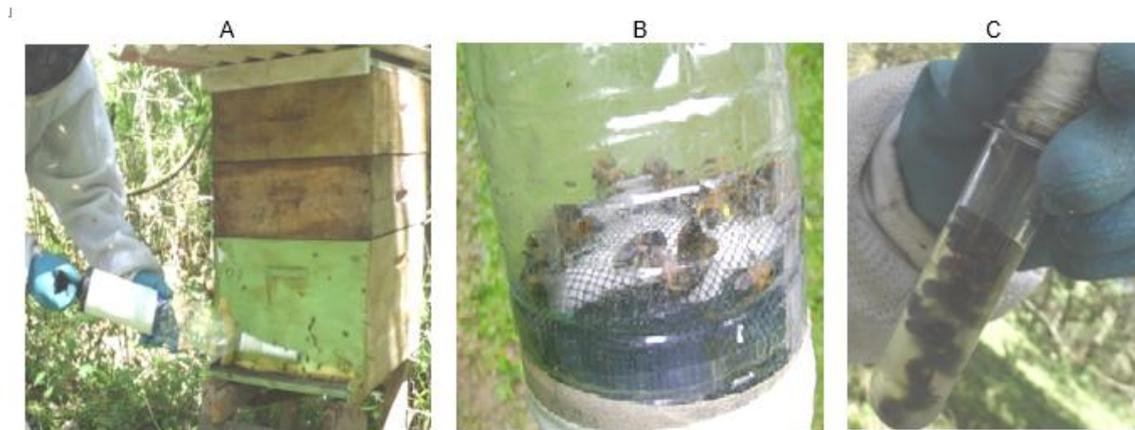


Figura 4. Coleta de abelhas. A: Obstrução do alvado e coleta de abelhas operárias na entrada da colmeia. B: Abelhas operárias forrageiras aspiradas no interior do sugador manual. C: Acondicionamento de abelhas em frasco com etanol 70%

### 3.2.3.1 Contagem de esporos de *Nosema* spp.

A infecção por *Nosema* spp. na colônia foi determinada pela contagem do número de esporos por abelha, obtida com o processamento de amostra composta de um *pool* de 30 operárias forrageiras.

A recomendação atual do manual da OIE (2013) é a de utilização de 60 indivíduos na amostra composta para o diagnóstico da doença nosemose na colmeia. Entretanto, conforme relatado por Botias et al. (2012), vários fatores podem estar relacionados às possíveis diferenças entre as coletas. Além disso, a remoção de 30 abelhas não causaria impacto significativo na colônia durante o inverno na região do experimento, época em que os indivíduos na colmeia muitas vezes encontram-se concentrados em um pequeno *cluster* ou grupo. Este método também se assemelha ao utilizado por Mulholland et al. (2012), que coletaram entre 36 e 50 abelhas, com estimativa de 95% de probabilidade de detecção da doença.

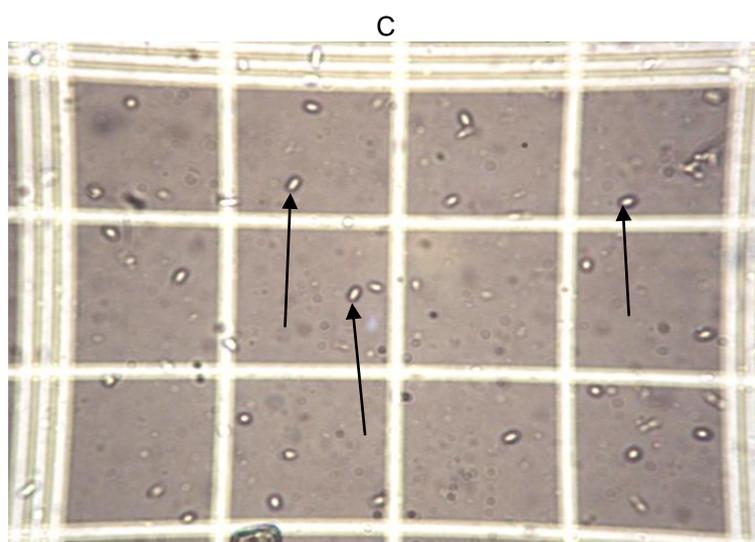
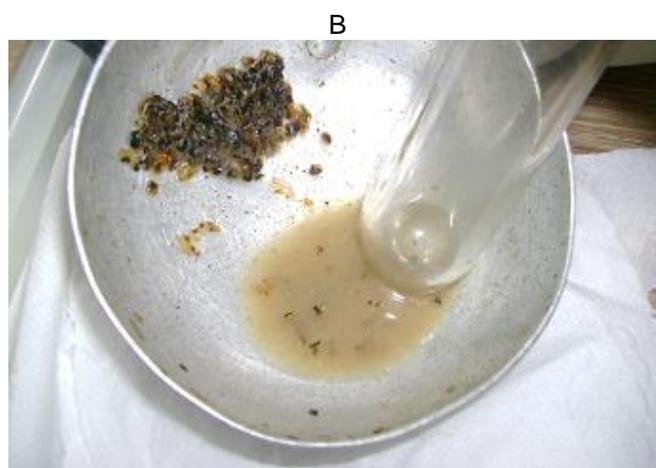
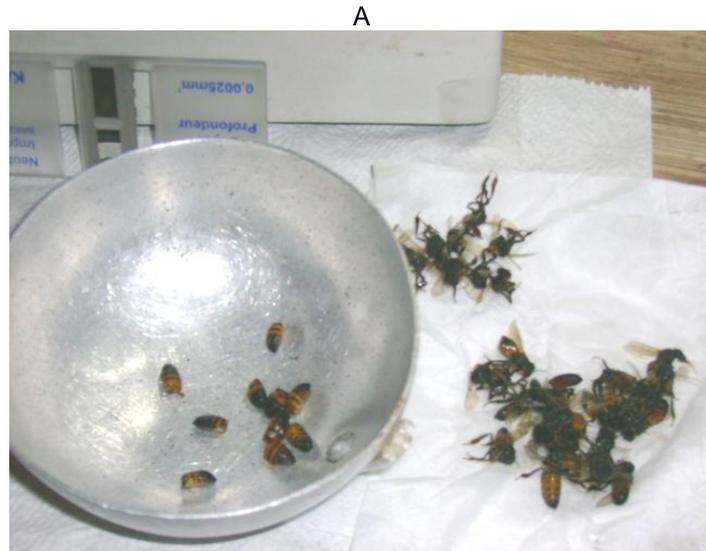
Trinta (30) operárias forrageiras foram transferidas do frasco com etanol 70% para a superfície de papel toalha para rápida secagem (Figura 5 A). O abdômen de cada abelha foi removido com auxílio de pinças e transferido para um frasco concha de

alumínio (Figura 5 A; Figura 5 B), dentro do qual a maceração foi efetuada com auxílio do fundo convexo de um tubo de ensaio, em substituição a um pistilo (Figura 5 B). Esta adaptação permitiu fácil maceração das abelhas e esterilização do material, simplificada por flambagem, após o uso.

Inicialmente foi adicionado 0,1 mL de água ultrapura por abdômen de abelha, para permitir melhor maceração e a separação de partículas maiores, realizada com o próprio tubo de ensaio no frasco de fundo côncavo (Figura 5 B). Após a homogeneização da parte líquida, uma gota foi pipetada do fundo côncavo do macerado e transferido para uma lâmina de vidro, coberta com lamínula e levada ao microscópio ótico com aumento de 400X para verificar a presença de esporos (Traver et al., 2012).

Ao restante do líquido foi adicionado 0,9 mL de água ultrapura estéril, completando 1,0 mL por abelha. O conteúdo foi filtrado através de tiras de gaze de algodão para um tubo de centrifuga de 50 mL. O filtrado foi novamente homogeneizado por inversão de quatro a cinco vezes no próprio tubo, e uma alíquota de 10  $\mu$ L foi aspirada para preenchimento da câmara de Neubauer (Figura 5 C). O restante do material filtrado foi armazenado em tubos de 15 mL e congelado a  $-20^{\circ}$  C para posterior processamento para extração de DNA.

A contagem de esporos foi efetuada sob microscopia ótica com aumento de 400X. Quando foi observado mais de um esporo por quadrado pequeno da câmara de Neubauer (Figura 5 C), foram contados cinco quadrados grandes, localizados nos quatro cantos e um central. O número de esporos por abelha foi obtido da seguinte fórmula:  $n = \text{esporos contados} \times 5 \times 10.000$ , para corrigir para a diluição e a amostragem. Quando não foi observado ao menos um esporo no quadrado pequeno, todos os 25 campos do quadrado maior foram contados e o número de esporos por abelha foi obtido pela seguinte fórmula:  $n = \text{esporos contados} \times 10.000$ .



**Figura 5.** Abelhas processadas para contagem de esporos de *Nosema* spp. A: Secagem e separação do abdômen. B: Maceração do abdomen de abelhas. C: Fotomicrografia de um campo do hemocitômetro com as setas indicando esporos de *Nosema* spp.

### 3.2.3.2 Número de abelhas com esporos de *Nosema*

Abelhas excedentes do pool de 30 operárias forrageiras do grupo LIQ e que foram coletadas nos meses de junho e de julho de 2014 foram utilizadas para a análise de indivíduos infectados por *Nosema* quanto à presença ou ausência de esporos de *Nosema* spp por meio de processamento individual. Ainda, abelhas moribundas que estavam rastejando ou caminhando na frente da colmeia e com dificuldade de retornar ao alvado foram coletadas para a mesma análise.

No laboratório as abelhas foram individualmente processadas segundo o método adotado por Pettis (2013), com a modificação do volume inicial de diluente reduzido para 50 µL de água destilada por intestino dissecado, em vez de 1 mL de água por abdômen de abelha.

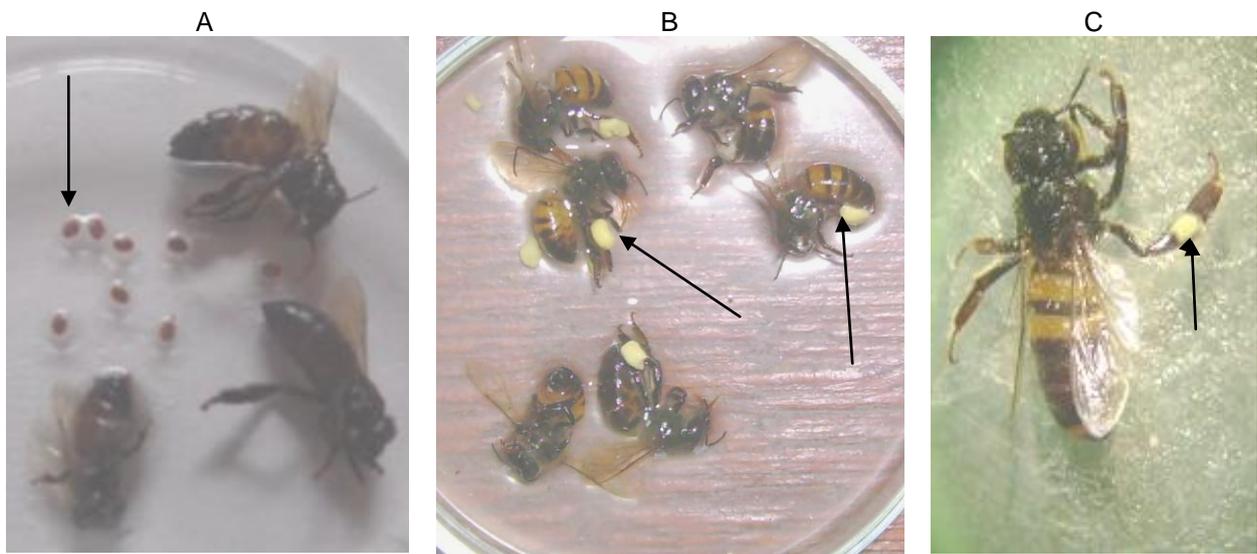
As abelhas foram removidas do etanol 70% e secadas sob papel filtro, individualmente transferidas para uma placa de petri e, sob microscópio estereoscópico com aumento de 4X, o intestino médio e posterior foram dissecados com auxílio de duas micropinças. A cada órgão (ventrículo e intestino posterior) dissecado foram adicionados 50 µL de água ultrapura e com auxílio das mesmas pinças o órgão foi macerado ainda na placa de petri. Outras observações macroscópicas dos órgãos foram consideradas, especialmente quanto à coloração do ventrículo e intestino posterior.

Uma gota do macerado foi pipetada e colocada sob lâmina e coberto com lamínula, levada a análise por microscópio ótico com aumento de 400X, onde dez campos microscópicos foram explorados para detectar a presença ou ausência de esporos.

Considerando que abelhas infectadas chegam a produzir milhões de esporos, quando uma amostra apresentou apenas alguns esporos (uma a cinco unidades de esporos) em todos os campos percorridos, esta foi considerada como não infectada em função de uma eventual contaminação instrumental, adaptando método adotado por Smith (2012), que considerou como negativas as amostras para as quais foram visualizados de dois a dez esporos em 25 campos observados.

### 3.2.4. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE INFESTAÇÃO POR *VARROA* E O PERCENTUAL DE OPERÁRIAS TRANSPORTANDO PÓLEN NAS CORBÍCULAS

A coleta de um *pool* de 30 abelhas foi realizada conforme descrito no item 3.2.3. No laboratório o conteúdo do frasco foi transferido para placa de petri e com auxílio de microscópio estereoscópio foi efetuada a contagem total de abelhas, número de *Varroa* que parasitavam as operárias (Figura 6 A) e o número de abelhas que carregavam *pellets* de pólen nas corbículas (Figura 6 B; Figura 6 C).



