

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PARASITOS E PATÓGENOS DE
Apis mellifera (APINI) EM MELIPONINI**

Suelen Oliveira França

**CRUZ DAS ALMAS - BA
2021**

PARASITOS E PATÓGENOS DE
***Apis mellifera* (APINI) EM MELIPONINI**

Suelen Oliveira França
Bióloga
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Produção Animal).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

CRUZ DAS ALMAS - BA
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

F814p	<p>França, Suelen Oliveira. Parasitas e patógenos de <i>Apis mellifera</i> (Apini) em Meliponini / Suelen Oliveira França._ Cruz das Almas, Bahia, 2021. 70f.; il.</p> <p>Orientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho. Coorientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Programa de Pós Graduação em Ciência Animal.</p> <p>1.Abelhas – Microorganismos. 2.Abelha sem ferrão – Fungos – Bactéria – Vírus – Ácaro. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 638.1</p>
-------	---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PARASITOS E PATÓGENOS DE *Apis mellifera* (APINI)
EM MELIPONINI**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
SUELEN OLIVEIRA FRANÇA

Aprovada em: 04 de fevereiro de 2021

Prof. Dr. Laudi Cunha Leite
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)
Presidente

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)
Orientador

Dra. Carine Mascena Peixoto
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)
Membro externo

Dra. Samira Maria Peixoto Cavalcante da Silva
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)
Membro interno

DEDICATÓRIA

“Até aqui nos ajudou o Senhor” (I Samuel 7: 12).
Dedico este estudo a minha avó Lucidalva (*in memoriam*) que escolheu lutar comigo até o fim. Com muito amor, cuidado, carinho, compreensão e muitas palavras de incentivo me mostrou que antes das grandes vitórias, temos que enfrentar de cabeça erguida, com fé, honestidade e alegria as grandes lutas. Mostrou-me que somos capazes de ir muito além, basta somente dedicar-se. Dedico a ela que sempre foi e será a minha maior inspiração. O seu amor sempre será o meu alicerce e a sua lembrança está cravada em meu coração. “Antes guerreira na terra e hoje um anjo no céu”.

AGRADECIMENTOS

Ao vencer cada etapa do Mestrado percebi que sozinha nunca conseguiria chegar até o fim. Foi muito aprendizado no âmbito acadêmico e pessoal durante esse tempo. Lições que levarei para toda a vida. Primeiramente: “Graças a Deus, que nos dá a vitória por meio de nosso Senhor Jesus Cristo (I Coríntios 15: 57)”.

Agradeço aos meus familiares, em especial aqueles que sempre me incentivaram a concluir o Mestrado, mesmo diante da perda de minha avó (momento de muita dor e desânimo).

Ao meu orientador prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, por ter me apresentado “o mundo das abelhas”. Obrigada pelo apoio, oportunidade, orientação, ensinamentos, compreensão e carinho, principalmente durante uma das fases mais difíceis que vivi ainda cursando o Mestrado.

A minha coorientadora profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa, por toda ajuda durante algumas análises em laboratório, pelos ensinamentos, apoio e por sempre está disposta a ajudar. A Dra. Maria Emilene Correia-Oliveira por todo ensinamento, a sua ajuda foi essencial para execução dos procedimentos vinculados à análise molecular. Obrigada por tudo! Ao Prof. Albany pela estatística dos dados, sua contribuição foi muito significativa. E aos professores da banca de qualificação e de defesa pelo direcionamento e contribuições.

Aos colegas do Núcleo de Estudos dos Insetos (INSECTA), em especial a Carize, Carine, Jaíne, Larissa Freitas, Vanessa, Clara, Luciano e Michelle pelo carinho e ajuda no desenvolvimento das atividades no laboratório. E aos demais colegas do grupo que tive o prazer de conhecer durante esse período.

A Maria Celízia por está ao meu lado nos melhores e piores momentos vivenciados na Universidade. E ao Rodrigo Gonçalves, por ser uma pessoa especial e por trazer alegria e muito amor aos meus dias, muito obrigada por escolher estar ao meu lado.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), bem como aos funcionários, professores da pós-graduação e técnicos por toda ajuda. Ao programa de pós-graduação em Ciência Animal. A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudos da pós-graduação. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto Saúde das abelhas.

E, por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para finalização deste trabalho.

“Quando os obstáculos foram superados, só então eu venci”.

PARASITOS E PATÓGENOS DE *Apis mellifera* (APINI) EM MELIPONINI

RESUMO. As abelhas são animais importantes para a agropecuária e o meio ambiente, dividindo muitas vezes os mesmos recursos florais. Elas também podem ser acometidas por diversos organismos patogênicos, o que leva a necessidade de conhecê-los. Neste trabalho avaliou-se a presença de parasitos e patógenos de *Apis mellifera* (Apini) em abelhas sociais sem ferrão (Meliponini). Um total de 80 amostras, provenientes de 40 colônias de oito espécies de abelhas sociais (*A. mellifera*, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *M. scutellaris*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Partamona helleri*, *Scaptotrigona xanthotricha*, *Tetragonisca angustula* e *Trigona spinipes*) foram avaliados durante o período seco e chuvoso. Adicionalmente, cerca de 16 amostras das oito espécies de abelhas também foram coletadas diretamente das flores de *Antigonon leptopus* L. durante esses dois períodos. Para avaliar a presença do ácaro endoparasito *Acarapis woodi* foi analisado a traquéia de *A. mellifera* pelo microscópio, enquanto para os ácaros ectoparasitos (*Leptus* spp. e *Varroa destructor*) foi realizado a triagem mecânica para contagem dos espécimes aderidos ao corpo das abelhas. A presença do fungo *Nosema* spp. foi determinada pela observação em microscópio do macerado dos abdômes de 30 abelhas por espécie. A avaliação da presença de fungos (*Ascosphaera apis*, *Nosema apis* e *N. ceranae*), bactérias (*Paenibacillus larvae* e *Melissococcus plutonius*) e vírus patogênicos (ABPV, IAPV, BQCV, CBPV, SBV, KBV e DWV) foi realizada por meio de análise molecular. O ácaro *Leptus* spp. foi encontrado em *Melipona quadrifasciata* e em *M. scutellaris*, enquanto o *V. destructor* foi encontrado exclusivamente nas amostras de *A. mellifera*. Na análise molecular das amostras não foi detectado a presença do ácaro *A. woodi*, dos fungos *Nosema* spp. e *A. apis* e das bactérias *P. larvae* e *M. plutonius*. Duas espécies de vírus (ABPV e IAPV) foram encontradas nas amostras coletadas nas colônias e nas flores de *A. leptopus*. Os resultados positivos para os vírus ABPV e IAPV foram confirmados pelo sequenciamento do DNA pela empresa ACTgene Analises Moleculares Ltda. Os resultados sugerem que parasitos e patógenos tradicionalmente conhecidos acometendo *A. mellifera*, também podem está presentes em abelhas sociais sem ferrão, inclusive em flores compartilhadas por diferentes espécies. Este é o primeiro registro da presença do *Leptus* spp. em *M. quadrifasciata* e *M. scutellaris* e do vírus ABPV em *M. quadrifasciata anthidioides*, *M. scutellaris*, *N. testaceicornis*, *P. helleri*, *S. xanthotricha*, *T. angustula* e *T. spinipes* e do vírus IAPV em *M. quadrifasciata anthidioides* e *T. angustula* na região do Recôncavo baiano.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão; Ácaros; Saúde das abelhas; Vírus.

PARASITES AND PATHOGENS OF *Apis mellifera* (APINI) IN STINGLESS BEE

ABSTRACT. Bees are important animals for agriculture and the environment and they often share the same floral resources. Bees can also be affected by several pathogenic organisms, which requires the knowledge them. In this work, we evaluated the presence of parasites and pathogens of *Apis mellifera* (Apini) in stingless social bees (Meliponini). We assessed 80 samples from 40 colonies of eight species of social bees (*A. mellifera*, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *M. scutellaris*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Partamona helleri*, *Scaptotrigona xanthotricha*, *Tetragonisca angustula*, and *Trigona spinipes*) during dry and rainy periods. In addition, about 16 samples of the eight bee species were also collected directly from flowers of *Antigonon leptopus* L. during these two periods. To assess the presence of the endoparasitic mite *Acarapis woodi*, the trachea of *A. mellifera* was analyzed under the microscope, while for ectoparasite mites (*Leptus* spp. and *Varroa destructor*), mechanical screening was performed to count the mites adhered to the body of the bees. The presence of the fungus *Nosema* spp. was determined by microscopic observation of abdomen macerate of 30 bees per species. The presence of fungi (*Ascosphaera apis*, *Nosema apis*, and *N. ceranae*), bacteria (*Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*) and pathogenic viruses (ABPV, IAPV, BQCV, CBPV, SBV, KBV, and DWV) was evaluated by molecular analysis. The mite *Leptus* spp. was found in *Melipona quadrifasciata* and *M. scutellaris*, while *V. destructor* was found only in *A. mellifera* samples. The molecular analysis of the samples did not detect the presence of mite *A. woodi*, fungi *Nosema* spp. and *A. apis* and bacteria *P. larvae* and *M. plutonius*. Two virus species (ABPV and IAPV) were found in the samples collected in the colonies and in the flowers of *A. leptopus*. The positive results for viruses ABPV and IAPV were confirmed by the DNA analysis carried out by the enterprise ACTgene Análises Moleculares LTDA. The results suggest that parasites and pathogens that traditionally affect *A. mellifera* may also occur in social stingless bees, including flowers shared by different species. This is the first record of the presence of *Leptus* spp. in *M. quadrifasciata* and *M. scutellaris* and the ABPV virus in *M. quadrifasciata anthidioides*, *M. scutellaris*, *N. testaceicornis*, *P. helleri*, *S. xanthotricha*, *T. angustula* and *T. spinipes* and the IAPV virus in *M. quadrifasciata anthidioides* and *T. angustula* in the Recôncavo Baiano region.

