

DETECÇÃO DE VÍRUS EM ABELHAS MIGRATÓRIAS DO SUL DO BRASIL

MATHEUS IURI FRÜHAUF¹; LARIANE DA SILVA BARCELOS²; NADÁLIN
YANDRA BOTTON³; LUIZA RIBEIRO DA ROSA⁴; MARINA STURBELLE
GARCIA⁵; GEFERSON FISCHER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – matheus.fruhauf@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - nadalinyb@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - luizaribeirovet@outlook.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - sturbellemarina@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são polinizadores que contribuem com a manutenção de diversas culturas agrícolas em todo o mundo (ROCHA et al., 2023). Sua atividade é essencial para proporcionar variabilidade biológica, reprodução e aumento de produtividade em diferentes conjuntos agrícolas (GARRATT et al., 2014). Diante disso, tornou-se comum o aluguel de colmeias, deslocando-as periodicamente de uma cultura ou região para outra, o que se caracteriza como apicultura migratória (PILATI & PRESTAMBURG, 2016). Apesar das vantagens econômicas, essa prática expõe as abelhas a maiores níveis de estresse, provocado pelas mudanças de local, temperatura, qualidade e diversidade de alimentos disponíveis (SIMONE-FINSTROM et al., 2016).

Esses desafios e o contato que as abelhas migratórias têm com diferentes colônias contribuem na transmissão de doenças, não só entre outras colmeias migratórias, mas também para as abelhas selvagens que partilham a forragem (MARTÍNEZ-LOPEZ et al., 2022). Dentre as doenças que ameaçam a saúde das abelhas estão as enfermidades de origem viral, como o Vírus da Asa Deformada (DWV), Vírus da Paralisia Aguda das Abelhas (ABPV), Vírus da Paralisia Aguda Israelense (IAPV), Vírus da Paralisia Crônica das Abelhas (CBPV), Vírus da Realeira Negra (BQCV) e o Vírus da Cria Ensacada (SBV) (CHAGAS et al., 2019).

O Brasil é líder mundial na área agrícola e muitas culturas dependem ou têm sua produção aumentada pela polinização das abelhas (DOS SANTOS et al, 2018; GIANNINI et al., 2015). Entre os estados brasileiros, o Rio Grande do Sul tem sido listado como um dos mais significativos contribuintes para o mercado apícola (KLOSOWSKI; KUASOSKI; BONETTI, 2020) e é o líder do país na produção de mel (IBGE, 2022). Considerando isto, a saúde e produtividade das colmeias regionais são cruciais para acompanhar este ambiente econômico crescente. O Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (LABVIR/UFPEL) oferece o diagnóstico de vírus que afetam as *Apis mellifera*, participando no monitoramento da saúde da espécie. O presente resumo tem por objetivo descrever a detecção de diferentes agentes virais em colmeias de abelhas migratórias do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas, de maio a julho de 2022, 135 amostras provenientes de colmeias migratórias que realizaram atividade entre os anos de 2021 e 2022. As

amostras foram compostas de seis abelhas adultas por caixa, coletadas em potes aerados e mantidas refrigeradas até chegada ao LABVIR/UFPEL, quando foram submetidas ao congelamento em ultra freezer (-80°C). Após, cada amostra foi submetida à extração de RNA, com o reagente TRIzol® Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA), seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de RNA passaram, então, pelo processo de síntese de DNA complementar (cDNA), através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®). As condições de termociclagem aplicadas foram: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 94°C por 5 minutos. As amostras de cDNA foram utilizadas na realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme segue: 2µL de cDNA (50 - 100ng), 1x GoTaq® Colorless Master Mix, 0.4µM de cada primer (CHAGAS et. al., 2022) volume total de 25µL. Foram realizadas duas RT-PCR, em multiplex de três vírus cada (M1: SBV, CBPV e ABPV; M2: DWV, BQCV e IAPV - Tabela 1), sob termociclagem padronizada pelo grupo de pesquisa (dados ainda não publicados).

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese (110V/60 minutos) em gel de agarose a 1.5%, corados por brometo de etideo e visualizados em luz UV. As amostras foram testadas com o gene endogeno GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Foram utilizados fragmentos de gBlock como controle positivo e água livre de nucleases como controle negativo. Amostras positivas foram purificadas, utilizando o kit GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit – (CYTIVA, USA) e enviadas para sequenciamento.

As amostras foram sequenciadas em duplicata e os resultados foram organizados, alinhados e criados consensos das duplicatas por meio do software uGene v. 47.0 (UNIPRO, RUSSIA). As sequências-consenso foram comparadas por meio da ferramenta Standart Nucleotide (NCBI) contra o banco de dados de nucleotídeos, GenBank (NCBI, USA), confirmando a identidade dos alvos virais avaliados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização dos dois Multiplex na técnica de RT-PCR proporcionou a amplificação de fragmentos correspondentes aos seis vírus avaliados. Amostras aleatórias consideradas positivas foram sequenciadas e por meio da ferramenta Standart Nucleotide Blast (NCBI) foram encontradas paridades de 100% com a sequências de referência de cada vírus avaliado. Todas as sequencias avaliadas foram depositadas no GenBank e estão acessíveis por meio dos códigos de acesso: BR-DWV22 OR102902; BR-BQCV22 OR102903; BR-SBV22 OR102904; BR-CBPV22 OR102905; BR-IAPV22 OR125570; BR-ABPV22 OR381782. Dentre as 135 colônias migratórias analisadas, 12 (8.9%) foram positivas para ABPV, 124 (91.8%) para BQCV, 85 (63.0%) para CBPV, 123 (91.1%) para DWV, 3 (2.2%) para IAPV, e 96 (71.1%) foram positivas para SBV. Os resultados estão expostos na Tabela 1.