**Figura 6.** Abelhas separadas para contagem de *Varroa* e pólen. A: Seta indicando *Varroa* separadas das abelhas operárias. B e C: Setas indicando a presença de *pellets* de pólen nas corbículas de abelhas operárias

O percentual de infestação forética das operárias forrageiras por *Varroa* foi expressa em percentagem, considerando-se o número total de parasitos e o número de abelhas forrageiras de cada amostra. Por exemplo, se 03 (três) *Varroa* fossem visualizadas, seja em uma única abelha ou distribuídas em mais de uma das 30 abelhas, o percentual de infestação seria de 3/30, ou 10%. Da mesma forma, para a chegada de pólen, foi considerado o número de operárias que retornavam com *pellets* de pólen nas corbículas sobre o total de abelhas analisadas.

A utilização de métodos padronizados para determinação da infestação forética por *Varroa* na colônia, tais como a coleta de 200 a 250 operárias nutrizas (OIE, 2013; Dietmann et al., 2013) exige sucessivas aberturas da colmeia durante o inverno e a remoção de elevado número de operárias, o que poderia interferir na análise

epidemiológica da infecção por *Nosema* spp. Dessa forma, não foi medida a infestação por *Varroa* na colmeia, mas a taxa de infestação nas operárias forrageiras.

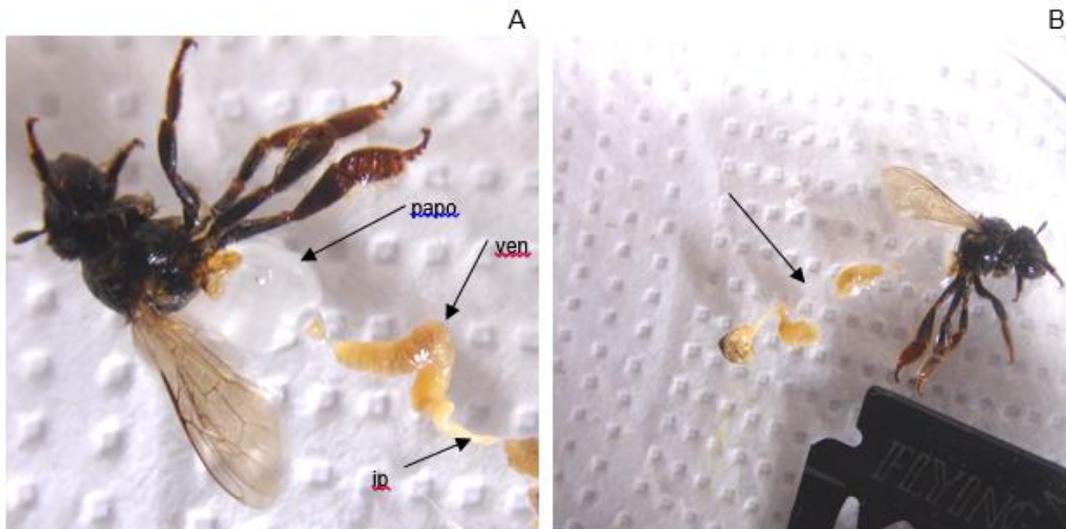
### 3.2.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Das colônias nas quais foi confirmada a presença de esporos no mês anterior, cerca de 100 abelhas foram aspiradas e transferidas para solução fixadora contendo formol 10% e armazenadas até o processamento histopatológico. Esta análise foi realizada para a verificação de lesões macroscópicas e microscópicas no intestino de abelhas que apresentavam taxa de infecção por *Nosema* spp. acima de 500 esporos por abelha.

No laboratório 15 abelhas foram separadas, nove com a presença de esporos no intestino e seis sem esporos, para exame histológico. Cada abelha foi colocada em placa de petri sob microscópio estereoscópico com aumento de 4X e os anéis abdominais foram removidos por pinçagem de maneira a expor os órgãos contidos no interior do abdômen para avaliação externa de alterações macroscópicas (Figura 7 A). O ventrículo e intestino posterior foram cuidadosamente dissecados, lavados em água destilada, e a camada de gordura superficial e parte dos tubos de Malpighi foram removidos por pinçagem.

O ventrículo foi segmentado em duas partes iguais (Figura 7 B), sendo uma parte macerada em 50  $\mu$ L de água ultrapura estéril para análise quanto à presença de esporos, conforme descrito em 3.2.3. A outra parte foi acondicionada em tubo de microcentrífuga contendo 1,0 mL de formol 10%, no qual foi mantida até o processamento histológico, segundo o método utilizado por Higes et al. (2008) e Maiolino et al. (2014).

No laboratório de histopatologia da PUCPR as peças foram removidas do fixador formol 10%, desidratadas em álcool-amônio em cinco etapas, diafanizadas em xilol em três etapas e emblocadas em parafina sólida. Os cortes histológicos foram realizados com micrótomo de 5  $\mu$ m, transferidos para lâmina microscópica e corados com HE e Giemsa.



**Figura 7.** Processamento de abelhas para análise histopatológica. A: Dissecção do intestino de abelha após a remoção dos anéis abdominais e a exposição do pro ventrículo (papo) com néctar, ventrículo (ven) e intestino posterior (ip). B: Seta indicando a segmentação do ventrículo em duas partes para análise histopatológica e presença de esporos.

### 3.2.6 DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE DE *NOSEMA* SSP. VIA GENOTIPAGEM

A diferenciação dos esporos de *Nosema* entre as duas espécies (*N. apis* e *N. ceranae*) foi realizada por análise genotípica. O excedente do macerado do *pool* de 30 operárias utilizadas para a contagem de esporos, conforme descrito em 3.2.3, foi estocado em tubo de centrifuga de 15 mL à -20 °C até o processamento para extração de DNA. A amplificação dos segmentos específicos para a espécie foi realizada por PCR Multiplex.

#### 3.2.6.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizados dois métodos: um protocolo de extração de DNA de bactérias de intestino de aves, adaptado de Zhu et al. (2002), utilizando fenol clorofórmio; e um protocolo de extração com o DNeasy® Plant Mini Kit QIAGEN, segundo orientações do fabricante. Este último vem sendo utilizado para o processamento de amostras para extração de DNA de *Nosema* (Klee et al., 2007; Gisder et al., 2010; Teixeira et al., 2013). Ambos os métodos foram precedidos de um tratamento para ruptura celular com a utilização de *beadbeater* (Figura 8), semelhante ao utilizado por Huang (2007).

As amostras do macerado intestinal de abelhas foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas a 2500 x *g* por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 500 µL de água ultrapura. Uma alíquota de 300 µL foi coletada e a ela adicionados 300 µL de lisozima (2mg/mL), e incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Na sequência foram adicionados 300 µL de SDS 1% e 6 µL de proteinase K (10mg/mL), e a amostra foi incubada por duas horas a 37 °C.

A solução foi transferida para novos tubos de 2,0 mL contendo bolas de zircônia de 0,1mm de diâmetro até o marcador de 0,5 mL do tubo. Foram adicionados 300 µL da mistura fenol:clorofórmio (1:1) e o tubo foi submetido a agitação por três intervalos de um minuto no *beadbeater* em alta velocidade, (MINI BEADBEATER–8 Biospec Products). Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação a 13000 rpm (aproximadamente 18000 x *g*) por 5 minutos, e a fração aquosa (aproximadamente 500 µL) foi transferida para novo tubo.



**Figura 8.** Rompedor de células tipo *beadbeater* utilizado para o pre-tratamento na extração de DNA de esporos de *Nosema* spp.

Do total de 81 amostras processadas, 31 foram submetidas à extração segundo o protocolo do Kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit QIAGEN, e as restantes foram processadas conforme se segue.

Os resíduos de fenol:clorofórmio foram removidos pela adição de igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugados por dez minutos a 18000 x *g*, e o sobrenadante de aproximadamente 400 µL foi transferido para novo tubo. À amostra foi adicionado 1/5 do seu volume de NaCl 5M e 1/10 de CTAB 10%, incubada a 65 °C por

cinco minutos e centrifugada por dez minutos a 18000 x *g* para precipitação dos polissacarídeos.

O sobrenadante de aproximadamente 200 µL foi transferido para novo tubo e adicionado 1/10 do volume de acetado de sódio 3M e igual volume de etanol absoluto gelado para precipitação do DNA. O conteúdo foi suavemente misturado por inversão e incubado em freezer a -20 °C por 16h. Posteriormente, o material foi centrifugado por cinco minutos a 18000 x *g*. O *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70% e misturado por inversão e novamente centrifugado por 10 min a 18000 x *g*. O sobrenadante foi removido por inversão e o *pellet* foi deixado secar em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de TE+ RNase e estocado a -20 °C até a quantificação de DNA e a amplificação por PCR.

Para a determinação da quantidade e pureza do DNA extraído uma alíquota de 1,0 µL do DNA extraído foi pipetada e analisada em espectrofotômetro NANODROP 2000 Spectrophotometer (THERMO SCIENTIFIC).

### 3.2.6.2 Amplificação do gene RNAr 16S por PCR multiplex

O gene do RNAr 16S foi amplificado pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando simultaneamente os *primers* mnceranae-f (5'-cgtaaagtgtagataagatggtt-3') e o mnapis-f (5'-gcatgtctttgacgtactatg -3'), e muniv-r (5-gacttagtagccgcttctc -3'), com o objetivo de amplificar uma sequência de 143 pares de bases (pb) da *N. ceranae*, e 224 pares de bases (pb), da *N. apis* (Fries et al., 2013). O programa utilizado para amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de amplificação, compostos por desnaturação a 95 °C por 30 s, hibridação a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 60 s, seguidos de uma extensão final de 5 min a 72 °C. Todas as amostras foram amplificadas em termociclador Mastercycler MJ Research PTC-200.

O volume final de cada reação foi de 25 µL, sendo os reagentes utilizados 2,25 µL de tampão de PCR 10X, 4 µL de cloreto de magnésio 50 mM, 4 µL de deoxirribonucleotídeos trifosfato 1,25 mM, 1,25 µL de cada *primer* Forward do Mnceranae e Mnapis e 1,5 µL do primer Reverse Muniv-R a 10 pmol/µL, 0,2 µL de Taq DNA polimerase, 11,55 µL de água ultrapura estéril e 2 µL de DNA da amostra (Tab. 1).

**Tabela 1.** Componentes e o respectivo volume e a concentração de reagentes utilizados na reação de PCR multiplex para amplificação do gene RNAr 16S do DNA de esporos de *Nosema* spp.

	<b>Volume da reação</b>	<b>Concentração</b>	<b>Concentração final</b>
Tampão PCR	2,25 µL	10x	1 x
Cloreto de Magnésio	1,0 µL	50mM	2mM
Dntp	4,0 µL	1,25 mM/µL	0,2 mM
Iniciador Mnceranae	1,25 µL	20 pmol/µL	1,0 pmol
Inic Mnapis	1,25 µL	20 pmol/µL	1,0 pmol
Iniciador inverso	1,5 µL	20 pmol/µL	1,2 pmol
Taq polimerase	0,2 µL	5 U/µL	1 U
DNA	2,0 µL	Variável	Variável
Água ultrapura	11,55 µL		

Os produtos de amplificação (5 µL) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% preparados em tampão TBE (40mM Tris, 40mM ácido bórico 100%, 1mM EDTA pH 8,0), corados com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e fotografados com sistema digital KODAK EDAS (*Eletrophoresis Documentation and Analysis Systems*) 290, para identificação e comparação das bandas amplificadas com uso de padrão de peso molecular (DNA ladder Uniscience).

### 3.2.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MEL DAS COLMEIAS

Para estabelecer uma possível relação da infecção por *Nosema* spp. com a produção de mel, foi avaliado o depósito de mel nas melgueiras de cada colmeia e a colheita de mel da primavera subsequente ao período de outono e inverno de 2014, encerrada em 21/12/2014.

A estimativa da produção das colmeias foi realizada via inspeção das melgueiras, segundo o método utilizado por Medina-Flores et al. (2014). O total de mel operculado nos quadros foi avaliado por dois membros da equipe, estimando-se o peso por quadro. Quando havia estoque suficiente que justificasse a colheita, esta era realizada e o total colhido foi pesado separadamente por apiário envolvido no experimento. Neste caso, quando necessário, foi realizado um ajuste na distribuição entre o avaliado e o total colhido por apiário.

Os apiários e colmeias que foram submetidos ao manejo de primavera não foram incluídos na avaliação.

### 3.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O apiário de 15 colmeias, que tiveram avaliação mensal da infecção por *Nosema* spp. durante um ano, foram analisadas pelo teste-t (Student's t-test), presumindo variâncias diferentes (Petrie e Watson, 2006; Luiz, 2009).

Para determinar se houve diferença na proporção entre as colônias perdidas durante o período foi utilizado o Teste de Qui Quadrado, e as proporções calculadas pelo Teste Exato de Fisher (Petrie e Watson, 2006).

Para avaliar se houve diferença significativa quanto ao fator tempo entre os tratamentos (SEM, SOL, LIQ), as seguintes variáveis dependentes foram consideradas: o grau de infecção por *Nosema* através do número de esporos, a taxa de infestação por *V. destructor* e o percentual de forrageiras que portavam *pellets* de pólen nas corbículas ao retornarem para a colmeia.

A interação entre os fatores tempo e as variáveis número de esporos, taxa de infestação por *Varroa* e percentual de operárias forrageiras com pólen foram submetidas a análise de variância multifatorial (ANOVA). Comprovada a interação entre os fatores e a variável, foi realizado o desmembramento dos fatores para cada variável e aplicado o teste de Bonferroni ou teste de Tukey (ANOVA One Way), conforme o caso. Para avaliar a correlação entre as variáveis Infecção por *Nosema*, infestação por *Varroa* e percentual de abelhas com pólen, foi utilizado o Teste de Correlação de Pearson para as três variáveis envolvidas. Ainda, foi utilizado o teste t (student's t-test) para avaliar se houve diferença entre o número de abelhas analisadas individualmente quanto a infecção por *Nosema* e para determinar a diferença entre abelhas moribundas e forrageiras (Petrie e Watson, 2006; Luiz, 2009). Todas as análises foram realizadas aplicando-se o software Statgraphics 4.1 para o teste de análise de variância multifatorial, correlação de Pearson, teste de Bonferroni e teste de Tukey. O programa Prisma 3.0 foi utilizado para os demais testes estatísticos. Para todos os testes foi considerado o nível de significância de  $P \leq 0,05$ .