Key words: Stingless bees; Mites; Bee health; Virus.

LISTA DE ABREVIATURAS

AM= *Apis mellifera*

MQ= *Melipona quadrifasciata*

MS= *Melipona scutellaris*

NT= *Nannotrigona testaceicornis*

PH= *Partamona helleri*

SX= *Scaptotrigona xanthotricha*

TA= *Tetragonisca angustula*

TS= *Trigona spinipes*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Produtos da RTPCR em gel de agarose, vírus ABPV e IAPV em abelhas sociais	48
Figura 2 Frequência do vírus da paralisia aguda (ABPV) em diferentes espécies de abelhas durante o período seco e chuvoso	49
Figura 3. Frequência dos vírus nas amostras de oito espécies de abelhas sociais coletadas nas flores de <i>Antigonon leptopus</i> L	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos principais patógenos virais de abelhas. Modificado e atualizado de De Miranda <i>et al.</i> (2013)	26
Tabela 2. Principais vírus e suas respectivas vias de transmissão, infecção e sinais clínicos nas fases do ciclo de vida da abelha. Modificado de De Miranda <i>et al.</i> (2013).....	27
Tabela 3 Lista de patógenos de <i>Apis mellifera</i> (Apini) registrados em abelhas sociais sem ferrão (Meliponini) do Brasil	34
Tabela 4 Lista de <i>primers</i> específicos utilizados na PCR para a detecção de bactérias, fungos e ácaro em abelhas sociais	40
Tabela 5 Temperaturas e ciclos programados no termociclador	41
Tabela 6 Lista de <i>primers</i> específicos utilizados na RT-PCR para a detecção de vírus em abelhas sociais	42
Tabela 7 Temperaturas e ciclos programados no termociclador.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae, Apini).....	9
2.2	Abelhas sociais sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).....	11
2.3	Perda de colônias	12
2.4	Parasitismo de ácaros	13
2.4.1	Ácaro endoparasito - <i>Acarapis woodi</i> (Rennie, 1921).....	13
2.4.2	Ácaro ectoparasito - <i>Leptus</i> spp. Latreille, 1796	14
2.4.3	Ácaro ectoparasito - <i>Varroa destructor</i> Anderson & Trueman, 2000	15
2.5	Doenças ocasionadas pela ação de fungos	19
2.5.1	<i>Nosema</i> spp.....	19
2.5.2	<i>Ascospaera apis</i> Spiltoir e Lindsay, 1955.....	20
2.6	Doenças ocasionadas pela ação de bactérias	22
2.6.1	<i>Paenibacillus larvae</i> White, 1906.....	22
2.6.2	<i>Melissococcus plutonius</i> White, 1912.....	23
2.7	Doenças ocasionadas pela ação de vírus	24
2.7.1	Vírus da família Dicistroviridae	28
2.7.2	Vírus da família Iflaviridae	30
2.8	Possíveis rotas de transmissão de patógenos de <i>Apis mellifera</i> para abelhas sociais sem ferrão (Meliponini)	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Caracterização da área de estudo	35
3.2	Coleta das amostras.....	36
3.3	Avaliação dos Ácaros	37
3.4	Avaliação do Fungo <i>Nosema</i> spp.	38
3.5	Análise molecular.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Ácaros	44
4.2	Fungos	46
4.3	Bactérias	47
4.4	Vírus	48
5	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

As abelhas apresentam importância econômica pelo serviço de polinização que desempenham na natureza. Estima-se que um terço da produção agrícola seja dependente da polinização cruzada realizada por estes insetos (GARIBALDI *et al.*, 2016). A ausência de abelhas pode comprometer a reprodução sexuada e a variabilidade genética de algumas espécies vegetais, podendo levá-las à extinção, já que 85% das espécies silvestres dependem da polinização realizada por estes insetos (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2012).

A criação de abelhas no contexto da apicultura e da meliponicultura, também tem importância econômica, social e ambiental. A apicultura é caracterizada como a criação racional de abelhas sociais do gênero *Apis* em colônias artificiais e manejadas pelos humanos, cuja principal finalidade é a obtenção de mel, própolis, cera, geléia real, pólen e apitoxina (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). Já a meliponicultura refere-se à criação racional de abelhas sociais sem ferrão, sendo esta considerada uma estratégia de conservação das espécies (ESCOBAR e XAVIER, 2018). Ambas as atividades garantem renda para a população e contribuem para o desenvolvimento sustentável nas mais diversas regiões (MAIA *et al.*, 2015).

Entretanto, as abelhas são susceptíveis a diversos organismos que causam doenças havendo, portanto, uma preocupação no cenário apícola e meliponícola, em razão do enfraquecimento e declínio de colônias que vem sendo registrado em diversos países do mundo (PIRES *et al.*, 2016).

Entre as doenças que acometem as abelhas estão aquelas cujo agente etiológico são fungos, a exemplo do *Nosema apis* e *N. ceranae* causador da nosebose e *Ascospaera apis* causador da cria giz, assim como bactérias, tais como *Paenibacillus larvae* causadora da cria pútrida americana e *Melissococcus plutonius* causadora da cria pútrida europeia (SANTOS *et al.*, 2014). Além destes, o parasitismo do ácaro *Varroa destructor* causa danos nas abelhas e está associada à perda de colônias (PIRES *et al.*, 2016).

A saúde das abelhas também é afetada por patógenos virais, como o vírus deformador de asas (*Deformed Wing Virus* - DWV), da cria ensacada (*Sacbrood Bee Virus* - SBV), da paralisia lenta (*Slow Bee Paralysis Virus* - SBPV), paralisia aguda (*Acute Bee Paralysis Virus* - ABPV), Israelense da

paralisia aguda (*Israeli Acute Bee Paralysis Virus* - IAPV) e *Kashmir* (*Kashmir Bee Virus* - KBV) (CHAGAS *et al.*, 2019).

A maioria dos estudos de sanidade é referente à espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae), em razão da sua alta produtividade e expansão territorial (ALATTAL *et al.*, 2014; CHAMBÓ, 2016). O que reforça a importância da realização de estudos com as abelhas sociais sem ferrão (Hymenoptera, Meliponini), particularmente em regiões onde se desenvolve a meliponicultura, como na região do Recôncavo Baiano. Neste contexto, este estudo avaliou a presença de parasitos e patógenos de *Apis mellifera* (Apini) em abelhas sociais sem ferrão (Meliponini).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae, Apini)

As abelhas sociais são insetos de relevância na preservação da flora mundial e desde as civilizações mais antigas são manejadas pelos humanos. Estima-se que existam mais de vinte mil espécies de abelhas, dentre as quais cerca de mil espécies são altamente sociais (eusociais), todas pertencentes à ordem Hymenoptera, família Apidae, subfamília Apinae (MICHENER, 2007), incluindo espécies do gênero *Apis*, que são muito utilizadas na apicultura.

A atividade apícola teve início há cerca de 2.600 a.C., no antigo Egito sendo disseminada para outras culturas ao longo dos anos (CRANE, 1987). No Brasil, a apicultura teve início em 1849 e desde então se observa uma expansão da atividade por todos os estados (IBGE, 2019). A atividade é considerada uma alternativa socioeconomicamente viável, pois abrangem os três princípios da sustentabilidade (econômico, social e ecológico), além de ser uma garantia de renda para pequenos e médios apicultores e agricultores (MORETTI *et al.*, 2018).

O Brasil tem potencial para produção apícola e méis de boa qualidade, devido à abundância de plantas nectaríferas e poliníferas que são fontes de alimento para as abelhas. Além disso, os fatores climáticos (temperatura e umidade relativa do ar) favorecem o estabelecimento destes insetos em

diversas localidades e promove o desenvolvimento da apicultura (CHAMBÓ, 2016; MORETTI *et al.*, 2018).

No entanto, o Brasil ainda ocupa a décima posição quanto à produção mundial de mel (46,5 mil toneladas), sendo que a produtividade média por colmeia é relativamente baixa (20 kg/colmeia) em comparação, por exemplo, com a Argentina (38 kg/colmeia) (IBGE, 2019). Todavia o país está classificado entre os maiores exportadores de mel no cenário mundial, além da exportação da própolis e cera (FAO, 2018), especialmente por serem produtos da colmeia de origem multifloral e livre de contaminantes (PASIN *et al.*, 2012).

Apis mellifera é a principal espécie empregada na apicultura brasileira, devido à sua alta produtividade, quando manejadas de forma apropriada e por ser considerada a mais domesticada dentre as abelhas do gênero *Apis* (ALATTAL *et al.*, 2014; CHAMBÓ, 2016). Esta espécie não é nativa do Brasil e é conhecida como abelha africanizada, pois é oriunda do processo de miscigenação da subespécie europeia (*A. m. mellifera*) com a subespécie africana (*A. m. scutellata*) (WINSTON, 1991).

As abelhas africanizadas estão presentes em grande parte das Américas do Sul, Central e do Norte, sendo que no Brasil há predomínio destas abelhas mestiças habitando os mais diversos biomas (RANGEL *et al.*, 2016). Apenas no arquipélago Fernando de Noronha ainda é possível encontrar colônias de raças europeias pura, em razão das barreiras geográficas (MARTIN, 2016).

As abelhas africanizadas apresentam comportamento higiênico mais eficiente do que as abelhas europeias (VANDAME *et al.*, 2000). Este comportamento é um mecanismo de defesa natural, onde as abelhas apresentam predisposição genética em detectar e remover crias e abelhas adultas doentes ou mortas dentro da colônia (WILSON-RICH *et al.*, 2009). O comportamento higiênico reduz a disseminação de doenças no interior da colônia e pode ser considerado o principal fator de resistência das abelhas frente a diferentes patógenos (PINTO *et al.*, 2012).