Vírus	Número de Amostras Avaliadas	Número de Amostras Positivas	Percentagem (%) de Amostras Positivas
SBV	135	96	71,1%
CBPV	135	85	63,0%
ABPV	135	12	8,9%
DWV	135	123	91,4%
BQCV	135	124	91,8%
IAPV	135	3	2,2%

Tabela 1. Número e porcentagem de colônias positivas para Vírus da Cria Ensacada (SBV), Vírus da Paralisia Crônica das Abelhas (CBPV), Vírus da Paralisia Aguda das Abelhas (ABPV), Vírus das Asas Deformadas (DWV), Vírus da Realeira Negra (BQCV), e Vírus da Paralisia Aguda Israelense (IAPV) em colônias migratórias no sul do Brasil.

Os resultados apresentados demonstram a alta ocorrência de BQCV (91,8%), DWV (91,4%), SBV (71,1%) e CBPV (63,3%) em colônias migratórias no sul do Brasil. Esses resultados, com ênfase nos vírus BQCV e DWV, corroboram com PFEIFFER; CROWDER (2022), em que relatam a alta distribuição destes vírus em todo o mundo, principalmente em apiários comerciais. Entretanto, um estudo previamente realizado pelo LABVIR/UFPEL, analisando apiários dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, relatou menor presença de BQCV (36%) e DWV (1%) (CHAGAS et al., 2022). É válido destacar que os apiários analisados no estudo de CHAGAS et al. (2022) eram fixos, o que corrobora com a hipótese de que colmeias migratórias sejam mais suscetíveis a infecções virais (SIMONE-FINSTROM., 2016).

Os vírus ABPV e IAPV foram encontrados em menores níveis (8,9% e 2,2% respectivamente). Apesar de ser encontrado em baixos níveis, o IAPV e o ABPV representam significativa ameaça às abelhas, aparentemente relacionado a desordem do colapso das colônias (COX-FOSTER et al., 2007; MAORI et al., 2007).

O maior número de amostras positivas encontrado neste estudo, comparado ao estudo anterior (CHAGAS et al., 2022), pode estar associado a atividade migratória das abelhas. A movimentação das colônias pode ser um fator estressante para as abelhas, tornando-as mais suscetíveis a patógenos e parasitas, além de facilitar sua disseminação em diferentes locais e consequentemente aumento da transmissão entre colônias (MARTÍNEZ-LÓPEZ; RUIZ & DE LA RÚA, 2022).

4. CONCLUSÕES

Os presentes resultados reiteram a alta incidência de vírus em abelhas migratórias, que podem representar uma ameaça a apicultura e meliponicultura brasileira. A duração, gravidade e consequências desta e de outras infecções identificadas neste estudo devem ser analisadas futuramente, enfatizando a necessidade de vigilância e pesquisa na área.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAGAS, D. B. *et al.* Viruses that affect *Apis mellifera* and their occurrence in Brazil. **Ciencia Rural**, [s. l.], v. 49, n. 9, 2019.

CHAGAS, D. *et al.* Detection of honey bee viruses in apiaries in Southern Brazil through two standardized multiplex RT-PCR. **Journal of Apicultural Research**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–8, 2022

COX-FOSTER, D. L. *et al.* Collapse Disorder. **Science**, [s. l.], v. 318, n. October, p. 283–288, 2007.

DOS SANTOS, C. F.; OTESBELGUE, A.; BLOCHTEIN, B. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1–13, 2018.

GARRATT, M. P. D. *et al.* Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. **Agriculture, ecosystems & environment**, Netherlands, v. 184, n. 100, p. 34–40, 2014.

KLOSOWSKI, A. L. M.; KUASOSKI, M.; BONETTI, M. B. P. Apicultura brasileira: inovação e propriedade industrial. **Revista de política agrícola**, v. 29, n. 1, p. 41, 2020.

MAORI, E. *et al.* Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: Evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 88, n. 12, p. 3428–3438, 2007.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, V.; RUIZ, C.; DE LA RÚA, P. “Migratory beekeeping and its influence on the prevalence and dispersal of pathogens to managed and wild bees”. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], v. 18, n. February, p. 184–193, 2022.

PFEIFFER, V. W.; CROWDER, D. W. Factors affecting virus prevalence in honey bees in the Pacific-Northwest, USA. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s. l.], v. 187, n. December 2021, p. 107703, 2022.

PILATI, L.; PRESTAMBURGO, M. Sequential relationship between profitability and sustainability: The Case of Migratory Beekeeping. **Sustainability**, v. 8, n. 1, p. 94, 2016.

ROCHA, F. H. *et al.* Pollination service provided by honey bees to buzz-pollinated crops in the Neotropics. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 18, n. 1 January, p. 1–20, 2023.

SIMONE-FINSTROM, M. *et al.* Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. July, p. 1–10, 2016.