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 PERDA DE COLÔNIAS

Quando considerados os três tratamentos em conjunto (SEM, SOL e LIQ), a perda total de colônias nos meses de maio, junho, julho e agosto foi de 19% (22/116). Não houve diferença significativa ( $p = 0,892$ ) na perda de colônias entre os três diferentes tratamentos (Tab. 2). Do total de perdas, 27% (6/22) foram por colapso das colônias, possivelmente em função da perda de rainha, sendo quatro no grupo SOL e duas no grupo LIQ. O restante das perdas (73%; 16/22) ocorreram por abandono total da colmeia, possivelmente por migração.

**Tabela 2.** Número e percentual de colônias de abelhas perdidas durante os meses de maio a agosto 2014, nos 3 grupos (tratamentos) e total, região metropolitana de Curitiba PR. SEM (sem tratamento suplementar de inverno), SOL (suplementação com alimento pastoso) e LIQ (suplementação com xarope líquido).

Colônias	Grupos			Total
	SEM	SOL	LIQ	
<b>Perdidas (%)</b>	5 (13,8) <sup>a</sup>	10 (17,0) <sup>a</sup>	7 (29,2) <sup>a</sup>	22 (19,0) <sup>a</sup>
<b>Não perdidas (%)</b>	31 (86,2) <sup>a</sup>	46 (83,0) <sup>a</sup>	17 (70,8) <sup>a</sup>	94 (81,0) <sup>a</sup>
<b>Total (%)</b>	36 (100)	56 (100)	24 (100)	116 (100)

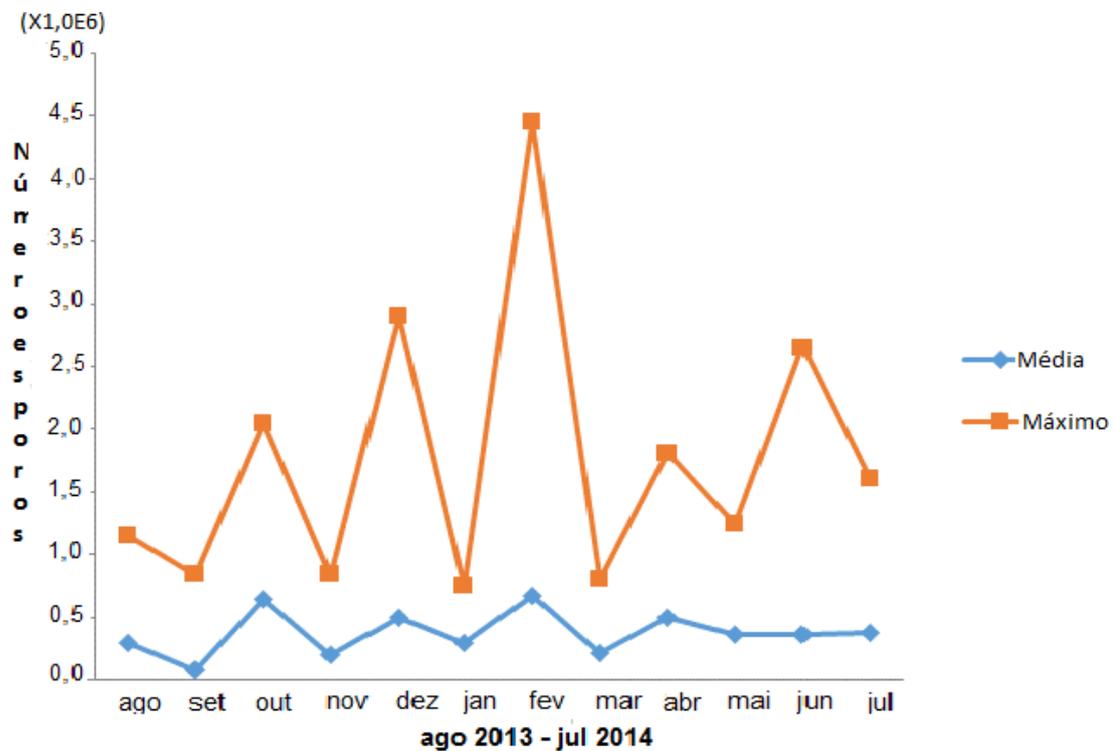
Letras idênticas na linha não representam diferença entre os tratamentos. Teste de  $X^2$ ,  $p = 0,892$ .

#### 3.3.2 ACHADOS LABORATORIAIS

##### 3.3.2.1 Número de esporos de *Nosema* spp. por abelha nas colônias

Quando considerados os dados da avaliação anual em um apiário, não foram encontradas diferenças na distribuição da média mensal de esporos de *Nosema* spp. por abelha entre o período de outono e inverno, em relação ao demais meses do ano

(Fig. 9), nem diferença na média do número de esporos entre os meses durante todo o ano.



**Figura 9.** Média mensal e número máximo de esporos de *Nosema* spp. por abelha na colônia entre ago. 2013 - jul. 2014, em um apiário com 15 colmeias. A linha inferior (azul) representa a média de esporos por abelha nas colônias no respectivo mês, e a linha superior (vermelha) representa a colônia que teve o pico máximo de esporos no respectivo mês.  $p = 0,620$  analisado pelo teste  $t$  (Student's  $t$ -test).

Algumas colônias apresentaram altos picos no número de esporos em alguns meses, conforme representado pela linha vermelha da Fig. 9. Entretanto, se essas amplitudes no número médio de esporos estão vinculadas as perdas de colônias, as conclusões estão apresentadas nos itens seguintes. Essas variações não ocorreram sempre nas mesmas colônias e devem-se a possíveis diferenças causadas pela inclusão de mais indivíduos infectados na amostra composta pelo *pool*, conforme demonstrado na análise individual da Tab. 7 (seção 3.3.2.2). Essa grande oscilação entre os meses do ano também demonstra a dificuldade na adoção de medidas como o tratamento da doença com base no número de esporos, recomendado quando a infecção atinge mais de um milhão de esporos por abelha na colônia (Traver et al., 2012).

Esses achados não correspondem aos encontrados na pesquisa de Traver et al. (2012) e Mulholland et al. (2012), que encontraram níveis de infecção menores no outono e maiores no final do inverno e na primavera nos EUA. A partir dos dados deste trabalho pode-se também questionar recomendações da melhor época para

diagnosticar a doença nosemose propostos por outros autores (Plavša et al., 2013), que indicaram o final do inverno e no início de primavera, quando haveria um maior número de abelhas operárias mais idosas, fato que levaria ao aumento da infecção medida em número de esporos por abelha.

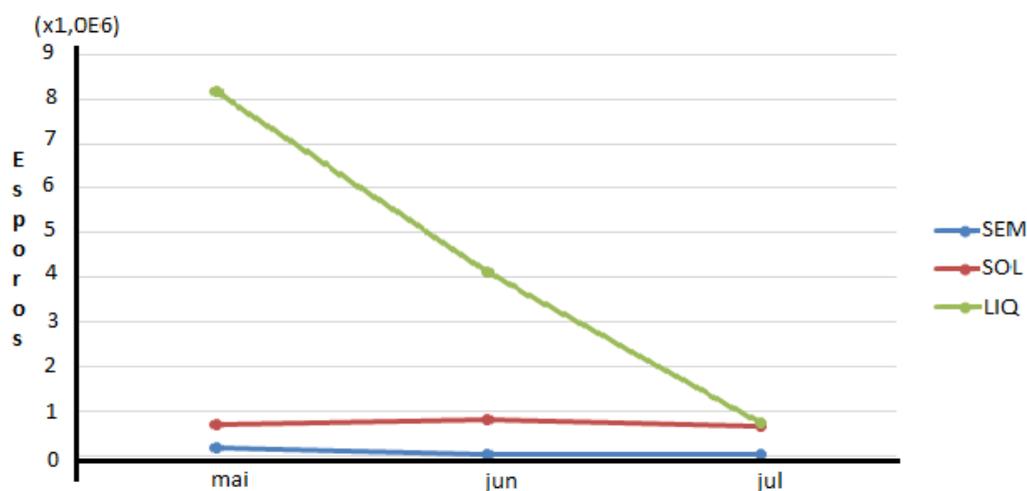
Na avaliação do período de outono e inverno (maio, junho e julho) envolvendo 116 colônias, houve diferença no número médio de esporos por abelha na colônia entre os três tratamentos entre aqueles meses, conforme demonstrado na Fig. 10.

A média de esporos no período manteve-se estável no tratamento SOL; o tratamento SEM apresentou diferença no mês de maio em relação a junho e julho, e o grupo LIQ teve diferença considerável entre os três meses avaliados (Tab.3).

**Tabela 3-** Média mensal e desvio padrão do número de esporos de *Nosema* spp. por abelha nos 3 tratamentos avaliados durante mai. – jul. 2104, localizados na região metropolitana de Curitiba PR. SEM (sem tratamento suplementar de inverno), SOL (suplementação com alimento pastoso) e LIQ (suplementação com xarope líquido).

Meses	Grupos		
	SEM	SOL	LIQ
<b>Mai</b>	173.611 ( $\pm 207.118$ ) <sup>b</sup>	722.768 ( $\pm 166.064$ ) <sup>b</sup>	8.187.500 ( $\pm 253.667$ ) <sup>d</sup>
<b>Junho</b>	25.000 ( $\pm 219.682$ ) <sup>a</sup>	809.434 ( $\pm 170.699$ ) <sup>b</sup>	4.119.130 ( $\pm 259.123$ ) <sup>c</sup>
<b>Julho</b>	51.612 ( $\pm 44.362$ ) <sup>a</sup>	672.917 ( $\pm 41.310$ ) <sup>b</sup>	744.737 ( $\pm 352.207$ ) <sup>b</sup>

Letras diferentes representam diferenças entre os grupos e os meses ( $p < 0,05$ ). Analisado por ANOVA *multiple range test* e teste de Bonferroni para desdobramento dos tratamentos.



**Figura 10-** Interação entre os fatores tempo (mai 2014 – jul 2014) e a média do número de esporos de *Nosema* spp. por abelha nos três tratamentos (SEM, SOL, LIQ).

Da mesma forma, do total de amostras que apresentaram esporos de *Nosema* spp., independentemente da quantidade, houve diferença entre os três tratamentos, principalmente entre o grupo SEM e o grupo LIQ (Tab. 4). Esses dados indicam a possível influência do manejo alimentar suplementar de inverno na epidemiologia da nosemose, especialmente a forma do suplemento administrado.

**Tabela 4.** Número e percentual de amostras que apresentaram a presença de esporos de *Nosema* spp. durante mai – jul 2014 nos três grupos, região metropolitana de Curitiba PR. SEM (sem tratamento suplementar de inverno), SOL (suplementação com alimento pastoso) e LIQ (suplementação com xarope líquido).

Colônias	Grupos		
	SEM	SOL	LIQ
<b>Com esporos</b>	44 (44,5%) <sup>a</sup>	112 (71,8%) <sup>b</sup>	62 (94,0%) <sup>c</sup>
<b>Sem esporos</b>	55 (55,5%) <sup>a</sup>	44 (28,2%) <sup>b</sup>	04 (06,0%) <sup>c</sup>
<b>Total</b>	99 (100,0%)	156 (100,0%)	66 (100,0%)

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças entre os grupos, analisado pelo teste X<sup>2</sup> quadrado (teste exato de Fisher;  $p < 0,05$ ).

Em relação às colônias perdidas e não perdidas, não foram detectadas diferenças significativas no número médio de esporos de *Nosema*, quando consideradas apenas aquelas que apresentaram esporos nas amostras (Tab. 5). Nessa análise a média ultrapassa um milhão de esporos em função da elevada infecção verificada nos meses de maio e junho no grupo LIQ.

Das amostras processadas para a identificação da espécie de *Nosema* envolvida, em 13 do grupo perdidas e 43 do grupo não perdidas foi detectada a presença da *N. ceranae*. Ainda, em uma das colônias perdidas e em quatro das colônias não perdidas também foi detectada a presença de esporos de *N. apis*. Devido ao baixo número de amostras (colônias) que apresentaram esporos de *N.apis*, não foi possível estabelecer uma relação do envolvimento das duas espécies com a perda de colônias (Tab.5).

**Tabela 5.** Média e desvio padrão do número de esporos por abelha nas colônias infectadas (com esporos nas amostras), considerando as perdas (coleta anterior a perda) e não perdidas de todos os grupos e o número de colônias diagnosticadas para as espécies de *Nosema* spp.

Colônias	Média de esporos	Espécie diagnosticada	
		<i>N.ceranae</i>	<i>N. ceranae</i> + <i>N.apis</i>
<b>Perdidas</b>	1.803.000 ( $\pm 543.000$ ) <sup>a</sup>	12	1
<b>Não perdidas</b>	1.246.000 ( $\pm 152.900$ ) <sup>a</sup>	39	4

Mesmas letras na mesma coluna não representam diferenças;  $p = 0,297$ ; teste-*t* (Student's *t*-test).

Também não houve diferença entre o número de colônias perdidas e não perdidas, quando consideradas as amostras com esporos de *Nosema* em pelo menos uma coleta (infectadas), independentemente do número de esporos por abelha na colônia (Tab. 6).

**Tabela 6.** Número de colônias que apresentaram esporos de *Nosema* spp. em pelo menos uma das amostras coletadas entre os meses de maio a agosto de 2014, região metropolitana de Curitiba PR.

Colônias	Infecção por <i>Nosema</i>		Total
	Com esporos	Sem esporos	
<b>Perdidas</b>	19 (86,4%) <sup>a</sup>	03 (13,6%) <sup>b</sup>	22 (100,0%)
<b>Não perdidas</b>	86 (91,5%) <sup>a</sup>	08 (8,5%) <sup>b</sup>	94 (100,0%)
<b>Total</b>	105	11	116

Letras iguais na mesma coluna não representam diferença entre as colônias, analisado pelo teste  $X^2$  quadrado ( $p > 0,05$ ).