Embora o comportamento higiênico seja controlado pela expressão de genes, que aumentam a sensibilidade em detectar compostos voláteis liberados por crias doentes ou mortas, fatores internos e externos às colônias (estoque de alimento, suplementação nutricional, fluxo de néctar e condições ambientais), podem elevar o grau de ação higiênica (BIGIO *et al.*, 2013). Neste

sentido, o manejo das colônias torna-se essencial para manutenção e seleção de rainhas que apresentam potencial higiênico na colmeia (AL TOUFAILIA *et al.*, 2018; MCAFEE *et al.*, 2018).

2.2 Abelhas sociais sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

As abelhas sociais sem ferrão também fazem parte do grupo de importantes polinizadores na natureza, além disso, são produtoras de mel. A prática da meliponicultura é considerada uma atividade sustentável, cujo impacto ambiental é mínimo e é exercida em diferentes partes do mundo (BARTELLI e NOGUEIRA-FERREIRA, 2014).

No Brasil a meliponicultura começou a ser praticada pelos povos indígenas e, desde então vêm crescendo em várias regiões do país (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2014). Além do mel, a geoprópolis, samburá, cerume, enxames e pólen também são comercializados e gera renda para médios e pequenos meliponicultores (SANCHES *et al.*, 2017).

Existe uma diversidade de espécies de abelhas sociais sem ferrão espalhadas pelas regiões tropicais e subtropicais (PEDRO, 2014). No Brasil, são descritas aproximadamente trezentas espécies de meliponíneos. Dentre eles, o gênero *Melipona* tem cerca de setenta espécies catalogadas (MOURE *et al.*, 2007). Entre as principais espécies manejadas na meliponicultura brasileira se destacam: *Melipona quadrifasciata*, *M. scutellaris*, *Scaptotrigona xanthotricha* e *Nannotrigona testaceicornis* (ROCHA e ALENCAR, 2012; DO NASCIMENTO *et al.*, 2018). Esses insetos possuem como característica peculiar o ferrão atrofiado e, por este motivo, são conhecidas como abelhas sem ferrão, além de indígenas, nativas ou meliponíneos. O hábito de nidificação também é considerado uma característica diferenciada e frequentemente é utilizado para diferenciar as espécies (MICHENER, 2007).

As abelhas sociais sem ferrão são produtoras de méis, cujo valor comercial é alto, devido principalmente ao sabor e aroma (SILVA *et al.*, 2014), concentração de compostos bioativos que lhe confere características medicinais (CALDAS *et al.*, 2020) e ácidos orgânicos (SANT'ANA *et al.*, 2020).

As abelhas sociais sem ferrão também se destacam quando se trata de polinização. Estima-se que 60% das cultivares de interesse agrícola são dependentes da polinização por meliponíneos (BROSI *et al.*, 2009), como no cultivo do tomateiro, polinizado pela abelha *Melipona quadrifasciata*, do pimentão pela *Melipona subnitida* (ROSELINO *et al.*, 2010) e berinjelas por *Melipona fasciculata* (NUNES-SILVA *et al.*, 2013).

Os polinizadores nativos, em geral são explorados junto às abelhas exóticas *A. mellifera*, com o intuito de intensificar a polinização e suprir a grande demanda de polinizadores nos cultivos dependentes de insetos (GARIBALDI *et al.*, 2014). O uso de meliponíneos surge como uma alternativa eficaz, especialmente quando se trata de ambientes protegidos, além do mais, abelhas do gênero *Melipona* conseguem visitar plantas que necessitam de polinização por vibração, como é o caso de algumas espécies com antera do tipo porcida, nas quais a *A. mellifera* não é eficiente (LIMA e ROCHA, 2012; BARTELLI e NOGUEIRA-FERREIRA, 2014).

Com a expansão da criação das abelhas sem ferrão em todo o país (VENTURIERI *et al.*, 2012), aumenta a possibilidade do contato com parasitos e patógenos tradicionalmente conhecidos para *A. mellifera*. De forma geral, ainda são poucos os estudos sobre parasitos e patógenos que acometem as abelhas sem ferrão. Há relatos de besouros parasitas (GRECO *et al.*, 2010), fungos (PORRINI *et al.*, 2017) e vírus (UEIRA-VIEIRA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2019). Entretanto, já se sabe que elas também possuem comportamento higiênico (MEDINA *et al.*, 2009; AL TOUFAILIA *et al.*, 2016; DE JESUS *et al.*, 2017), um aliado contra as patologias das colônias.

Devido a importância ecológica das diferentes espécies de abelhas sociais e o aumento no número de estudos que apontam para o declínio destes polinizadores, pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de preencher lacunas referentes às informações sobre perdas de colônias (LEE *et al.*, 2015).

2.3 Perda de colônias

O enfraquecimento e a perda de colônias de abelhas podem ser causados por um ou mais fatores (antrópicos e/ou biológicos), que atuam de forma isolada ou sinergicamente. As mudanças climáticas e o desmatamento

alteram a diversidade de flores no campo para as abelhas e, como consequência, prejudicam sua dinâmica de forrageio (PIRES *et al.*, 2016), afetando diretamente o estado nutricional e reduzindo a eficiência na resposta imune desses insetos (BOSCOLO *et al.*, 2017).

A resposta imune das abelhas é reduzida com a baixa ingestão de pólen e néctar, uma vez que estes fornecem aminoácidos, proteínas e serve como fonte de energia para o metabolismo do sistema imunológico. Assim, o desmatamento, bem como as mudanças climáticas, interfere na dieta multifloral das abelhas, tornando-as susceptíveis a ação de patógenos, principalmente as colônias não manejadas, devido a ausência de suplemento nutricional adequado (AL AUX *et al.*, 2010).

Por outro lado, o uso indiscriminado de diferentes classes de agrotóxicos na agricultura é considerado o principal agente de toxicidade aguda nas abelhas, especialmente quando expostas a via de contato corporal e por ingestão (HENRY *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2018; NEVES *et al.*, 2020). Outro agravante é associado à ação subletal, que causa alterações comportamentais, imunológicas e relacionadas ao desenvolvimento, podendo levar a morte da abelha (GOULSON *et al.*, 2015).

A saúde das abelhas também é prejudicada pela ação de diferentes parasitos e patógenos, que associados ou não às condições abióticas, deficiência nutricional e baixa resposta imunológica, podem tornar-lá muito vulnerável (PIRES *et al.*, 2016). Os ácaros, fungos, bactérias, protozoários e vírus são os principais agentes patogênicos e atuam em conjunto ou isoladamente, podendo levar a morte das abelhas em diferentes estágios do seu desenvolvimento e enfraquecer as colônias (ROSA *et al.*, 2019).

2.4 Parasitismo de ácaros

2.4.1 Ácaro endoparasito - *Acarapis woodi* (Rennie, 1921)

Acarapis woodi faz parte da família Tarsonemidae e já foi registrado estando presente em colônias de *A. mellifera*. A primeira detecção foi em 1921 no Reino Unido. O ácaro já foi detectado em abelhas na Europa, Ásia, América Central e América do Sul (MARTÍNEZ-CESÁREO *et al.*, 2016; PIRK *et al.*,

2016). No Brasil, o primeiro registro do ácaro em *A. mellifera* ocorreu em 1971 (NASCIMENTO *et al.*, 1971), mas não tem sido encontrado nas abelhas africanizadas (PEIXOTO *et al.*, 2020).

O endoparasito penetra nos estigmas respiratórios da abelha adulta e coloniza a sua traquéia, completando ali o seu ciclo de vida. O ciclo biológico das fêmeas é em torno de 14 a 15 dias, enquanto o macho transcorre um período menor entre 11 a 12 dias (SAMMATARO *et al.*, 2000). Esse ácaro se alimenta da hemolinfa do hospedeiro e após completar seu ciclo, cresce e se multiplica, obstruindo a sua via respiratória levando a morte da abelha (OTIS e SCOTT-DUPREE, 1992; PETTIS *et al.*, 1992).

Nem sempre os sinais clínicos da presença deste ácaro são visíveis ao apicultor. Geralmente os mais comuns são dificuldade ao se locomover (rastejar) e deformidades nas asas, sendo estes inespecíficos e quase sempre associados à doença nosemose ou a infecções promovidas por vírus. Em vista disso, a confirmação do endoparasitismo por *A. woodi* deve ocorrer por meio da análise traqueal da abelha via microscópio e ou pela análise do seu material genético (CEPERO *et al.*, 2015).

2.4.2 Ácaro ectoparasito - *Leptus* spp. Latreille, 1796

A família Erythraeidae abrange os ácaros do gênero *Leptus* sp. Existem cerca de noventa espécies identificadas como pertencentes a este gênero. As associações entre ácaros desta família e abelhas é muito rara. Entretanto, sabe-se que as larvas do *Leptus* spp. tem ectoparasitado *A. mellifera* (TEIXEIRA, 2008).

O primeiro relato do ácaro na América do Sul ocorreu em 1947 na Colômbia e, posteriormente no Peru em 1980 (BAKER e SELDEN, 1997). No Brasil *Leptus* spp. já foi encontrado em abelhas *A. mellifera* nos estados de São Paulo (TEIXEIRA *et al.*, 2011) e da Bahia (MARTIN e CORREIA-OLIVEIRA, 2016).