Apesar do grupo LIQ ter apresentado maior número de esporos por abelha nos meses de maio e junho (Tab. 3), não houve diferença na perda de colônias em relação aos demais grupos que apresentaram menor número de esporos.

Esses dados indicam que não há relação direta entre o número de esporos de *Nosema* spp. e a perda de colônias durante o outono e inverno, divergindo da relação encontrada na infecção por *N. ceranae* na Espanha (Higes et al., 2008), e se assemelhando ao estudo epidemiológico conduzido por Gisder et al. (2010), que não encontraram uma relação direta entre os níveis de infecção por *Nosema* spp. com a

mortalidade de colônias na Alemanha, caso em que houve a predominância da espécie *N. apis*.

### 3.3.2.2 Número de abelhas com esporos de *Nosema*.

Na análise individual de abelhas infectadas com *Nosema* (com presença de esporos) foram detectadas diferenças entre as amostras coletadas nos meses de junho e julho no grupo LIQ, conforme a Tab. 7.

**Tabela 7** – Número e respectivo percentual de abelhas analisadas individualmente quanto à presença de esporos de *Nosema* spp. no tratamento LIQ nos meses de junho e julho de 2014, em Rio Branco do Sul – PR.

Abelhas	Mês de análise	
	Junho	Julho
Com esporos	45 (45%) <sup>a</sup>	13 (15%) <sup>b</sup>
Sem esporos	55 (55%) <sup>a</sup>	65 (85%) <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>100 (100%)</b>	<b>88 (100%)</b>

Letras diferentes na mesma linha representam diferença entre os meses, analisado pelo teste X<sup>2</sup> quadrado (teste exato de Fisher;  $p < 0,05$ ).

Também houve diferença na infecção por *Nosema* spp. entre as abelhas forrageiras normais e as abelhas moribundas coletadas na frente das colmeias (Tab. 8). Entretanto, eram esperadas mais abelhas infectadas entre as moribundas do que entre as forrageiras sem sinais clínicos. Esta análise indica que os sinais clínicos atribuídos à nosemose, como abelhas doentes e mortas em torno da colmeia (OIE, 2013) não são patognomônicas da doença. Estes sinais foram verificados em algumas colônias durante o outono e inverno nos apiários envolvidos no estudo.

**Tabela 8** – Número e respectivo percentual de abelhas analisadas individualmente para esporos de *Nosema* spp. estratificadas em moribundas (rastejando na frente da colmeia ou alvado) e forrageiras normais coletados da mesma colônia (controle) durante o inverno de 2014, independentemente do tratamento, região metropolitana de Curitiba PR.

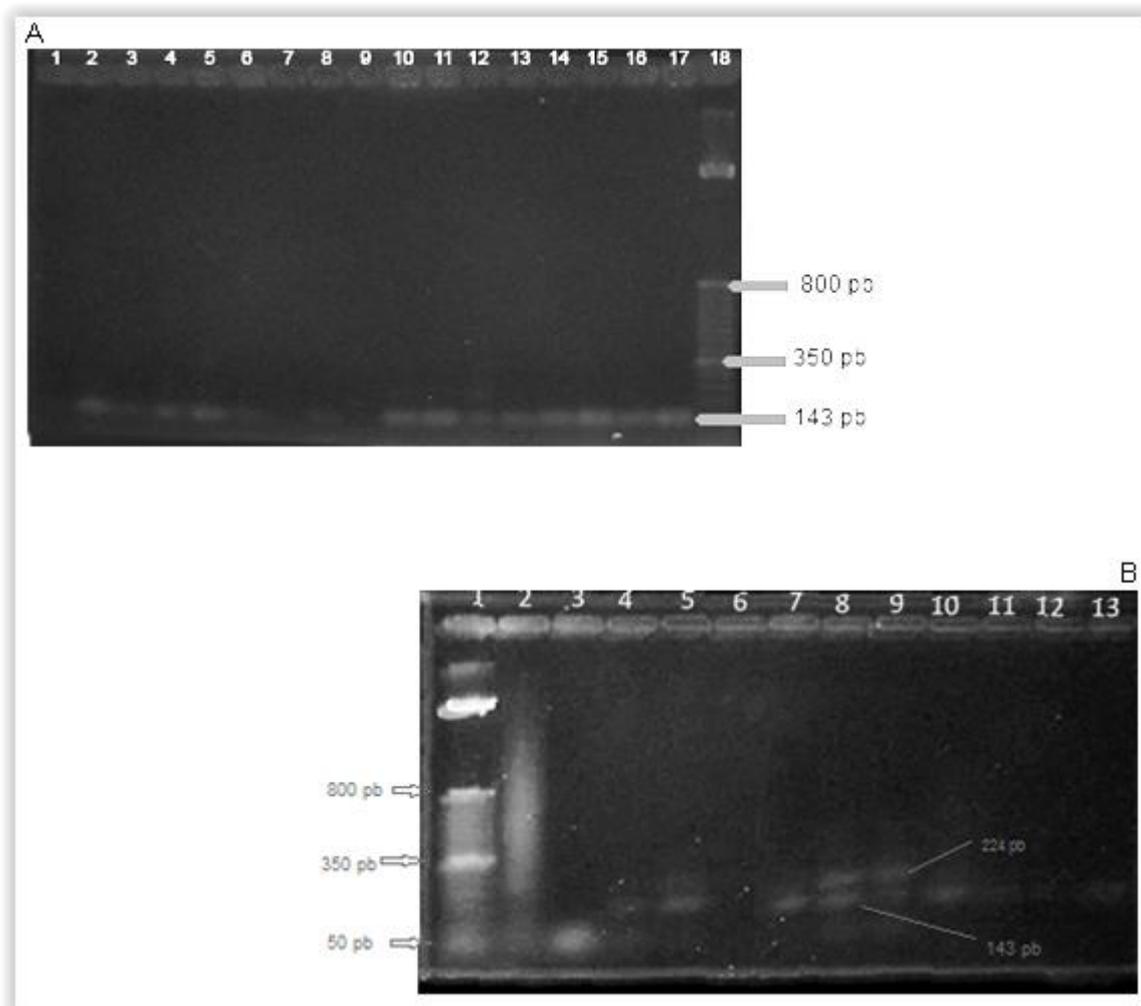
Abelhas	Moribundas	Sem Sinais
Com esporos	1 (1,5%) <sup>a</sup>	10 (11,0%) <sup>b</sup>
Sem esporos	69 (98,5%) <sup>a</sup>	80 (89,0%) <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>70 (100%)</b>	<b>90 (100%)</b>

Letras diferentes na mesma linha representa diferença entre os meses, analisado pelo teste X<sup>2</sup> quadrado (teste exato de Fisher;  $p < 0,05$ )

A possível infecção em outros órgãos além do intestino poderia explicar a maior virulência da *N.ceranae* em relação a *N. apis*, sem a manifestação de sinais clínicos de diarreia. DNA desta espécie foi extraído de glândulas hipofaríngeas, tubos de Malpighi, cérebro e tecido adiposo (Chen et al., 2009), entretanto estas infecções ainda precisam ser comprovadas.

### 3.3.2.3 Genotipagem dos esporos por PCR multiplex

De 81 amostras com esporos submetidas a PCR que tiveram sucesso na amplificação do fragmento de DNA para a determinação da espécie de *Nosema* spp., 74 (91,4%) amplificaram apenas para a *N. ceranae* e sete amostras (8,6%) também amplificaram para *N.apis*, conforme Figura 11 abaixo.



**Figura 11.** Sequências amplificadas visualizadas em gel de agarose 1,5%. A) amplicons de 143 pb de *N.ceranae* nas canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16 e 17. A amostra da canaleta 12 também amplificou para *N.apis*; a canaleta 18 contém bandas do DNA *ladder*, com setas indicando o tamanho de algumas bandas selecionadas. B) as canaletas 8 e 9 (setas) possuem bandas do amplicon de 224 pb da *N. apis* e de 143 pb da *N.ceranae*; as canaletas 4, 5, 7 e 10 possuem apenas a banda de 143 pb da *N.ceranae*. A canaleta 1 contém banda do DNA *ladder* e a 3 controle negativo.

A totalidade (100%) das amostras de DNA amplificadas tiveram a presença da *N. ceranae*, nas infecções e apenas 8,6% apresentaram a co-infecção com a *N. apis*, não conferem com as situações encontradas nos levantamentos efetuados em países europeus. Gisder et al. (2010) na Alemanha e Forsgren et al. (2013) na Suécia relatam a predominância da *N. apis* sobre a *N. ceranae* em anos sucessivos de estudos, sugerindo que o clima mais frio ao Norte da Europa tenha influência na predominância da espécie *N. apis* nesta região, quando comparados aos índices de 50% de co-infecção com *N. apis* e *N.ceranae* em apiários da Espanha.

Apesar das colmeias do estudo estarem localizadas em uma região fria do Brasil, prevaleceu a presença da *N. ceranae*, inclusive numa relação superior aos 50% de co-infecção da Espanha (Botias et al., 2013).

Esses dados vêm de encontro ao estudo experimental de Natsopoulou et al. (2014) que, em condições laboratoriais demonstrou a existência de competição na infecção mista pelas duas espécies de *Nosema*, onde a ordem de inoculação da espécie determinou a infecção inicial, entretanto a *N. ceranae* se mostrou mais dominante em relação a *N. apis*.

É possível que a *N. ceranae* esteja presente em abelhas africanizadas do Brasil há muito tempo, conforme sugerido por Teixeira et al. (2013), e tenha estabelecido uma relação de equilíbrio, denominado tolerância pelo hospedeiro através do tempo. O mecanismo relacionado a tolerância ainda não está bem definido, possivelmente havendo envolvimento de variáveis genéticas, como demonstrado no estudo de Huang et al. (2014). Mesmo assim, fatores comportamentais como hábitos higiênicos e a influência da ação da microbiota intestinal precisam ser pesquisados. Mendoza et al. (2014b) não puderam determinar a causa da resistência à infecção por *N. ceranae* através da seleção sobre gerações, mas detectaram menores infecções em abelhas africanizadas do que em linhagens europeias puras no experimento conduzido no Uruguai.

#### 3.3.2.4 Análise histopatológica

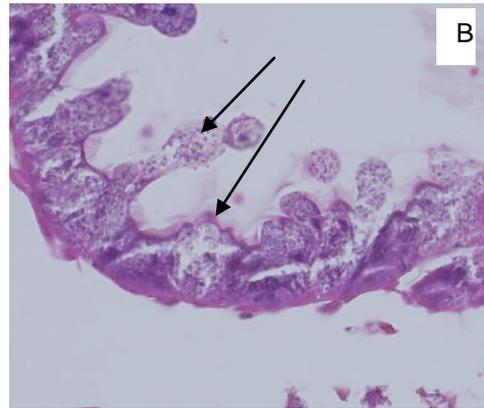
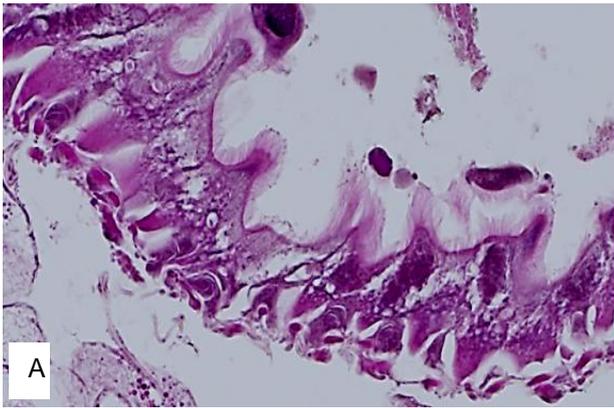
Na avaliação externa dos órgãos intestinais (ventrículo e intestino delgado) não foram observadas alterações morfológicas sob aumento de 4X entre abelhas infectadas e não infectadas com *Nosema* spp. Algumas peças apresentaram diferenças na coloração (Fig. 13), possivelmente relacionada à cor do conteúdo intestinal, tendo a maior parte apresentada cores marrom e amarela.



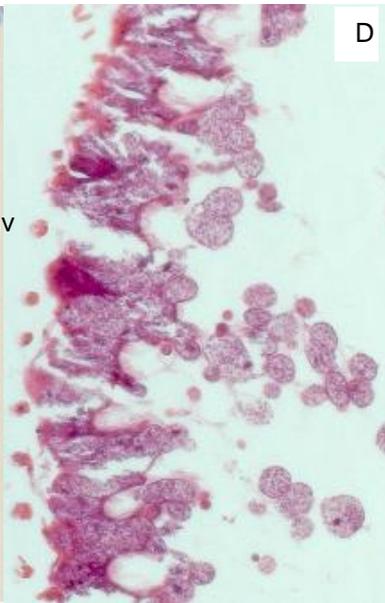
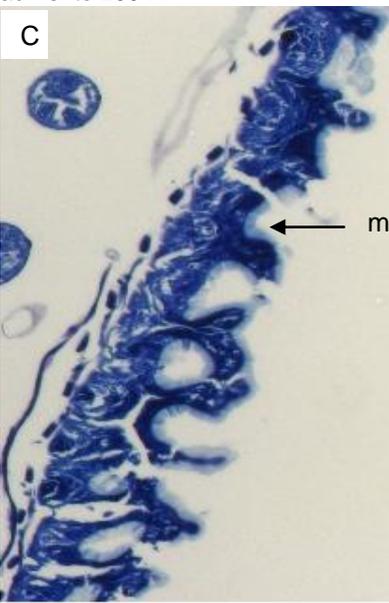
**Figura 12.** Diferentes aspectos macroscópicos na coloração externa de ventrículos (ven) e intestino posterior (ip) de abelhas.

Outra observação macroscópica verificada durante a separação e maceração dos ventrículos foi uma menor resistência a fragmentação naqueles órgãos com altas concentrações de esporos (acima de 2 milhões/abelha) em relação àquelas sem infecção, que permaneceram mais unidas em uma substância pegajosa. Órgãos esbranquiçados e frágeis com menor integridade física da parede intestinal e membrana peritrófica são patologias relacionadas à infecção por *Nosema* (OIE, 2013; Maiolino et al., 2014).

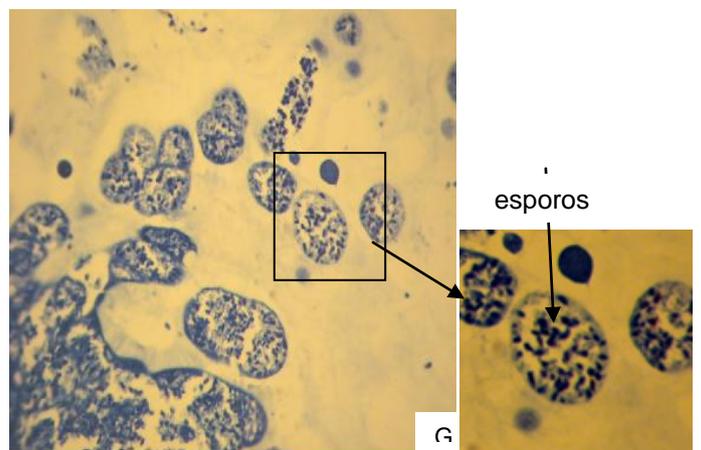
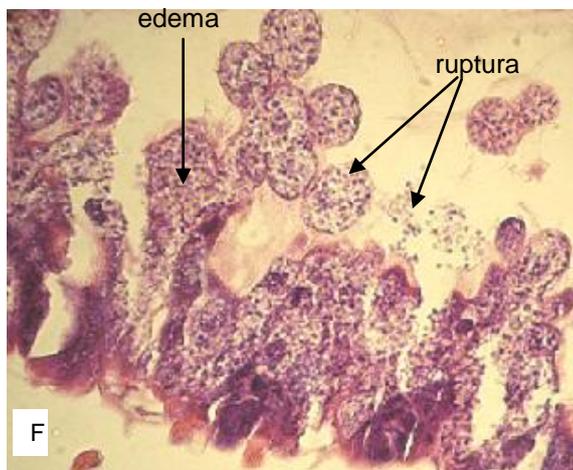
Na avaliação microscópica dos cortes histológicos do ventrículo (Fig. 14) foi observado que as células epiteliais (enterócitos) na região apical do citoplasma estavam ocupadas por diferentes formas de esporos de *Nosema* spp., com grande número de formas basofílicas, o que caracteriza esporos maduros (Higes et al., 2006).



A: Corte histológico de ventrículo de abelha sem infecção, B: Tecido ventricular com células infectadas por esporos de *Nosema* demonstrando falhas na integridade tecidual, enterócitos rompidos e descontinuidade de microvilosidades (setas). Coloração HE aumento 200 X.



C e F: Tecido ventricular sem infecção mostrando a integridade das microvilosidades (mv) e D: Tecido ventricular com células parasitadas com *Nosema* spp. Aumento 400 X, coloração HE (D,E) e C coloração Giemsa (C)



F: Tecido ventricular infectado, edema e ruptura celular na região apical dos enterócitos G: Esporos basófilos (maduros) de *Nosema* spp na região apical do citoplasma de enterócitos, aumento 400 X, F(HE) e G (Giemsa)

**Figura 13. Fotomicrografia de cortes histopatológicos de intestino de abelhas corados com HE(A,B,D,E,F) e Giemsa (C,G).**

Não foi observada infecção nos enterócitos da porção final do intestino de abelhas operárias infectadas, apesar da presença de esporos de *Nosema* spp. em macerados nesta porção intestinal.

### 3.3.3 PRODUÇÃO DE MEL

A produção da primeira colheita de mel foi muito aquém da registrada em anos anteriores para a época nos mesmos apiários envolvidas na pesquisa (dados não mostrados), resultado que foi atribuído às condições climáticas da primavera de 2014, que foram bastante variáveis, com períodos de clima seco e frio, o que não permitiu uma boa e propícia produção de néctar pelas espécies vegetais da região.

Não houve diferença na média da produção de mel da primeira colheita entre os três tratamentos (Tab. 9). Entretanto, a variação foi maior nos grupos suplementados (SOL e LIQ), cujo quartil superior apresentou produção de 14,3 kg e 12,6 kg respectivamente, enquanto o grupo não suplementado (SEM) produziu 9,3 kg de mel.

Esses dados sugerem que a suplementação de inverno induz uma melhor e mais rápida resposta na capacidade produtiva dessas colônias.

**Tabela 9** - Média e desvio padrão da produção de mel, em kg por colmeia, produção da primavera de 2014, nos três tratamentos. SEM (sem tratamento suplementar de inverno), SOL (suplementação com alimento pastoso) e LIQ (suplementação com xarope líquido), região metropolitana de Curitiba PR.

Grupos	Prod. de mel (kg)
SEM	5,55 + (3,08) <sup>a</sup>
SOL	8,98 ± (7,32) <sup>a</sup>
LIQ	6,23 ± (6,23) <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma coluna não representam diferenças. ( $p = 0,167$  ANOVA *one way*)

Os diferentes níveis de infecção por *Nosema* spp. verificados entre os tratamentos durante o inverno não interferiu na subsequente produção de mel. Dados de literatura têm revelado perda na produção devido a nosemoses. Bravo et al. (2014) citam uma redução de 42% na produção de mel em colônias com *N. ceranae* no Chile, enquanto Botias et al. (2013) trabalhando com colmeias na Espanha, demonstraram haver um decréscimo na produção de mel quando não houve controle da *N. ceranae*.

Provavelmente pela presença de boas floradas ainda durante o inverno no presente estudo, demonstradas pelo transporte de pólen pelas forrageiras, as colônias recuperaram as condições fisiológicas para a coleta de néctar e armazenamento de mel. No entanto, a comprovação dessa hipótese demandaria um estudo específico.

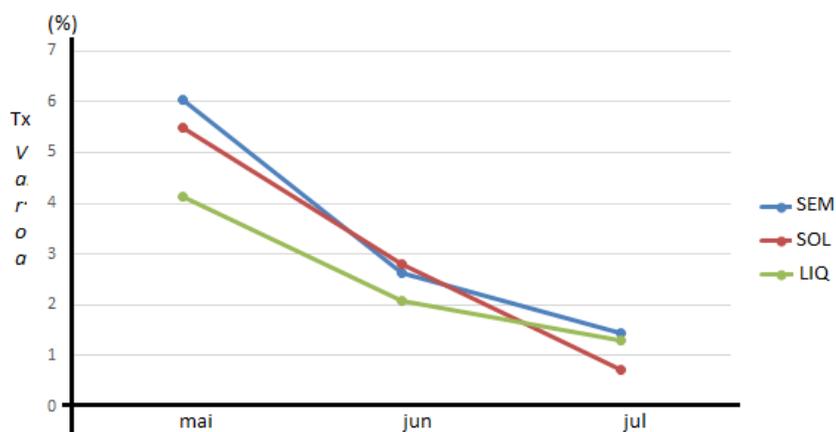
### 3.3.4 INFESTAÇÃO FORÉTICA POR *Varroa destructor* EM ABELHAS OPERÁRIAS FORRAGEIRAS

O percentual de infestação por *Varroa* nas abelhas operárias forrageiras da colônia sofreu declínio durante o período analisado em todos os tratamentos (Tab. 10; Fig. 16). Maiores taxas de infestações por *Varroa* durante o outono são descritos em trabalhos envolvendo abelhas europeias (Dainat et al., 2012).

**Tabela 10.** Média mensal e desvio padrão da infestação (%) por *Varroa* nas abelhas forrageiras da colônia nos grupos e a média mensal de todos os grupos avaliados durante mai – jul. 2014, na região metropolitana de Curitiba PR. SEM (sem tratamento suplementar de inverno), SOL (suplementação com alimento pastoso) e LIQ (suplementação com xarope líquido).

Mês	Tratamentos			Todos
	SEM	SOL	LIQ	
Maio	6,03 ( $\pm 0,50$ ) <sup>a</sup>	5,50 ( $\pm 0,70$ ) <sup>a</sup>	4,12 ( $\pm 0,86$ ) <sup>a</sup>	5,18 ( $\pm 0,41$ ) <sup>a</sup>
Junho	2,62 ( $\pm 0,75$ ) <sup>b</sup>	2,85 ( $\pm 0,58$ ) <sup>b</sup>	2,04 ( $\pm 0,88$ ) <sup>b</sup>	2,50 ( $\pm 0,43$ ) <sup>b</sup>
Julho	1,45 ( $\pm 0,76$ ) <sup>c</sup>	0,72 ( $\pm 0,61$ ) <sup>c</sup>	1,30 ( $\pm 0,97$ ) <sup>c</sup>	1,16 ( $\pm 0,46$ ) <sup>c</sup>

Letras diferentes entre as linhas e colunas representam diferenças entre os tratamentos e os meses, analisado pelo ANOVA *multiple range test* ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Interação entre os fatores tempo (mai. – jul. de 2014) e a infestação (%) do parasito *Varroa* nas abelhas forrageiras nos 3 tratamentos. SEM (sem tratamento suplementar de inverno), SOL (suplementação com alimento pastoso) e LIQ (suplementação com xarope líquido).

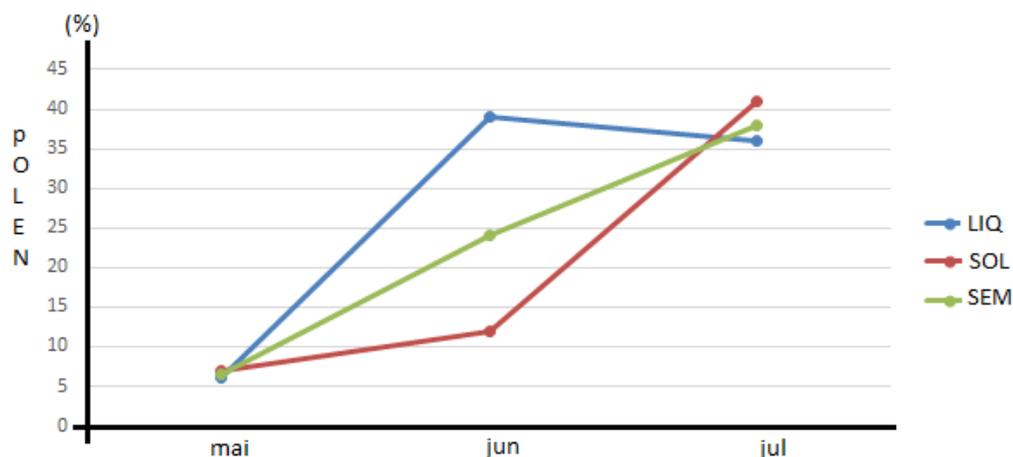
### 3.3.5 CHEGADA DE PÓLEN NA COLMEIA

Houve uma diferença no percentual de operárias forrageiras que carregavam pólen ao retornarem à colmeia entre os meses analisados (Tab.14). Também houve diferença entre os grupos em alguns meses, característica esta que pode ser atribuída a diversos fatores envolvidos, como a hora do forrageamento, a necessidade nutricional da colônia, a qualidade e a concentração de açúcar no néctar, a distância da fonte de alimento (néctar e pólen), além da própria aptidão das colônias, citados como fatores internos e externos por Abou-Shaara (2014).

**Tabela 11-** Média mensal e desvio padrão de operárias forrageiras (%) que retornavam com *pellets* de pólen nas corbículas em todos os tratamentos (grupos) mai – jul. 2014, na região metropolitana de Curitiba PR.

Meses	Operárias com pólen (%)
maio	7,19 ( $\pm 1,20$ ) <sup>a</sup>
junho	26,04 ( $\pm 1,33$ ) <sup>b</sup>
julho	39,60 ( $\pm 1,45$ ) <sup>c</sup>

Letras diferenças na mesma coluna representam diferença entre os meses ( $p < 0,05$ ); ANOVA *multiple range test*. Não foi avaliada a diferença entre os três tratamentos nos diferentes meses.



**Figura 15.** Interação entre os fatores tempo (mai–jun de 2014) e o percentual de operárias forrageiras com pólen nas corbículas. Houve diferença no percentual de operárias forrageiras que carregavam pólen nas corbículas entre os diferentes meses.

É importante ressaltar que apesar de não ter sido efetuada a classificação dos tipos polínicos presentes, foi observada a predominância de pólen da florada de bracatinga *Mimosa scabrella* a partir da coleta de junho, sob microscopia.

### 3.3.6 CORRELAÇÃO ENTRE ESPOROS DE *NOSEMA*, *VARROA* E PÓLEN

Quando analisada a correlação entre fatores, pode ser observada uma correlação negativa significativa de -0,2927 entre a taxa de infestação por *Varroa* nas operárias forrageiras e a chegada de pólen na colmeia. Isso significa que à medida que aumentou a chegada de pólen houve uma diminuição na infestação pelo ectoparasita.

**Tabela 12** - Matriz de correlação de Pearson entre os variáveis status (infecção por *Nosema* spp., % de infestação por *Varroa* e % de abelhas forrageiras com pólen), em colônias de abelhas africanizadas, durante mai–jul 2015, de todos os grupos (116 colônias) na região metropolitana de Curitiba PR.

Status	Pólen	<i>Varroa</i>	<i>Nosema</i> spp.
<b>Pólen</b>			$\rho = -0,0922$ $P = 0,1091$
<b><i>Varroa</i></b>	$\rho = -0,2927$ $P = 0,0000$		
<b><i>Nosema</i> spp.</b>		$\rho = 0,0453$ $P = 0,4321$	

Houve uma correlação negativa ( $\rho = -0,2927$ ) entre o % de infestação por *Varroa* e chegada de pólen na colmeia e sem correlação entre as outras variáveis. Teste coeficiente de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ).