O desenvolvimento do ácaro até alcançar a fase adulta envolve seis estágios (ovo, pré-larva, larva, protoninfa, deutoninfa e tritoninfa). As fêmeas ovipositam e permanece no solo até a eclosão dos ovos (ZHANG, 1997). É na fase de larva que o *Leptus* spp. parasita as abelhas, fixando-se sobre o seu

abdômen, tórax ou cabeça. Logo após concluir a metamorfose da fase larval o ácaro retorna para o solo, ainda na fase de deutoninfa, para completar o ciclo de vida (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

O ácaro *Leptus* spp. não leva muito tempo sobre a abelha, já que o mesmo não completa seu ciclo de vida dentro da colmeia. Por este motivo, a identificação da espécie que ectoparasita as abelhas são bastante difíceis, o que se conhece até o momento é a classificação em nível de gênero. Apesar disto, consta-se que a frequência do *Leptus* spp. sobre o corpo das abelhas *A. mellifera* (três a quatro ácaros por abelha) têm sido maiores, quando comparado ao ectoparasitismo do ácaro *Varroa destructor* (TEIXEIRA, 2008).

As larvas do ácaro se alimentam da hemolinfa do hospedeiro e apresentam coloração vermelho-alaranjadas, são hexápodes e bastante móveis. O ectoparasitismo ocorre somente em abelhas adultas, preferencialmente campeiras, não havendo relatos sobre a presença em células de crias (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Ao alimentar-se da hemolinfa, o *Leptus* spp. produz no corpo das abelhas um sistema de tubos ramificados, denominado de estilóstoma, que é o resultado da interação de compostos presente no metabolismo do hospedeiro com a secreção salivar do ácaro (SOUTHCOTT, 1961). Em decorrência do ectoparasitismo, os sinais clínicos manifestados são: presença de abelhas com pêlos arrepiados e operárias pequenas em comparação com as demais dentro da colônia (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

O impacto das larvas do ácaro nas abelhas é pouco conhecido, embora este seja considerado um vetor da bactéria *Spiroplasma apis*, agente da doença de maio em abelhas. A associação entre o ácaro e a bactéria pode levar ao enfraquecimento da colônia e conseqüente perda ou abandono desta, já que ambos são patogênicos e causam infecções distintas, podendo agravar o quadro infeccioso e comprometer a sanidade da abelha (DIBLASI *et al.*, 2011).

2.4.3 Ácaro ectoparasito - *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000

O ácaro *Varroa destructor*, família Varroidae, é responsável pela varroatose, sendo observado pela primeira vez em uma ilha na Indonésia

ectoparasitando a abelha asiática *Apis cerana*. Inicialmente o *V. destructor* foi denominado como *Varroa jacobsoni*, no entanto, posteriormente alguns pesquisadores descobriram que na verdade existiam duas espécies de *Varroa* nocivas para as abelhas: *V. jacobsoni* que parasita *Apis cerana* e *V. destructor* que parasita *A. mellifera* (SAMMATATO *et al.*, 2000).

Varroa destructor é cosmopolita e tem sido registrado infestando colônias *A. mellifera* na China (SMIRNOV, 1979), Estado Unidos (DE GUZMAN *et al.*, 1997), Reino Unido (PAXTON, 1992), México (VANDAME *et al.*, 2002), países da Europa (DIETEMANN *et al.*, 2012) e no Brasil (DE JONG e GONÇALVES, 1981; CASTAGNINO e ORSI, 2012).

O ácaro apresenta dimorfismo sexual, sendo que o macho apresenta formato mais arredondado, de menor tamanho (1 mm) e tonalidades que variam do castanho acinzentado ao branco, além de quelíceras modificadas (estrutura tubular), as quais são utilizadas apenas para deposição do sémen (SILVA, 2010). O ácaro macho apresenta função apenas reprodutiva e, portanto, morre na célula de cria devido à alimentação reduzida (MURILHAS e CASACA, 2004).

Somente a fêmea do ácaro é capaz de parasitar as crias e fixar-se sobre a abelha adulta, apresenta forma elipsoidal achatado e exibem diferentes tons de marrom, pernas com ventosas para facilitar a sua aderência no hospedeiro e quelíceras adaptadas para perfurar (ELLIS e NALEN, 2010; SILVA, 2010).

O ciclo de vida do *V. destructor* é marcado por duas fases distintas: fase forética e fase reprodutiva. A fase forética é caracterizada como fase de dispersão do ácaro dentro e fora da colônia, sendo que nesta fase o ácaro é totalmente dependente da abelha adulta para deslocar-se (IFANTIDIS, 1988). Ao encontrar condições favoráveis e oportunas, a fêmea do *Varroa* invade a célula da cria e inicia a segunda fase do seu ciclo biológico, a reprodução e o desenvolvimento. O ácaro permanece “escondido” entre a larva e o alimento depositado antes da operculação do alvéolo da cria (entre o 1° e 2° dia da fase larval ou no 5° ínsta) (TORRES e BARRETO, 2013; MORTENSEN *et al.*, 2016).

A larva e pupa das operárias e zangões são os hospedeiros alvo deste ectoparasito, devido ao maior acúmulo do hormônio juvenil 3, este hormônio serve como um indicador para oviposição do ácaro fêmea. No decorrer de 5

horas após se estabelecer no alvéolo da cria a fêmea do *Varroa* inicia sua alimentação (TAPIA, 2010).

Os ovos do *V. destructor* tem coloração branca e não são visíveis a “olho nu”, medindo aproximadamente 0,30 x 0,23 mm. Ao eclodir o ácaro passa por duas etapas de desenvolvimento: a primeira é a protoninfa. Neste estágio o ácaro é facilmente visível a olho nu, porém ainda não há diferenciação morfológica entre os sexos. A segunda fase é a deutoninfa, na qual ocorre o dimorfismo sexual. Em ambas as ninfas (proto e deuto) o ácaro permanece imóvel e imaturo (ELLIS e NALEN, 2010).

A reprodução do ácaro ocorre por partenogênese, sendo assim, o primeiro ovo (não fecundado) dá origem a um macho. Esta é uma estratégia vantajosa, já que os machos tendem a atingir primor sexual depois das fêmeas. Após atingir maturidade sexual o ácaro macho fecunda suas irmãs (SILVA, 2010). O período da metamorfose completa (idade adulta) e o alcance da maturidade sexual dura em torno de 12 a 14 dias (ELLIS e NALEN, 2010).

Quando a abelha completa seu desenvolvimento ontogenético e emerge, a fêmea do ácaro sai da célula da cria juntamente com a abelha adulta. É nesta ocasião que ocorre à dispersão do ectoparasito (NEMOSE, 2013). Uma fêmea do *Varroa* consegue permanecer na colônia durante três meses e realizar postura cerca de três vezes durante este espaço de tempo, sendo que a abelha, a qual o ácaro emerge sobre seu dorso, não é capaz de sobreviver por um longo intervalo de tempo e acaba morrendo (MURILHAS e CASACA, 2004).

A infestação do *V. destructor* na abelha está relacionada com a boa nutrição do ácaro durante o parasitismo, além da temperatura e umidade da colônia. Fêmeas não bem nutridas buscam novos hospedeiros para sobreviver e realizar a postura de ovos (TORRES e BARRETO, 2013).

O período mais frio pode ser considerado o período com condições favoráveis para a dispersão do *Varroa* dentro da colônia, já que nesta época do ano as abelhas permanecem mais tempo no interior da colônia. Assim, abelhas nutrizas, faxineiras ou enfermeiras tem maior chance de contato com abelhas campeiras parasitadas, as quais também estão abrigadas na colônia, podendo levar o ácaro até as células das crias saudáveis (FRAZIER *et al.*, 2000).

A principal consequência do parasitismo de *V. destructor* são abelhas adultas enfraquecidas, em resposta a intensa anemia provocada, deformidade

nas asas, redução do volume abdominal, conteúdo protéico reduzido, forrageamento prejudicado, em razão do distúrbio comportamental, dentre outros (SAMMATARO *et al.*, 2013).

Diferentes técnicas são aplicadas para o controle do *Varroa*, dentre eles a utilização de acaricidas (SAMMATARO *et al.*, 2005), ácido oxálico (PORRINI *et al.*, 2017), uso de óleos essenciais (DAMIANI *et al.*, 2009), manejo específico que vise controlar a oviposição da rainha e impedir a proliferação do ácaro nas células de cria (ROSENKRANZ *et al.*, 2010), dentre outros. Entretanto, alguns desses métodos de combate ao ácaro são prejudiciais às abelhas, principalmente aqueles de constituição química e o uso indiscriminado pode tornar o parasito ainda mais resistente (CASTAGNINO e ORSI, 2012).

As abelhas desenvolveram naturalmente mecanismos de defesa contra parasitos e patógenos. Estudos demonstram que as abelhas africanizadas são consideradas mais resistentes que abelhas nativas e a raça europeia, principalmente com relação à presença de ectoparasitos devido ao comportamento higiênico, caracterizando-se como um importante fator de resistência nativa (PINTO *et al.*, 2012).

Além do comportamento higiênico, o *grooming*, definido como a retirada dos ectoparasitos do próprio corpo (*auto-grooming*) ou do corpo de outras abelhas (*allo-grooming*), também compõe o conjunto de autodefesa das abelhas (MEDINA *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2012).

A infestação pelo *V. destructor* pode ser influenciada por diversos fatores, tais como as estações do ano, a subespécie da abelha, resistência a patógenos e a nutrição do hospedeiro (BAK *et al.*, 2010; CORREIA-OLIVEIRA *et al.*, 2018). O ácaro *V. destructor* é ainda considerado vetor de vírus para as abelhas, (PINTO *et al.*, 2015) e, por este motivo, a presença do ácaro nas colônias tem sido apontada como um dos principais agravantes pela perda de colônias (TORRES e BARRETO, 2013).

2.5 Doenças ocasionadas pela ação de fungos

2.5.1 *Nosema* spp.