A correlação negativa observada entre a infestação por *Varroa* e pólen foi também observada na pesquisa com abelha africanizada na mesma região por Pegoraro et al. (2013), que avaliaram a reserva interna de pólen na colmeia e a infestação forética de operárias nutrizas coletadas diretamente dos favos do ninho. Entretanto, a conclusão estabelecida naquele trabalho, supondo que o aumento da taxa de infestação diminua a reserva de pólen parece invertida, ou seja, que a disponibilidade de pólen tenha efeito sobre o controle da *Varroa*. Dessa forma, a maior disponibilidade de pólen e por consequência o aumento da chegada deste na colmeia pelas operárias forrageiras, tenha promovido a diminuição da taxa de infestação forética pelo parasita. Apesar da pesquisa de Kralj e Fuchs (2006) ter demonstrado as implicações negativas no comportamento das forrageiras, como a perda da capacidade de trabalho quando parasitadas, não apenas a *Varroa*, mas também a *Nosema* afetaram o comportamento e a habilidade das abelhas forrageiras no retorno a colmeia, além da redução do ciclo de vida destas (Kralj e Fuchs, 2006; Kralj e Fuchs 2010; Schneider, 2011; Naug, 2014). A mesma correlação negativa não foi verificada em relação a infecção por *Nosema* neste estudo (Quadro 1).

A correlação negativa observada entre infestação por *V. destructor* e a chegada de pólen pode ser atribuída em maior grau à provável recuperação da colônia com a diminuição da infestação do que à melhora da habilidade de coleta de pólen com a diminuição da infestação. Locke et al. (2014) observaram uma correlação negativa ( $\rho = -0,56$ ) entre a taxa de infestação por *V. destructor* e o tamanho da população de abelhas na colmeia.

O aumento da chegada de pólen pode ter sido o sinal para estimular a postura pela rainha, com incremento na área de cria e o desenvolvimento de futuras operárias. Estas condições podem fortalecer a colônia para impor seus mecanismos de defesa contra os parasitos, além da possível diluição inicial da taxa de *Varroa*. Ainda, a disponibilidade de floradas poderia diminuir o tempo de permanência de operárias forrageiras no interior da colmeia, diminuindo a exposição ao parasito e influenciando na taxa de infestação do parasita nas forrageiras tendo preferência na infestação de abelhas nutrizas. Portanto, estudos específicos envolvendo esses fatores são necessários, dado a importância dos possíveis danos deste ectoparasito para a colônia.

Não foram detectadas alterações nos níveis de esporos de *Nosema* spp. em relação à chegada de pólen (Quadro 1). Tampouco foi detectado o esperado aumento do número de esporos no final de inverno (Mulholland et al., 2012). É possível que a boa disponibilidade natural de pólen, verificada através da chegada deste nas corbículas das forrageiras, tenha influenciado no estabelecimento de boas condições fisiológicas para a colônia e aumentado a tolerância frente à infecção por *N. ceranae*, conforme conclusões citadas no trabalho de Basualdo et al. (2014). Lodesani et al. (2012) também comprovaram o efeito da qualidade do pólen sobre o tamanho da população de abelhas da colônia, influenciando na infecção por *N. ceranae* e reduzindo a perda de colônias no inverno subsequente.

### 3.3.7 DISCUSSÃO GERAL

Novos aspectos epidemiológicos podem estar associados à forma de infecção da *N. ceranae* em abelhas africanizadas *A. mellifera* no Brasil. Este agente tinha como hospedeiro original a *Apis ceranae* originária da Ásia (Fries et al., 1996; Chen et al., 2009), e foi inicialmente descrito infectando abelhas *A. mellifera* na Espanha por Higes et al. (2006).

No Brasil a *N. ceranae* foi detectada em amostras de abelhas do estado de São Paulo no ano de 2006 (Klee et al., 2007), e posteriormente os achados de Teixeira et al. (2013) comprovaram a sua presença em zangões conservados em álcool desde o ano de 1978, oriundas do estado do Rio Grande do Sul.

A distribuição de esporos de *Nosema* spp. nas colônias demonstrou ser relativamente uniforme durante o ano todo, com prevalência baixa, se comparada aos dados e estudos experimentais de outros países, que seguidamente ultrapassam dez milhões por abelha (Higes et al., 2008; Madras-Majewska et al., 2013). Também contrastam com os achados de Mulholland et al., (2012) e de Traver et al., (2012) que encontraram maiores concentrações de esporos no começo do verão e menores concentrações no outono.

Czekonska (2007) presumiu que o aumento dos níveis de infecção durante a primavera foi devido ao aumento de CO<sub>2</sub> na colmeia, ao relacionar a rápida proliferação

de *N. apis* quando abelhas foram incubadas com elevado nível de CO<sub>2</sub> em condições experimentais. Por outro lado Madras-Majewska, et al., (2013) encontraram em torno de 16 milhões de esporos por abelha no *pool* de 30 operárias nos meses de fim de outono e início de inverno, e a diminuição para próximo de 500 mil esporos no final de inverno e início da primavera na Polônia.

Neste trabalho não foi medido o nível do gás CO<sub>2</sub> na colmeia. Considerando que todas as colmeias eram do modelo Langstroth e sem o uso de redutor de alvado, é pouco provável que haja significativa diferença no nível dos gases em função da boa ventilação permitida por esse modelo de colmeia.

Em outro estudo experimental, Roberts e Hughes (2014) verificaram que abelhas adultas com 14 dias de vida, quando inoculadas com esporos de *N. ceranae*, apresentaram 10 vezes mais esporos do que abelhas jovens inoculadas com um dia de vida, o que poderia estar associado ao maior nível de infecção no final de inverno ou início de primavera, período em que as operárias têm ciclo de vida maior.

Também em infecção experimental, Pettis et al., (2013) obtiveram maiores níveis de infecção por *N. ceranae* ao administrarem pólen com diferentes fungicidas oriundos diretamente de lavouras tratadas com pesticidas nos EUA. Esta possibilidade foi praticamente descartada para todos os tratamentos desse estudo, especialmente do grupo LIQ, que apresentou maior infecção, por estar localizado dentro de uma área de reflorestamento com pinus *Pinus* sp.

Apesar dos estudos que apresentaram maiores níveis de esporos no período primavera/verão terem sido conduzidos no hemisfério norte, os elevados níveis encontrados nos meses de maio e junho (outono) no tratamento LIQ deste estudo reforçam a conclusão da interferência direta da prática de manejo, no caso a forma de suplementação alimentar nesse grupo, e a sensibilidade da interação patógeno e hospedeiro, sujeito a possíveis desvios neste equilíbrio dependendo de outros fatores envolvidos. Pettis et al. (2013), em condições de laboratório, comprovaram a sensibilidade dessa interação ao fornecerem pólen com diferentes teores e tipos de fungicidas às abelhas, aumentando a susceptibilidade à infecção por *N. ceranae*.

A ausência de sinais clínicos e as diferenças nas infecções não interferiram na perda de colônias durante o outono e inverno e sugerem o estabelecimento de uma interação benigna na epidemiologia evolutiva entre o agente e o hospedeiro no sentido

de um convívio de ambos e com rara manifestação da doença, levando a uma característica enzoótica, dificultando a determinação exata da contribuição deste agente para a perda de colônias. Pohorecka et al. (2014) conduziram um longo estudo envolvendo vários agentes relacionados à perda de colônias na Polônia, incluindo considerável infecção por *Nosema* spp. e também não puderam atribuir a esse agente a causa direta das perdas.

A presença da *N. ceranae* em abelhas do Brasil e Uruguai em período anterior a 1990 foi comprovada por investigações recentes (Invernizzi et al., 2009; Teixeira et al., 2013). Esse fato, associado à capacidade das abelhas africanizadas de se adaptarem e responderem às condições externas, podem explicar a presença do agente em alguns indivíduos nas colmeias e sem o aparente comprometimento da colônia. Técnicas moleculares envolvendo expressão de genes e metilação de DNA têm comprovado as variações da abelha *A. mellifera* em relação às adaptações ambientais e possivelmente relacionadas à tolerância a patógenos (Wallberg et al., 2014). Entre as diferentes espécies de abelhas, estudos comparativos com a *Apis ceranae* - espécie de abelhas de países asiáticos e pouco domesticados - apresentaram uma maior variabilidade dos peptídeos antimicrobianos desta, especialmente a himenoptecina, quando compara à *A. mellifera* (Xu et al., 2009).

A presença de esporos de *N. ceranae* em todos os apiários e na maioria das colmeias do estudo, a infecção de células do epitélio ventricular intestinal, porém, sem conteúdo intestinal viscoso e amarelado e sem a manifestação de sinais clínicos de diarreia, caracterizam a forma de ação da *N. ceranae* em abelhas *A. mellifera* africanizada deste estudo.

A predileção pelo ventrículo sem afetar outros órgãos pode explicar a forma clínica desse agente, sem manifestar sinais relacionados a diarreia (Higes et al., 2008). Os órgãos do intestino posterior estão funcionalmente mais envolvidos no equilíbrio hidroeletrólítico (Cruz-Landim, 2009).

Chen et al. (2009) detectaram DNA de *N. ceranae* em outros em órgãos como, glândulas hipofaríngeas, tubos de Malpighi, glândulas salivares e gordura corporal em diferentes quantidades por PCR de alta sensibilidade. A não visualização de infecção nas células epiteliais do intestino posterior (piloro, íleo e reto), apesar de terem sido detectados esporos no macerado destes órgãos, sugerem que a presença destes esporos é do conteúdo intestinal (lúmen). A manipulação de órgãos pode levar a possível contaminação durante o processo de manipulação.

Estudos específicos e quantitativos são necessários para comprovar se esta é uma característica da *N. ceranae*, ou se no presente estudo o nível de infecção e a reconstituição celular foram suficientes para a manutenção da integridade tecidual e conseqüentemente não implicaram na manifestação dos sinais clínicos relacionados a diarreia. Bekele et al. (2014), em um relato de caso ocorrido em Missesota, EUA, evidenciaram diarreia em uma colmeia infectada por *N. ceranae*.

Nos achados histopatológicos foram observadas as formas maduras (basofílicas) ocupando a região apical do citoplasma das células endoteliais, a exemplo do descrito por Higes et al. (2006). Entretanto não foi possível visualizar ocupação basal e aumento hipertrófico das células parasitadas citadas pelo mesmo autor. A alteração na morfologia celular assemelha-se a um edema, semelhante ao descrito por Maiolino et al. (2014), como um alargamento do citoplasma na porção apical. Outras alterações na estrutura das células ventriculares, como a observação de vacúolos no interior do citoplasma indicando sinais de necrose e lise celular (Higes et al., 2008), bem como as alterações na forma da membrana peritrófica indicando sinais de degeneração, foram observadas em alguns cortes, em concordância ao descrito por Dussaubat et al., (2012) e Maiolino et al., (2014).

Contudo, se a infecção ocorre e sem manifestação de sinais clínicos visíveis na colônia. É possível afirmar que a infecção por *N. ceranae* em colônias de abelha africanizada tem, em geral, um desenvolvimento benigno, possivelmente pela habilidade dessa linhagem de rapidamente regenerar a colônia via reposição de indivíduos pela postura da rainha, característica citada recentemente por Simeunovic et al. (2014). Mendoza et al. (2014a) também encontraram menores infecções de *N. ceranae* em abelhas africanizadas do que nas abelhas de origem europeia no Uruguai.

Essa relação de compensação estabelecida pode ser interrompida por fatores externos. Práticas de manejo tais como a forma e tipo de alimento fornecido podem alterar o nível de indivíduos infectados, aumentando o número de esporos da colônia. É possível supor que se tal prática persistir por um longo período e não houver o aporte alimentar, especialmente de pólen para induzir e sustentar os nutrientes necessários para a postura e o desenvolvimento da fase larval, a infecção por *N. ceranae* poderia levar ao enfraquecimento da colônia ou mesmo ao seu colapso. Também pode-se supor que se a infecção atingir outras castas como a rainha, as conseqüências tanto na postura como na redução da longevidade da rainha levariam a colônia ao mesmo caminho, ou seja, o enfraquecimento que pode gerar o colapso ou mesmo a perda da

rainha, tornando a colônia órfã e sem ovos ou larvas para a reposição. Neste experimento foram encontradas seis colônias zanganeiras durante os meses de maio a agosto de 2014.

Infecções experimentais têm comprovado a redução no tempo de vida de abelhas infectadas por *N. ceranae* (Higes et al., 2007; Dussaubat et al., 2012) e a infecção atinge as diferentes castas da colônia incluindo a rainha (Traver e Fell, 2012; Chaimanee et al., 2014). Portanto, medidas que reduzam a infecção interna da colônia, especialmente para diminuir a transmissão horizontal entre indivíduos, e o risco de atingir a rainha para não comprometer o núcleo multiplicador da colmeia, precisam ser adotadas.

Na totalidade das amostras de esporos processadas em que foi possível a determinação da espécie verificou-se a presença de *N. ceranae*. Este estudo demonstra a predominância desta espécie mesmo em regiões mais frias do Brasil, e sustenta as suposições de Teixeira (2013) de que esta espécie está presente nas abelhas do Brasil há muito mais tempo do que o suposto. Porém, o estudo não corrobora com os achados do estudo de Gisder et al. (2010) sobre a predominância da *N. ceranae* em apiários localizados em clima mais ameno, ao descrever a prevalência de *N. apis* em relação a *N. ceranae* em regiões mais frias ao norte da Europa. Também divergem sobre a predominância da *N. apis* encontrados na Suécia, em estudos de prevalência realizados por Forsgren et al. (2013). Porém, corrobora com os achados de infecções experimentais realizadas por Natsopoulou et al. (2014), que verificaram uma vantagem competitiva para a *N. ceranae* em relação a *N. apis* quando induziram com infecções em condições de laboratório com ambiente controlado.

A correlação negativa entre a infestação por *V. destructor* e a chegada de pólen na colmeia não foi verificada em relação a infecção por *Nosema* spp neste estudo.

Em função das constantes e elevadas perdas de colônias de AHB localizadas em regiões de clima frio no sul do Brasil durante o outono e inverno, novos estudos específicos envolvendo o efeito da infestação por *Varroa* em abelha africanizada precisam ser efetuados, especialmente para verificar se as correlações dos achados de Locke et al. (2014) têm o mesmo comportamento nessa linhagem. Tudo indica que as colônias que crescem mais rapidamente durante o inverno sofrem menor impacto da infestação por *Varroa* e, conseqüentemente, tenham menor predisposição ao colapso.

## CAPITULO IV

### 4 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES

#### 4.1 CONCLUSÕES GERAIS

- As perdas de colônias de abelhas durante o outono/inverno que ocorre entre os meses de maio e agosto foi de 19% nas colônias estudadas.
- A *Nosema* spp. esteve presente nos apiários e na maioria das colmeias durante o ano todo sem sazonalidade, e não foi a causa direta da perda de colônias que ocorrem durante o outono e inverno na região.
- A maioria das infecções é causada pelo agente *N. ceranae* e possui comportamento epidemiológico enzoótico, com moderado número de esporos por abelha e de baixo número de indivíduos infectados.
- A infecção por *Nosema* em abelhas africanizadas na região estudada apresenta característica epidemiológica de enzootia, cuja relação de equilíbrio estabelecida entre o agente e o hospedeiro pode ser afetada por outros fatores como o manejo alimentar, aumentando o número de indivíduos infectados, possivelmente pela transmissão horizontal intracolônia da *Nosema* spp.
- O pólen (chegada de pólen) na colmeia não apresenta correlação com a taxa de infecção de *Nosema* spp. e tem uma correlação negativa com a taxa de infestação forética por *Varroa destructor* nas abelhas operárias forrageiras.

## 4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada a importância da cadeia da apicultura para a economia nacional, é urgente a necessidade do estado brasileiro apoiar trabalhos e estudos sobre os problemas que afetam a saúde das abelhas, cujos resultados auxiliariam os produtores na tomada de decisão sobre a necessidade do uso de produtos nas colmeias.

Há necessidade de se testar manejos ou produtos para diminuir o risco da transmissão de esporos de *Nosema* spp., tais como a adição de ácidos orgânicos naturais na alimentação líquida suplementar, visando inativar a viabilidade dos esporos contaminantes nesta fonte.

## REFERÊNCIAS

Abou-Shaara HF. The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. *Veterinari Medicina*. 2014; 59: 1–10.

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen R A, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2005; 52(5): 399–451.

Akiyoshi DE, Morrison HG, Lei S, Feng X, Zhang Q, Corradi N, Mayanja H, Tumwine JK, Keeling PJ, Weiss LM, Tzipori S. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS Pathogens*. 2009; 5: 1-10.

Almeida D, Marchini LC, Sodré GS, D'Ávila M, Arruda CMF. Plantas visitadas por abelhas e polinização. ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação (Série Produtor Rural, Edição Especial), Piracicaba, 2003: 40 p.

Alves SB, Flechtmann CH, Rosa AE. *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904 (Acari: Mesostigmata, Varroidae) also in Brasil. *Ecossistema*. 1975; 3 (3): 78-79.

Anderson DL, Trueman JWH. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*. 2000; 24: 165-189.

Basualdo M, Barragán S, Antúnez K. Bee bread increases honey bee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honey bees. *Environmental Microbiology Reports*. 2014; 6: 396–400.

Bekele AZ, Mor SK, Phelps NBD, Goyal SM, Armien GA. A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Veterinary Quarterly*. 2014.

Boecking O, Spivak M. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. 1999; 30(1): 141-158.

Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitology Research*. 2012; 110: 2557-2561.

Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research*. 2013; 44: 1-14.

Bowen-Walker PL, Gunn A. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2001; 101 (3): 207-217.

Bozic j, Valentincic T. Quantitative analysis of social grooming behavior of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*. 1995; 26: 141-147.

Bravo J, Carbonell V, Valdebenito JT. Identification of *Nosema ceranae* in the Valparaíso District, Chile. *Archivos de medicina veterinaria*. 2014; 46: 487-491.

Camargo JMF. *Manual de Apicultura*. São Paulo: Ed. Ceres, 1972, 251p.

CAPABEE: Canadian Association of Professional Apiculturists ANNUAL COLONY LOSS REPORTS. 2014. Disponível em: <http://www.capabees.com/content/uploads/2013/07/2014-CAPA-Statement-on-Honey-Bee-Wintering-Losses-in-Canada.pdf>, Acesso em: 30 de out 2014.

Carneiro FE; Torres RR; Strapazon R; Ramirez SA; Guerra Jr. JCV; Kolling DF; Moretto G. Changes in the reproductive ability of the mite *Varroa destructor* (Anderson

e *Trueman*) in africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in southern Brazil. *Neotropical Entomology*. 2007; 36: 949-952.

Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS. Effects of host age on susceptibility to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie*. 2014; 45: 451– 463.

Chauzat MP, Laurent M, Saugeon M, Hendriks P, Ribiere-Chabert M. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2013. *EPILOBEE - 2012-2013*. 2014; 1-30.

Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundensen-Rindal D, Pettis JS. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2009; 56: 142–147.

Coeli MC, Faerstein E. Estudos de Coorte. In: Medronho AR, Block VK, Luiz RR, Werneck LG. *Epidemiologia*. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2009; 237-250.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evas JD et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee collapse disorder. *Science*. 2007; 318: 283-287.

Crane E. La Apicultura en El Mundo – Pasado y Presente In: Dadant e Hijos. La Colmena Y La Abeja Melifera. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur; 1975; 25-45.

Cruz-Landim C. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo: Editora UNESP, 2009. Disponível em: <http://books.google.com.br/books>. Acesso em: 12 de Dez. 2014.

Czekonska K. Influence of carbon dioxide on *Nosema apis* infection of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2007; 95: 84-86.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. Predictive markers of honey bee colony collapse. PLoS ONE. 2012; 7: e32151.

Degrandi-Hoffman G, Chen Y, Huang E, Huang MH. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bee (*Apis mellifera* L.). Journal of Insect Physiology. 2010; 56(9): 1184-1191.

De Jong D, Morse RA, Eickwort GC. Mite pests of honey bees. Annual Review of Entomology. 1982; 27: 229-252.

Denmark HA, Cromroy HL, Cutts L. Varroa mite, *Varroa jacobsoni* Oudemann(Acari:Varroidae). Entomology Circular. 1991; 347.

Delfinado MD. Mites of the honey bee in South-east Asia. Journal of Apiculture Research. 1963; 02: 113-114.

Dietmann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tannahill C, Frey E, Ziegelmann B, Rosenkranz P, Ellis JD. Standard methods for *Varroa* research. Journal of Apicultural Research. 2013; 52: 1-54.

Dussaubat C, Brunet J-L, Higes M, Colbourne JK, LOPEZ J. Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. PLoS ONE. 2012; 7: e37017.

Ellis J. Colony Collapse Disorder in Honey Bees. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, IFAS Extension. 2007. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/in720>

FAO: Food and Agriculture Organization of United Nations - FAOSTAT 2014- Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 19 de Jan. 2015.

Forsgren E, Fries I. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. Environmental Microbiology Reports. 2013; 5: 78–82.

Fries I, Feng F, Silva A, Slemenda SB, Pieniasek NJ. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). European Journal of Protistology. 1996; 32: 356-365.

Fries I, Camazine S. Implication of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. Apidologie. 2001; 32: 199-214.

Fries I, Chauzat M-P, Chen Y-P, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon DP, Martín-Hernández R, Natsopoulou M, Paxton RJ, Tanner G, Webster TC, Williams G R, Standard methods for *Nosema* research. In Dietemann V, Ellis JD, Neumann P. The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. Journal of Apicultural Research. 2013; 51.

Garrido G, Rosenkranz P, Paxton JR, Gonçalves LS. Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brasil. Apidologie. 2003; 34: 535-541.

Gary NE. Actividades y comportamiento de la abeja melífera. In: Dadant e Hijos. La Colmena Y La Abeja Melifera. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur; 1975; 247-345.

Gisder S, Hedke K, Möckel N, Marie-Charlotte F, Linde A, Genersch E. Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? Applied Environmental Microbiology. 2010; 76: 3032-3038.

Gochnauer TA, Furgula B, Shimanuki H. ENFERMIDADES Y ENEMIGOS DE LA ABEJA MELIFERA In: Dadant e Hijos. La Colmena Y La Abeja Melifera. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur; 1975; 791-848.

Gonçalves LS. Retrospecto sobre a Apicultura Brasileira. In: SIMPÓSIO SOBRE APICULTURA, Anais. Jaboticabal. 1984; 56-70.

Gonçalves LS. Africanização das abelhas nas Américas, impactos e perspectivas de aproveitamento do material genético In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 9 Candelária, Anais... Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1994; 35-41.

Gonçalves LS. MEIO SÉCULO DE APICULTURA COM ABELHAS AFRICANIZADAS NO BRASIL. MENSAGEM DOCE. 2006; 87: DISPONÍVEL EM: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/87/artigo.htm>.

Guerra Jr.JCV, Gonçalves LS, De Jong D. Africanized honey bees (*apis mellifera* L.) are more efficient at removing worker brood artificially infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni oudemans* than are italian bees or italian/africanized hybrids. Genetics and Molecular Biology. 2000; 23: 89-92.

Higes M, Martin-Hernandes R, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. Journal of Invertebrate Pathology. 2006; 92: 93-95.

Higes M, Garcia-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). Journal of Invertebrate Pathology. 2007; 94: 211-217.

Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environmental Microbiology. 2008; 10: 2659-2669.

Hirt RP, Logsdon JM, Helay B, Dorey MW, Doolittle FW, Embley TM. Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. PNAS Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America. 1999; 96: 580-585.

Hou C, Rivkin H, Slabezki Y, Chejanovsky N. Dynamics of the Presence of Israeli Acute Paralysis Virus in Honey Bee Colonies with Colony Collapse Disorder. Viruses. 2014; 6: 2012-2027.

Huang W, Jiang JH, Chen YW, Wang CH. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2007; 38: 30-37.

Huang Q, Lattorff HMG, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RFA. A selective sweep in a microsporidian parasite *Nosema* – tolerant honeybee population, *Apis mellifera*. *Animal Genetics*. 2014; 45: 267-273.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp>. Acesso em 06 de dez. 2014.

Invernizzi C, Abud C, Tomasco IH, Harriet J, Ramallo G, Campá J, Katz H, Gardio G, Mendoza Y. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2009; 101: 150–15.

Keeling PJ, Fast NM. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology*. 2002; 56: 93–116.

Keeling PJ, Corradi N, Morrison HG. The Reduced Genome of the Parasitic Microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* Lacks Genes for Core Carbon Metabolism. *Genome Biology and Evolution*. 2010; 2: 304-309.

Kerr WE. Notas sobre as abelhas africanizadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 9. 1992, Candelária. Anais... Porto Alegre: Ed. da UFRGS. 1994; 28-33.

Klee J, Besana A, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2007; 96: 1-10.

Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*. 2006; 15: 259-263.

Kralj J, Fuchs S. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*. 2006; 37: 577-587.

Kralj J, Fuchs S. *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*. 2010; 41: 21-28.

Krüger E, Produção de mel: a situação do estado do Paraná. (Dissertação de pós graduação). Curitiba-Paraná. Universidade Federal do Paraná UFPR; 2003.

Locke B, Forsgren E, de Miranda JR. Increased Tolerance and Resistance to Virus Infections: A Possible Factor in the Survival of *Varroa destructor*- Resistant Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*. 2014; 9(6).

Lodesani M, Vaccari G, Franceschetti S, Bergomi P, Costa C. Effetto della disponibilità di polline sulla suscettibilità della colonia ad alcuni patogeni e sulla longevità delle api. *APOidea Anno IX*, 2012; 1-2.

Lu C, Warchol KM, Callahan RA. Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology*. 2014; 67(1): 125-130.

Luiz RR. Associação Estatística em Epidemiologia: Análise Bivariada, Análise com Múltiplas Variáveis In: Medronho AR, Block VK, Luiz RR, Werneck LG. *Epidemiologia*. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2009; 429-483.

Ma Z, Li C, Pan G, Li Z, Han B. Genome-Wide Transcriptional Response of Silkworm (*Bombyx mori*) to Infection by the Microsporidian *Nosema bombycis*. *PLoS ONE*. 2013; 8(12).

Madras-Majewska B, Ochnio L, Ochnio M, Sciegosz J. Comparison of components and number of *Nosema* sp. spores of wintering Carniolan and Italian bees debris. *Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW. Animal Science*. 2013; 52: 121-127.

Magnini RM. Identifying Characteristics of Honey Bee Races. *THE HIVE TOOL*. 2014; 41: 9-12.

Maiolino P, Lafigliola L, Rinaldi L, De Leva G, Restucci B, Martano M. Histopathological findings of the midgut in European honey bee (*Apis mellifera* L.) naturally infected by *Nosema spp.* Veterinary Medicine and Animal Sciences. 2014; 2: 1-3

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa Conjunta N<sup>o</sup>-1 SDA/MAPA e IBAMA. DOU. 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa 50. DOU. 2013.

Martin EC. Empleo de las abejas em la polinización de las cosechas. In: Dadant e Hijos. La Colmena Y La Abeja Melifera. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur; 1975; 741- 789.

Medici SK, Sarlo EG, Porrini MP, Braunstein M, Eguaras MJ. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. Parasitology Research. 2012; 110: 859-864.

Medina-Flores CA, Guzmán-Novoa E, Flores CFA, Bañuelos HG, Soto JIA. Producción de miel e infestación con *Varroa destructor* de abejas africanizadas (*Apis mellifera*) con alto y bajo comportamiento higiénico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2014; 5(2): 157-170.

Mendoza Ya, Santos E, Antunez K, Invernizzi C. *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. Apidologie. 2014; 45(2): 224-234.

Mendoza Yb, Santos E, Antunez K, Invernizzi C. Selección bidireccional de *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) para aumento de la resistencia y la susceptibilidad a la nosemosis. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina. 2014; 73: 65-69.

Montiel JO. Varroasis en la Argentina. In: ANAIS DO 5º CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA E III CONGRESSO LATINO-IBERO-AMERICANO DE APICULTURA 1980, Viçosa, MG. Anais... Viçosa: Imprensa Universitária da UFV. 1984; 203-209.