Os microsporídios do gênero *Nosema* spp. (Microsporidia: Nosematidae) são parasitos intracelulares de insetos, como a espécie *N. bombycis* que parasita o bicho-da-seda (MA *et al.*, 2013) e o *N. ceranae* que é parasito de vespas sociais (PORRINI *et al.*, 2017). O *Nosema* spp. também acomete *A. mellifera* e causa a doença nosemose. Além de ser agente patológico de abelhas do gênero *Bombus* spp. (REYNALDI *et al.*, 2013) *Melipona* spp. (PORRINI *et al.*, 2017) e *Nannotrigona* spp. (GUIMARÃES-CESTARO, 2020).

Em *A. mellifera* existe dois tipos de nosemose causada por espécies distintas do *Nosema* spp.. O *N. apis* é responsável pela nosemose do tipo A e causa desintéria ns abelhas, sendo possível observar manchas fecais na entrada da colônia afetada, enquanto o *N. ceranae* causa o tipo C e leva a paralisia (HIGES *et al.*, 2010).

A infecção por *N. apis* ocorre, em grande parte dos casos, no início da primavera com baixa ocorrência no verão, enquanto *N. ceranae* pode ocorrer em diferentes estações do ano (FRIES, 2010). No Brasil, a nosemose foi detectada em colônias de *A. mellifera* instaladas nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste (TEIXEIRA *et al.*, 2013; MERCÊS, 2018). E no Sudeste e Centro Oeste o *N. ceranae* foi detectado em *Melipona* spp. (PORRINI *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2020).

A temperatura é fundamental no ciclo reprodutivo do *Nosema* spp. O *N. ceranae* consegue se propagar mais rapidamente e causar infecções mais intensas quando comparado ao *N. apis*, pois consegue sobreviver em uma faixa de temperatura com maiores variações (de 25° a 37° C) e apresenta alta adaptabilidade a diferentes climas (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

A contaminação por *Nosema* spp. ocorre por via oral, por meio da ingestão de alimento contaminado ou fecal pelo contato com fezes contendo esporos do microporídeo. O microrganismo se multiplica e afeta as células ventriculares das abelhas adultas diminuindo assim a absorção de nutrientes. Ao lesar o sistema digestório as abelhas ficam mais susceptíveis a outras infecções, seja por vírus ou bactérias (GUIMARÃES-CESTARO *et al.*, 2016).

Os esporos são as formas transmissíveis do microporídeo, sendo os esporos do *N. ceranae* mais resistentes do que os do *N. apis*, devido a resistente a ambientes diversos e desfavoráveis (FRIES, 2010) e por apresentar especificidade na interação patógeno-hospedeiro que auxilia no seu desenvolvimento (HUANG e SOLTER, 2013).

A morfologia dos esporos de *N. apis* e *N. ceranae* é semelhante e, neste caso, a diferenciação entre as espécies pode ser feita utilizando microscópio óptico, pois o esporo de *N. apis* é maior (6 µm x 3 µm) do que o esporo de *N. ceranae* (4,4 µm x 2,2 µm) (CHEN *et al.*, 2009). A detecção e diferenciação das espécies também podem ser realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo esta uma metodologia mais adequada devido à sensibilidade e especificidade da técnica (LE CONTE e NAJAVAS, 2008).

O *Nosema* spp. pode promover a diminuição populacional das abelhas adultas e baixo rendimento na produção de mel e a principal consequência é o declínio na geração de renda devido à improdutividade das colônias afetadas pela doença (GOBLIRSCH *et al.*, 2013).

2.5.2 *Ascospaera apis* Spiltoir e Lindsay, 1955

Na família Ascosphaeracea está incluso outro fungo patogênico para as abelhas, o *Ascospaera apis*, agente da doença cria giz. Esta espécie é dióica e apresenta dois ciclos de vida: o primeiro é a produção dos esporos (fase de disseminação do patógeno) e o segundo, o desenvolvimento do micélio (fase vegetativa) (BAILEY e BALL, 1991).

Relatos sobre contaminação por *A. apis* têm sido documentados em *A. mellifera* em regiões de clima quente e úmido (REHNER e EVANS, 2009). A doença já ocorreu no Japão, Argentina, Filipinas, América Central, México e no Brasil, sendo considerada uma ameaça em regiões onde a apicultura é comum (FLORES *et al.*, 2000).

No Brasil, a cria giz foi diagnosticada nas regiões Sul e Sudeste em colônias de *A. mellifera*, principalmente durante a estação chuvosa (BRAGANÇA e BARRETO, 2015). Além dessa espécie, a cria giz foi diagnosticada em abelha solitária cortadora de folhas *Megachile rotundata* (vanDENBERG, 1992). Para as abelhas sociais sem ferrão, Foley *et al.* (2014)

mencionaram uma diversidade de outros fungos patogênicos que ameaçam a sua sanidade, entretanto ainda há uma carência sobre informações da contaminação por *A. apis* e quais os reais danos causados à saúde destes polinizadores.

Os esporos do *A. apis* são resistentes a altas temperaturas e pode está presente no mel ou aderido ao pólen, tornando possível a sua prevalência ao longo do tempo na colônia (GUIMARÃES-CESTARO *et al.*, 2016). *Ascosphaera apis* acomete as larvas e pupas das abelhas, mas também já foi detectado em abelhas adultas (MAXFIELD-TAYLOR *et al.*, 2015). A contaminação por *A. apis* ocorre por via oral através da ingestão de pólen contendo os esporos. Posteriormente, os esporos são germinados no lúmen do intestino das abelhas (BRAGANÇA e BARRETO, 2015), ocorrendo então o crescimento vegetativo do fungo, no qual é formado um o micélio de hifas septadas e de cor branca que invade os tecidos e contamina toda a larva, levando-a a morte precoce.

Após a morte do hospedeiro, as hifas do fungo emergem sobre a matéria orgânica (BAILEY e BALL, 1991). Quando sobre a larva estão presentes apenas hifas de um único sexo não ocorre reprodução sexuada e o fungo expressa características importantes que, em geral indicam sinais clínicos da cria giz nas abelhas, tais como: aspecto ressecado, coloração esbranquiçada, forma mumificada e endurecida semelhante a um pedaço de giz (JENSEN *et al.*, 2013). O processo de mumificação e endurecimento é devido ao crescimento do próprio micélio do *A. apis* sobre a larva morta em decomposição (MAXFIELD-TAYLOR *et al.*, 2015).

Pode acontecer de ocorrer reprodução sexuada do fungo e originar novos ascocistos que dará origem a novos esporos, facilitando a disseminação do fungo dentro da colônia. Além destes sinais clínicos, a doença também causa irregularidade nas células de crias, alvéolos não operculados e/ou presença de opérculos perfurados (JENSEN *et al.*, 2013).

As possíveis rotas de transmissão da doença para colônias sadias ou dentro da própria colônia afetada podem suceder quando, abelhas faxineiras realizam a remoção da larva morta, neste caso, é possível que haja disseminação dos esporos dentro da colônia e posteriormente estar presente no alimento das próximas crias saudáveis (JENSEN *et al.*, 2013). Ou, mediante

abelhas campeiras e zangões, que durante a visita nas flores no campo podem levar grãos de pólen já contaminados pelo *A. apis* para colônia. Além disto, o uso de equipamentos apícolas contaminados facilita a transmissão do fungo durante o manejo (REHNER e EVANS, 2009).

2.6 Doenças ocasionadas pela ação de bactérias

2.6.1 *Paenibacillus larvae* White, 1906

Paenibacillus larvae é uma bactéria gram positiva responsável pela doença cria pútrida americana nas abelhas. O microrganismo apresenta formato de bastonete e utiliza flagelos para locomoção. A bactéria também é formadora de esporos com diâmetro de 1,3 x 0,6 µm, altamente resistentes a altas temperaturas, a uma variedade de produtos químicos, a luz solar direta, a fermentação e a diversos antimicrobianos (EVANS, 2003). Por este motivo, a cria pútrida americana tem sido apontada como uma doença que ameaça a apicultura e meliponicultura, devido à capacidade do *P. larvae* de esporular (DE GRAAF *et al.*, 2013; MORRISSEY *et al.*, 2015).

No Brasil, o *P. larvae* é comumente encontrado em *A. mellifera* nas regiões Sudeste (São Paulo) (SANTOS *et al.*, 2014) e Sul (Rio Grande do Sul) (MULLER *et al.*, 2011) ou estando presente em seus méis. E no Nordeste Mercês (2018), reportou a presença do *P. larvae* em *A. mellifera* no Recôncavo da Bahia, inferindo que há ocorrência da cria pútrida americana no Nordeste brasileiro. A introdução do *P. larvae*, bem como outras espécies patogênicas no Brasil provavelmente ocorreu por meio da apicultura migratória (ALBO e REYNALDI, 2010; JARA *et al.*, 2018) ou através da contaminação dos produtos da colmeia, especialmente o mel, que é considerado um meio de disseminação de fungos e bactérias esporuladas (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

O *P. larvae* acomete principalmente a pupa e a contaminação ocorre ao ingerir o alimento contaminado. Os esporos germinam no lúmen do intestino médio, a bactéria invade a hemocele e, por fim, infecta os demais tecidos levando a morte da cria hospedeira (GENERSCH, 2010). Estudos demonstram que substâncias do metabolismo secundário de abelhas adultas inibem o

desenvolvimento do *P. larvae* e, por esta razão, são mais tolerantes a este patógeno (MATARRITA-CARRANZA *et al.*, 2017).