Muli E, Patch H, Frazier M, Frazier J, Torto B. Evaluation of the Distribution and Impacts of Parasites, Pathogens, and Pesticides on Honey Bee (*Apis mellifera*) Populations in East Africa. PLoS ONE. 2014; 9(4).

Mulholland GE, Traver BE, Johnson NG, Fell RD. Individual variability of *Nosema ceranae* Infections in *Apis mellifera* Colonies. Insects. 2012; 3: 1143-1155.

Natsopoulou ME, McMahon DP, Doublet V, Bryden J, Paxton RJ. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2014. Disponível em: <http://rspb.royalsocietypublishing.org>  
Acesso em: 05 de dez. de 2014.

Naug D. Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. Biology Letters. 2014; 10(11).

Nazzi F, Annoscia D, Caprio E, Di Prisco G, Pennacchio F. Honeybee immunity and colony losses. Entomologia. 2014; 2(203): 80-86.

Nunes FL. Relações entre a disponibilidade de alimento e a quantidade de crias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* Linnaeus. 1758, infestadas naturalmente com *Varroa destructor* (Monografia em Zootecnia). Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná; 2011.

OIE Terrestrial Manual 2013. Nosemosis of honey bees. Chapter 2.2.4 – Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health>. Acesso em: 04 de nov. de 2014.

O'Brochta D. Genetically-Modified Honey Bees: A Key Technology for Honey Bee Research. EntomologyToday. 2014 (updated in 2014 June 11). Disponível em: <http://entomologytoday.org/>. Acesso em: 11 de Jun.2014.

Parvanov P, Rusenova N. Etiology and Clinicoepidemiological Profile of Apiaries With Colony Collapse Disorder-Like Symptoms in Bulgaria. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 2014; 17(3): 199-206.

Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I.). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*. 2007; 38(6): 558-565.

Plavša N, Nedić N, Petrović T, Puvača N, Stanivuk J, Stanačev V, Vuković V. Reasons of weakening and losses of Honey bee colonies. 23rd International symposium, New Technologies in Contemporary Animal Production. Novi Sad (Serbia), 2013; 19-21.

Pegoraro A, Neto AC, Lazzari SMN, Silva BKR. Forrageamento da Abelha Africanizada em Florada da Bracatinga. *Archives of Veterinary Science*. 2011; 16(2) 1-8.

Pegoraro A, Nunes FL, Pereira FF, Teixeira RA, Krüger E, Sermann KC. Perdas de colônias de *Apis mellifera* L. no inverno suplementadas com alimentação artificial com pólen e favos de mel. *Revista Agrarian*. 2013; 6(19): 67-74.

Petrie A, Watson P. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. Second Edition Oxford, UK. Blacwell Publishing. 2006.

Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*. 2013; 8(7).

Plischuk S, Martín-Hernández R, Prieto L, Lucía M, Botías C, Meana A, Abrahamovich AH, Lange C, Higes M. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*. 2009; 1(2): 131-135.

Pohorecka K, Bober A, Skubida M, Zdańska D, Torój K. A comparative study of environmental conditions, bee management and the epidemiological situation in apiaries varying in the level of colony losses. *Journal of Apicultural Science*. 2014; 58: 107-132.

Ritter W. Varroa disease of the honeybee, *varroa mellifera*. *Bee World*. 1981; 62: 141-153.

Roberts KE, Hughes WOH. Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2014; 121: 1-6.

Rosenkranz P, Engels W. Infertility of *Varroa jacobsoni* females after invasion into *Apis mellifera* worker brood as a tolerance factor against varroaosis. *Apidologie*. 1994; 25: 402-411.

Sandrock C, Tanadini M, Tanadini LG, Fauser-Misslin A, Potts SG, et al. Impact of Chronic Neonicotinoid Exposure on Honeybee Colony Performance and Queen Supersedure. *PLoS ONE*. 2014; 9(8).

Schneider C. Detecting the influence of different potential stress factors on the behavior of the honeybee *Apis mellifera* using Radiofrequency Identification (RFID). (Tese de Doutorado). Würzburg. Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2011.

SEBRAE 2014 – BOLETIM AGRONEGÓCIO 2014 – O Mercado da Própolis. Disponível em: [www.sebrae2014.com.br](http://www.sebrae2014.com.br). Acesso em: 30 de Out. de 2014.

Simeunovic P, Stevanovic J, Cirkovic D, Radojicic S, Lakic N, Stanisic L, Stanimirovic Z. *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apicultural Research*. 2014; 53(5): 545-555.

Simões RA. Alterações nos parâmetros biológicos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) causadas por *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae). (Tese de Doutorado). Piracicaba – São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz USP; 2012.

Shutler D, Head K, Burgher-MacLellan KL, Colwell MJ, Levitt AL, Ostiguy N, Williams GR. Honey Bee *Apis mellifera* Parasites in the Absence of *Nosema ceranae* Fungi and *Varroa destructor* Mites. PLOS ONE. 2014; 9(6).

Smith ML. The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? PLoS ONE. 2012; 7(8).

Stanimirovic z, Stevanovic J, Nevenka A, Stojic V. HERITABILTY OF GROOMING BEHAVIOUR IN GREY HONEY BEES (*Apis mellifera carnica*). Acta Veterinária (Beograd). 2010; 60(2-3); 313-323.

Teixeira EW, Santos LG, Sattler A, Message D, Alves ML, Martins MF, Grassi-Sella ML, Franco TM. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. Journal of Invertebrate Pathology. 2013; 114(3): 250-254.

Teixeira EW, Message D. ABELHAS *Apis mellifera* in: PANAFTOSA-OPAS/OMS - Manual Veterinário de Colheita de Amostras e Envio de Amostras. 2010; 175-213.

Traver BE, Williams MR, Fell RD. Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. Journal of Invertebrate Pathology. 2012; 109(2): 187-193.

Traver BE, Fell RD. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. Journal of Invertebrate Pathology. 2012; 110(3): 408-410.

Underwood R, vanEngelsdorp D. Colony Collapse Disorder: have we seen this before? Bee Culture. 2007; 35: 13–18.

USDA – Agricultural Research Service. Honey Bees and Colony Collapse Disorder. Disponível em: <http://ars.usda.gov/news/docs.htm?docid=15572>, acesso em: 02 de dez. de 2014.

Wallberg A, Han F, Wellhagen G, Dahle B, Kawata M, Haddad N, Simões ZLP, Allsopp MH, Kandemir I, De la Rúa P, Pirk CW, Webster MT. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*. 2014; 46: 1081-1088.

Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, Worley KC, Evans JD, Maleszka R, et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 2006; 443(7114): 931-949.

Wiese H. *Nova Apicultura*. Livraria e editora Agropecuária Ltda. 1984. 485p.

vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*. 2009; 4(8).

vanEngelsdorp D, Steinhauer N, Rennich K. Colony Loss 2013-2014. Disponível em: <http://beeinformed.org/2014/05/colony-loss-2013-2014/> Acesso em: 22 de Out. de 2014.

vanEngelsdorp D. Winter Bee Loss Prediction. Declaração disponível em: <http://agnetwest.com/2015/01/13/winter-bee-loss-prediction/>. Acesso em: 20 de jan.2015.

Zander E. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Munchener Bienenzeitung*. 1909; 31: 196-204.

Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68(1): 124-137.

Apêndice 1:

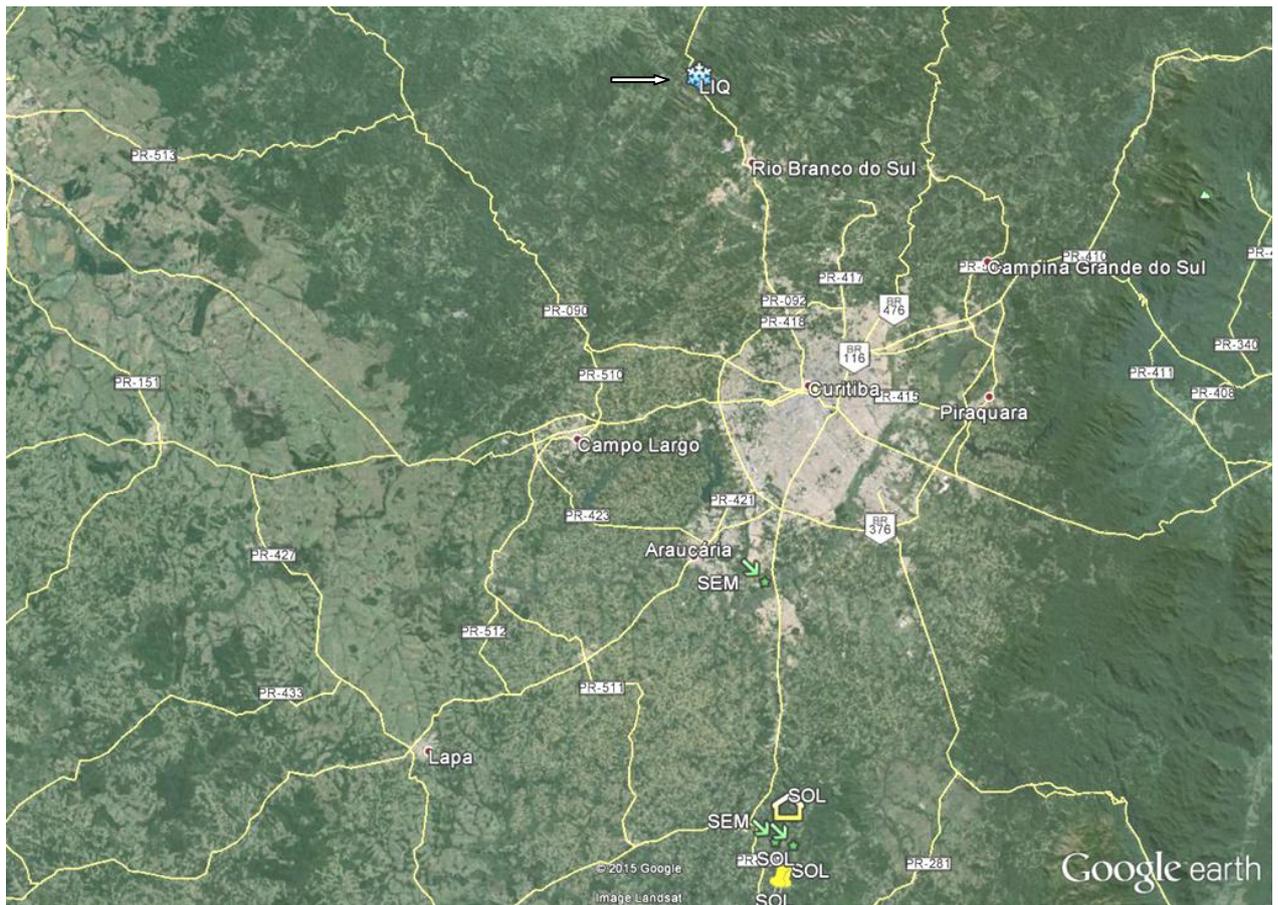
<b>Quadro 1:</b> Síntese das atividades (coleta de material) realizadas durante o experimento.				
<b>Variável/teste</b>	<b>Período</b>	<b>Método</b>	<b>Amostras</b>	<b>Fonte</b>
<b>Infecção anual por <i>Nosema</i> spp.</b>	ago/13 a jul/14	Coleta mensal de um <i>pool</i> de forrageiras da colônia	156 amostras compostas de <i>pool</i> de operárias	(Teixeira et al., 2010; Traver et al., 2012; Botias et al., 2013; Madras-Majewska et al., 2013; Pohorecka et al., 2014; Shutler et al., 2014)
<b>Perda de colônias</b>	maio/14 a ago/14	Inspeção das colméias	116 colônias	(Gisder et al., 2010) utilizado
<b>Esporos de <i>Nosema</i> spp. no outono/inverno</b>	maio/14 a jul/14	Coleta mensal de um <i>pool</i> de forrageiras da col.	321 amostras de <i>pool</i> de operárias	(Teixeira et al., 2010; Traver et al., 2012; Botias et al., 2013; Madras-Majewska et al., 2013; Pohorecka et al., 2014; Shutler et al., 2014)
<b>Abelhas com esp. de <i>Nosema</i> spp.</b>	jun/14 e jul/14	Coleta de forrageiras	70 abelhas moribundas e 278 operárias	(Pettis et al., 2013) (Smith, 2012) adaptado
<b>Infestação de forrageiras por <i>Varroa</i> (%)</b>	maio/14 a jul/14	Contagem de <i>Varroa</i> e de forrageiras	321 amostras de <i>pool</i> de operárias	(Dietmann et al., 2013) modificado
<b>Taxa de operárias com pólen (%)</b>	maio/14 a jul/14	Contagem de forrageiras com pólen nas corbiculas	303 amostras de <i>pool</i> de operárias	Pegoraro 2011 (adaptado)
<b>Produção de mel</b>	set/14 a 21 de dez/14	Pesagem do mel por colmeia (colônia)	61 colmeias	(Medina-Flores et al., 2014)
<b>Det. espécies esporos</b>	out/14 a fev/14	Extração de DNA e amplificação por PCR Multiplex	81 amostras compostas do macerado de <i>pool</i> de abelhas	(Fries et al., 2013)
<b>Processamento histopatológico</b>	ago/14 a out/14	Cortes histológicos de intestino	15 abelhas	(Higes et al., 2008; Maiolino et al., 2014)

## Apêndice 2:

**Tabela 13.** Componentes e o respectivo volume da suplementação alimentar de inverno fornecida as colônias para os tratamentos SOL e LIQ.

Componentes	Volume	
	Suplemento Líquido (LIQ)	Suplemento Pastoso (SOL)
Açúcar	3 kg	4 kg
Água	1 L	-
Mel	-	1 kg
Premix	40 g	-
Pólen	-	50 g
Ácido cítrico	5 g	-
Ácido láctico	2,5 mL	-

Anexo 1:



**Figura 16.** Imagem da região metropolitana de Curitiba - PR demonstrando a localização geográfica dos apiários que compunham os três grupos envolvidos no estudo, na