Os esporos do *P. larvae* podem ser disseminados para crias saudáveis, através de abelhas faxineiras, quando promovem a retirada da pupa morta e, em seguida entra em contato com operárias nutrizes. Além desta, abelhas campeiras levam os esporos para flores no campo e também promove a dispersão dos esporos para abelhas de colônias vizinhas (LOPES *et al.*, 2004). A disseminação de *P. larvae* pode ocorrer também durante o manejo das colônias ao se utilizar equipamento apícola ou alimento artificial (xarope de açúcar) contendo pelos esporos (GENERSCH, 2010).

Os sinais clínicos observados na colônia afetada são: favos de cria escuros, opérculos perfurados com aspecto gorduroso e crias mortas na fase de pré-pupa ou pupa com cheiro pútrido, sendo este último o que originou o nome da doença (GENERSCH e AUBERT, 2010).

2.6.2 *Melissococcus plutonius* White, 1912

Acreditava-se que a doença cria pútrida europeia era ocasionada pela associação mutualista entre as bactérias *Melissococcus plutonius*, *M. alvei*, *Bacillus laterosporus*, *B. orpheus*, *Acromobacter euridyce*, *Chromobacter euridycee* e *Enterococcus faecalis* (BAILEY, 1961). No entanto, sabe-se que o agente da doença é a bactéria *Melissococcus plutonius*, pertencente à família Enterococcaceae (FORSGREN *et al.*, 2013).

O *Melissococcus plutonius* é uma bactéria gram positiva, em forma de cocos, formadora de esporos com cerca de 0,6 x 1 mm de diâmetro. No Brasil o *M. plutonius* foi detectado em *A. mellifera* nas regiões Sul (MULLER *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2014) e Nordeste (MERCÊS, 2018). A saúde das abelhas sociais sem ferrão (*Melipona* spp.) no Sudeste do Brasil também é afetada por *M. plutonius*, indicando que existe uma relação de parasitismo da bactéria com estas espécies (TEXEIRA *et al.*, 2020).

A contaminação por *M. plutonius* é semelhante à da cria pútrida americana (FORSGREN, 2010) e os principais sinais clínicos são: presença de larvas doentes retorcidas no formato de C, com coloração escura e cheiro pútrido (ARAI *et al.*, 2012). Uma característica essencial para diferenciar a

doença cria pútrida europeia da cria pútrida americana é com relação ao tempo de vida das crias mortas. Na europeia a cria morre na fase larval, enquanto na americana a morte acontece na fase de pré-pupa ou pupa (GENERSCH, 2010).

A detecção da doença na larva infectada é possível, mediante análise em campo, quando se observa larvas mortas e apresentando os sinais clínicos característicos. A confirmação da cria pútrida europeia também pode ser feita via análise laboratorial com o isolamento bacteriano ou análise molecular (ARAI *et al.*, 2012; FORSGREN *et al.*, 2013).

2.7 Doenças ocasionadas pela ação de vírus

As infecções virais são consideradas um dos fatores mais agravantes no declínio das populações de abelhas (FRANCIS e KRYGER, 2012). No entanto, ainda não se sabe o real impacto da perda de colônias ocasionada por vírus para a economia brasileira, sobretudo no Nordeste (GUZMAN-NOVOA *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2016).

Os vírus são considerados parasitas intracelulares obrigatórios que utilizam o aparato enzimático de uma célula hospedeira para sobreviver e replicar-se. A frequência da replicação da progênie viral é inversamente proporcional ao tamanho do genoma e quando fora do hospedeiro permanece cristalizado até infectar a célula alvo (GIFFORD, 2011).

Os vírus são constituídos apenas pelo material genético DNA e ou RNA, de fita simples ou dupla. Uma capa protetora (capsídeo) de natureza protéica ou lipídica formada por protômeros que lhes confere diferentes formas (icosaédrica, anisométrica, poliédrica, linear e helicoidal). Os vírus podem apresentar ou não um envelope, cuja função é proteger o ácido nucléico (STEPHENS *et al.*, 2009). De acordo com as suas propriedades químicas e morfologia, os vírus podem ser agrupados taxonomicamente em diferentes gêneros (TAVARES, 2018).

Por apresentar uma estrutura menos complexa, os vírus necessitam burlar o sistema imune do hospedeiro utilizando mecanismos de reconhecimento, o qual envolve ligação aos receptores da célula alvo. Depois que invade a célula os vírus iniciam as etapas de transcrição, tradução e

replicação do material genético, dando origem a novas cópias da partícula viral (vírion) que, por sua vez, infectam outras células alvo do organismo hospedeiro (GUIDOTTI e CHISARI, 2001). Em compensação a célula hospedeira ativa a resposta do sistema imune para combater a invasão do patógeno, mas a depender da ação utilizada pelos os vírus e sanidade da abelha, ela não consegue se defender de forma imediata (ADEREM e ULEVITCH, 2000).

Os vírus de abelhas podem ter duas vias de transmissão. Na transmissão horizontal, a transferência de vírus ocorre entre indivíduos da mesma geração, podendo ser de forma direta (alimentação, ar e contato corporal) ou indireta, por meio de vetores biológicos como ácaros (CHEN *et al.*, 2006). Vale ressaltar, que a transmissão horizontal de forma indireta em condições naturais não é rara, devido à presença recorrente do ácaro *V. destructor* nas colônias. A segunda via é vertical, nesta o vírus é transmitido através do ovário e sêmen para as futuras gerações (ROSENKRANZ *et al.*, 2010).

Para abelhas melíferas, foram identificadas cerca de vinte e cinco espécies de vírus. Deste total, sete espécies são frequentemente estudadas em *A. mellifera* devido sua relação com perdas de colônias (Tabela 1) (DE MIRANDA *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014). As vias de transmissão, a fase do ciclo de vida da abelha onde ocorre à infecção e os sinais clínicos dos principais vírus estão resumidos na (Tabela 2).

Tabela 1 Classificação dos principais patógenos virais de abelhas. Modificado e atualizado de De Miranda *et al.* (2013)

Família	Espécie	Siglas	Ácido nucléico	Formato	Tamanho da partícula viral
Baculoviridae	<i>Apis mellifera Filamentous Virus</i>	AmFV	dsDNA	Linear	150x450nm
Dicistroviridae	<i>Aphid Lethal Paralysis Virus</i>	ALPD	ssRNA	Icosaedro	30nm
	<i>Big Sioux River Virus</i>	BSRV	ssRNA	Icosaedro	30nm
	<i>Acute Bee Paralysis Virus</i>	ABPV	ssRNA	Icosaedro	30nm
	<i>Black Queen Cell Virus</i>	BQCV	ssRNA	Icosaedro	30nm
	<i>Israeli Acute Paralysis Virus</i>	IAPV	ssRNA	Icosaedro	30nm
	<i>Kashmir Bee Virus</i>	KBV	ssRNA	Icosaedro	30nm
	Iflaviridae	<i>Slow Bee Paralysis Virus</i>	SBPV	ssRNA	Icosaedro
<i>Sacbrood Virus</i>		SBV	ssRNA	Icosaedro	30nm
<i>Thai/Chinese Bagged Chick Virus</i>		TSBV	ssRNA	Icosaedro	30nm
<i>Deformed Wing Virus</i>		DWV	ssRNA	Icosaedro	30nm
<i>Varroa destructor vírus 1</i>		VDV-1	ssRNA	Icosaedro	30nm
<i>Egypt bee vírus</i>		EBV	ssRNA	Icosaedro	30nm
Iridoviridae		<i>Apis Iridescent Virus</i>	AIV	dsDNA	Poliedro
	<i>Chronic Bee Paralysis Satellite Virus</i>	CBPSV	ssRNA	Anisométrico	17nm
Tymoviridae	<i>Varroa destructor Macula-Like Virus</i>	VdMLV	ssRNA	Icosaedro	30nm
NI	<i>Arkansas Bee Virus</i>	ABV	ssRNA	Icosaedro	30nm
	<i>Bee Virus-X</i>	BVX	ssRNA	Icosaedro	35nm
	<i>Bee Virus-y</i>	BVY	ssRNA	Icosaedro	35nm
	<i>Berkely Bee Picorna-Like Virus</i>	BBPV	ssRNA	Icosaedro	30nm
	<i>Cloudy Wing Virus</i>	CWV	ssRNA	Icosaedro	17nm
NC	<i>Lake Sinai Virus-1</i>	LSV-1	ssRNA	NI	NI
	<i>Lake Sinai Virus-2</i>	LSV-2	ssRNA	NI	NI
	<i>Chronic Bee Paralysis Virus</i>	CBPV	ssRNA	Icosaedro	30-60nm
	<i>Orthomyxovirus-1</i>	VOV-1	ssRNA	NC	NC

Linhas escuras: vírus que frequentemente são estudados como patógenos de *Apis mellifera*. NI: não informado. NC: não classificado.

Tabela 2 Principais vírus e suas respectivas vias de transmissão, infecção e sinais clínicos nas fases do ciclo de vida da abelha. Modificado de De Miranda *et al.* (2013)

Vírus	Vias de Transmissão		Vertical	Infecções/Sinais clínicos			
	Horizontal			Fases do Ciclo de Vida			
	Direta	Indireta	Sêmen	Ovo	Larva	Pupa	Adulto
	Oral-Fecal	Ácaro					
BQCV	+	*	?	+/-	+/-	+/+	+/-
ABPV	+	+	+	+/-	+/-	+/?	+/+
IAPV	+	+	?	+/-	+/-	+/?	+/+
KBV	+	+	+	+/-	+/-	+/+	+/+
SBV	+	+	?	?/?	+/+	+/-	+/?
DWV	+	+	+	+/-	+/-	+/+	+/+
CBPV	+	*	?	*/-	+/-	+/-	+/+

Positivo (+); Negativo (-); Incerto (*); Desconhecido (?). BQCV: vírus da realeira negra; ABPV: vírus da paralisia aguda; IAPV: israelense da paralisia aguda; KBV: vírus *Kashmir*; SBV: vírus da cria ensacada; DWV: vírus deformador da asa; CBPV: vírus da paralisia crônica.

Os vírus de RNA de fita simples de senso positivo (5'-3') tem o RNA mensageiro (RNAm) traduzido pelos ribossomos e são frequentemente observados infectando abelhas melíferas (GENERSCH, 2010), tais como os vírus da ordem Picornavirales que abrange um total de seis famílias: Dicistroviridae, Iflaviridae, Marnaviridae, Polycipiviridae, Picornaviridae e Secoviridae. Os vírus das famílias Dicistroviridae e Iflaviridae estão entre os principais patógenos virais de *A. mellifera* (ICTV, 2019).

Os vírus da família Dicistroviridae são pequenos, não envelopados e capazes de se replicar no tecido nervoso, no principal órgão na cavidade abdominal (corpo gorduroso) e nas células da epiderme de insetos, dentre os quais estão às abelhas. São transmitidos horizontalmente ou de forma vertical e a infecção pode atingir abelhas em diferentes estágios de vida (VALLES *et al.*, 2004). Dentre os dicistrovirus patogênicos a abelhas estão: o vírus da realeira negra, da paralisia aguda, israelense da paralisia aguda e *Kashmir* (BAKER e SCHROEDER, 2008; BACANDRITSOS *et al.*, 2012).

Os membros da família Iflaviridae também são não envelopados e patogênicos para artrópodes, geralmente insetos. O tecido alvo onde se inicia a infecção são o cérebro, músculos, gônadas e corpo gorduroso. A transmissão ocorre horizontalmente, bem como pela via vertical com associação de ácaros pertencente ao gênero *Varroa* como hospedeiro intermediário do vírus (ICTV, 2019) (Tabela 2). Dos iflavirus que causam patologias nas abelhas está o vírus

da cria ensacada, deformador de asas e da paralisia crônica (BAKER e SCHROEDER, 2008; DE MIRANDA *et al.*, 2013).

2.7.1 Vírus da família Dicistroviridae

Vírus da realeira negra (*Black Queen Cell Virus - BQCV*)

O vírus da realeira negra pertence ao gênero *Cipavirus*, isolado pela primeira vez em larvas mortas de rainha na Austrália (LEAT *et al.*, 2000). A partir de então infecções por BQCV em *A. mellifera* é documentada na América do Norte, Europa (BACANDRITSOS *et al.*, 2012) e no Brasil nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro Oeste (PEIXOTO, 2020). Além de *A. mellifera*, também foi detectado o BQCV no Sul (CAESAR *et al.*, 2019) e Sudeste (GUIMARÃES-CESTARO, 2020) em abelhas socais sem ferrão.

Existe relatos de co-infecção do vírus com o fungo do gênero *Nosema* spp. ambos patogênicos as abelhas podendo levar a ascensão da infecção e consequente morte (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012; MENDOZA *et al.*, 2014; OĞUZ *et al.*, 2017).

As partículas virais (vírion) do BQCV são maiores, se comparadas com outros vírus da mesma família, graças à arquitetura externa da simetria do capsídeo (SPURNY *et al.*, 2017). A contaminação por BQCV é via oral-fecal e a infecção é gerada na fase de ovo até o indivíduo adulto, porém os sinais clínicos são evidentes apenas na pupa. A nomenclatura deste vírus é devido à característica particular do principal sinal clínico que é o escurecimento da cria de rainha (DE MIRANDA *et al.*, 2013).

Vírus da paralisia aguda (*Acute Bee Paralysis Virus - ABPV*)

A primeira detecção do vírus da paralisia aguda ocorreu durante estudos com o vírus da paralisia crônica em abelhas. Desde então, o vírus está amplamente distribuído, sendo recorrente na Europa e América do Sul acometendo a sanidade de cinco espécies de abelhas, dentre elas *A. mellifera* (DE MIRANDA *et al.*, 2010; RIBIÈRE *et al.*, 2010). No Brasil há relatos da ocorrência desse vírus nas cinco regiões em *A. mellifera* (PEIXOTO, 2020). E

no Sul (CAESAR *et al.*, 2019) e Sudeste (UEIRA-VIEIRA, *et al.*, 2015; GUIMARÃES-CESTARO, 2020) em abelhas sociais sem ferrão.

O ABPV pertence ao gênero *Aparavirus*, de RNA com fita simples (9.491 nucleotídeos). A transmissão do ABPV é via horizontal e vertical (BAKONYI *et al.*, 2002). Desde a década de 80 o *Varroa* tem sido associado como um vetor de transmissão do ABPV e outros vírus em abelhas na Europa, porém o ácaro é considerado apenas um transmissor, não havendo relatos da replicação do ABPV no ectoparasito (WIEGERS, 1988).

O ABPV é extremamente virulento, mesmo que os sinais clínicos nem sempre sejam aparentes, geralmente quando expressos é na abelha adulta e o tecido nervoso e glândulas hipofaríngeas são os locais alvo da infecção (BAILEY e MILNE, 1969). Os sinais clínicos são paralisia, tremores, escurecimento da cutícula e perda de pêlos no tórax e abdômen da abelha (RIBIÈRE *et al.*, 2010).

O ABPV é capaz de interagir com dois ou mais vírus que apresentam característica genética e vias de transmissão similar e que estão associados a doenças em abelhas, levando a múltiplas infecções (PORRINI *et al.*, 2017). Como exemplo, o vírus da *kashmir* (KBV) e o israelense da paralisia aguda (IAPV) podem atuar juntamente com o ABPV (FRANCIS e KRYGER, 2012). Infecções deste tipo podem agravar a sanidade da abelha, principalmente quando há presença do *V. destructor* na colônia, por reduzir a resposta imune do hospedeiro e promover maior replicação dos vírus, ocasionando em perdas de abelhas (DE MIRANDA *et al.*, 2010).

Vírus israelense da paralisia aguda (*Israeli Acute Paralysis Virus - IAPV*)

O vírus IAPV está incluso no gênero *Aparavirus* foi detectado pela primeira vez em 2004 e considerado o terceiro vírus mais comum em abelhas (DE MIRANDA *et al.*, 2010). A estrutura do vírion do IAPV possui características específicas, das quais a de maior destaque é a proteína VP1 do capsídeo por não apresentar bolsa hidrofóbica, fazendo com que antivirais que atuam impedindo a replicação viral sejam incapazes de se ligar ao capsídeo (MULLAPUDI *et al.*, 2016). O IAPV foi detectado nas cinco regiões do Brasil em

A. mellifera (PEIXOTO, 2020) e no Sul (CAESAR *et al.*, 2019) e Sudeste (GUIMARÃES-CESTARO, 2020) em abelhas sociais sem ferrão.

O IAPV infecta as abelhas desde o estágio de larva até o indivíduo adulto, incluindo rainha, zangões e operárias, no entanto a maior taxa de infecção tem sido relatada em crias de colônias fracas durante o inverno, porém assintomáticas (CHEN *et al.*, 2014). Os locais atingidos pela infecção são cérebro, glândula salivar, intestino médio, traquéia, músculo, corpo gorduroso e hemolinfa, sendo que neste último, foi detectado menor número de cópias do RNA viral (DE MIRANDA *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014).

Vírus Kashmir (*Kashmir Bee Virus - KBV*)

O vírus KBV foi detectado pela primeira vez em 1974 estando presente em diluições do vírus brilhante de *A. cerana*. Sua presença já foi registrada em países da América do Sul (RIVEROS *et al.*, 2018). É transmitido horizontal e verticalmente para crias e adultos e, em geral, as abelhas afetadas são assintomáticas (YUE *et al.*, 2006; RIBIÉRE *et al.*, 2010).

As principais consequências decorrentes da infecção por KBV nas crias é a redução da longevidade, enquanto nas abelhas adultas o mais evidente são complicações no sistema cognitivo das campeiras, comprometendo o seu forrageio (vanENGELSDORP *et al.*, 2009).

2.7.2 Vírus da família Iflaviridae

Vírus da Cria Ensacada (*Sacbrood Virus - SBV*)

O vírus SBV foi o primeiro vírus descrito como patogênico para abelhas em 1901 e cujo genoma foi completamente sequenciado (8.832 nucleotídeos) (GHOSH *et al.*, 1999). No Brasil já foi detectado no estado de São Paulo em abelhas *A. mellifera* (FREIBERG *et al.*, 2012). O SBV tem forma icosaedro com depressões rasas, fato que o torna um pouco mais esférico que outros víriões da mesma família (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2018).

O SBV pode ser transmitido via horizontal para crias e indivíduo adulto. Nas abelhas adultas a infecção é latente e, geralmente assintomática, sendo as

crias mais susceptíveis a ao SBV (MATARRITA-CARRANZA *et al.*, 2017). A larva ou pupa após ingerir alimento contaminado não completa o ciclo da metamorfose e, geralmente, morrem com coloração branca perolada ou amarelo pálido. No fluido ecdisial da cria o vírus se instala (entre o corpo gorduroso e epiderme) que, por fim, forma uma bolsa deixando a cria envolvida por uma estrutura semelhante a um saco, daí o nome: cria ensacada (GHOSH *et al.*, 1999). De acordo com Li *et al.* (2019) o SBV após algumas semanas continua infeccioso nas larvas mortas e alimento, permanecendo durante um tempo prolongado na colônia podendo infectar abelhas saudáveis.

A presença do SBV nas colônias pode está relacionada com a sazonalidade, sendo recorrente no início da primavera que, em condições naturais o número de quadro de crias é maior (TENTCHEVA *et al.*, 2004). Estudos demonstram que o ectoparasito *V. destructor* também tem participação na transferência do SBV para abelhas (SHEN *et al.*, 2005).

Vírus deformador de asas (*Deformed Wing Virus - DWV*)

A primeira detecção do vírus DWV em abelhas ocorreu no Egito em 1977 e atualmente o vírus está presente por diversos países, incluindo o Brasil (SOUZA *et al.*, 2019; PEIXOTO, 2020). O vírus apresenta a capacidade de se replicar em uma variedade de hospedeiros incluindo indivíduos das ordens Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, dentre outros (SINGH *et al.*, 2010; MARTIN e BRETTELL, 2019). Entre os hymenopteras o vírus infecta várias espécies, tais como, *A. mellifera*, *A. dorsata* (ZHANG *et al.*, 2012), *Scaptotrigona mexicana* (GUZMAN-NOVOA *et al.*, 2016), *A. cerana* (TEHEL *et al.*, 2016), *Tetragonisca fiebrigi* (ALVAREZ *et al.*, 2018), *A. florea* (AMIRI *et al.*, 2018), *Bombus* sp. (LEVIN *et al.*, 2019) e *M. subnitida* (SOUZA *et al.*, 2019; GUIMARÃES-CESTARO *et al.*, 2020).

O DWV apresenta três variantes (A, B, C), cada uma com progênises mutantes únicas. A variante do tipo C foi descoberta recentemente e as informações sobre sua patogenicidade, modo de ação, bem como a principal consequência desse tipo de infecção nas abelhas, ainda é pouco conhecido (MORDECAI *et al.*, 2016). A variante do tipo A ocorre com mais frequência nas abelhas e está entre as principais causas que levam à perda de colônias

(LANZI *et al.*, 2006; KEVILL *et al.*, 2019), enquanto a variante do tipo B tem sido considerada a mais letal, conhecida como *Virus Varroa Destructor* – 1 (NATSOPOULOU *et al.*, 2017).

A partícula viral do DWV tem forma icosaédrico, não envelopados, cujo genoma apresenta 10.140 nucleotídeos (ŠKUBNÍK *et al.*, 2017). O DWV é transmitido por via horizontal (MÖCKEL *et al.*, 2011) e vertical (AMIRI *et al.*, 2016), podendo afetar diferentes estágios de vida do hospedeiro, entretanto somente no adulto os sinais clínicos da infecção são manifestos (HIGHFIELD *et al.*, 2009). Quando a abelha apresenta sintomas como: deformidades nas asas, abdômen curto, descoloração da cutícula e anomalias no sistema cognitivo (o que dificulta a atividade de forrageio e convívio social), dentre outros, o vírus é detectado na cabeça, tórax e abdômen (YUE e GENERSCH, 2005). Já em casos de abelha assintomática há prevalência do DWV somente na cabeça (DE MIRANDA e GENERSCH, 2010).

Vírus da Paralisia Crônica (*Chronic Bee Paralysis Virus* - CBPV)

O vírus CBPV foi isolado pela primeira vez em 1963. O vírus pode ser encontrado em países de climas temperados e subtropicais em abelhas *A. mellifera* e *A. cerana* (REYNALDI *et al.*, 2010; TOPLAK *et al.*, 2012; GIACOBINO *et al.*, 2016; MOLINERI *et al.*, 2017; PEIXOTO, 2020).

A partícula viral do CBPV apresenta forma icosaédrica e sem envelope, no entanto, o genoma do CBPV não é similar à maioria dos vírus pertencentes às famílias Dicistroviridae e Iflaviridae patogênicos as abelhas (YOUSSEF *et al.*, 2015). O genoma do CBPV consiste em cinco segmentos de RNA fita simples com um total de 8.979 nucleotídeos (OLIVIER *et al.*, 2008). De acordo com Runckel *et al.* (2011) os segmentos do genoma dos vírus *Lake Sinai 1* e *Lake Sinai 2* apresentam semelhanças com o CBPV e podem pertencer a mesma classe de vírus conhecidos como mosinovírus.

O CBPV pode ser transmitido horizontalmente e se replica nos gânglios nervosos (LEE e FURCALA, 1965), induzindo sinais clínicos como tremores, dificuldade para voar e andar (rastejam-se). Para além destes, um sinal marcante deste tipo de infecção é abelhas sem pêlos, escuras e brilhantes (RIBIÉRE *et al.*, 2010).

O CBPV parasita outros hospedeiros, além da *A. mellifera* (PEIXOTO, 2020) e abelhas sociais sem ferrão (CAESAR *et al.*, 2019; GUIMARÃES-CESTARO, 2020). O vírus foi detectado em duas espécies de formigas (*Camponotus vagus* e *Formica rufa*) e no *V. destructor* (BLANCHARD *et al.*, 2008). Talvez este seja o motivo pelo qual o CBPV ocorre com grande frequência durante o verão, já que formigas e ácaros podem favorecer a propagação do vírus dentro da colônia e para colmeias vizinhas durante diferentes estações. A taxa de cópias do material genético do CBPV nas formigas e ácaros é baixa, levando ao questionamento se de fato são verdadeiros hospedeiros (ocorre replicação) ou intermediários (sem replicação do vírus) (SEITZ *et al.*, 2019).

2.8 Possíveis rotas de transmissão de patógenos de *Apis mellifera* para abelhas sociais sem ferrão (Meliponini)

A interação social das abelhas fora da colônia pode torná-las suscetíveis a ação de diversos patógenos (GENERSCH e AUBERT, 2010). Outro agravante está relacionado com a perda de habitat, em consequência das mudanças climáticas, ação antropogênica, desmatamento e queimadas (PURKISS e LACH, 2019). Estes fatores fazem com que a distribuição natural das espécies mude drasticamente e abelhas não nativas carregam consigo parasitos e patógenos para novos ambientes e hospedeiros (DUNN *et al.*, 2012). Desta forma, a realização de estudos que visem obter informações sobre a coevolução patógeno-hospedeiro, bem como as rotas de transmissão e dinâmica da patologia é fundamental para a conservação e equilíbrio da saúde das abelhas (SANTOS *et al.*, 2014; PURKISS e LACH, 2019).

A abelha *A. mellifera* é hospedeira de diversos parasitos e patógenos e, por ter ampla distribuição, torna-se um reservatório natural e passível de transmitir doenças para outros gêneros e espécies (GOULSON, 2003). Alguns patógenos são específicos de *A. mellifera*, porém, a maioria das doenças de abelhas, até o momento conhecidas, são capazes de infectar outros gêneros não *Apis* sp. (MANLEY *et al.*, 2017; GUIMARÃES-CESTARO, 2020).

Os relatos sobre a transmissão de parasitos e patógenos de *A. mellifera* para populações de abelhas sociais sem ferrão (Meliponini) têm crescido nos

últimos anos, especialmente na América do Norte, Argentina, Europa, Japão e Brasil (TEHEL *et al.*, 2016; ALGER *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2019). Uma relação desses patógenos é apresentada na (Tabela 3).

Tabela 3 Lista de patógenos de *Apis mellifera* (Apini) registrados em abelhas sociais sem ferrão (Meliponini) do Brasil

Espécies (Meliponini)	Patógenos	Referência
<i>Melipona fasciculata</i>	<i>N. ceranae</i>	Porrini <i>et al.</i> (2017)
<i>Melipona mandacaia</i>	<i>M. plutonius</i>	Teixeira <i>et al.</i> (2020)
	<i>N. ceranae</i>	Porrini <i>et al.</i> (2017)
<i>Melipona marginata</i>	<i>M. plutonius</i> e <i>Nosema ceranae</i>	Teixeira <i>et al.</i> (2020)
	<i>N. ceranae</i>	Porrini <i>et al.</i> (2017)
<i>Melipona mondury</i>	<i>M. plutonius</i> e BQCV	Teixeira <i>et al.</i> (2020)
<i>Melipona quadrifasciata</i>	<i>M. plutonius</i>	Teixeira <i>et al.</i> (2020)
	Diversos vírus das famílias Dicistroviridae, Parvoviridae e Circoviridae	Caesar <i>et al.</i> (2019)
<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	<i>N. ceranae</i>	Porrini <i>et al.</i> (2017)
<i>Melipona scutellaris</i>	ABPV	Ueira-Vieira <i>et al.</i> (2015)
<i>Melipona subnitida</i>	DWV	Souza <i>et al.</i> (2019).
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	<i>N. ceranae</i> , ABPV, DWV, BQCV, KBV e IAPV	Guimarães-Cestaro (2020)
<i>Pebleia emerina</i>	<i>Apicystis bombi</i>	Nunes-Silva <i>et al.</i> (2016)
<i>Tetragona elongata</i>	<i>N. ceranae</i> , ABPV, CBPV, DWV, BQCV, KBV e IAPV	Guimarães-Cestaro (2020)
<i>Tetragonisca angustula</i>	<i>N. ceranae</i> , ABPV, DWV, BQCV, KBV e IAPV	Guimarães-Cestaro (2020)
<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	<i>A. bombi</i>	Nunes-Silva <i>et al.</i> (2016)

Vírus israelense da paralisia aguda (IAPV), vírus da paralisia aguda (ABPV), vírus da realeira negra (BQCV), vírus da paralisia crônica (CBPV) e vírus deformador de asas (DWV).

As flores também são reservatórios naturais e atuam como vetores de fungos, bactérias e vírus para abelhas (McART *et al.*, 2014; GRAYSTOCK *et al.*, 2015; PECK *et al.*, 2016; ALGER *et al.*, 2019), em especial o néctar e pólen. Mesmo que o néctar seja hostil para alguns patógenos devido a presença de compostos antimicrobianos e antivirais (HARPER *et al.*, 2010), organismos patógenos esporulados conseguem resistir e permanecer nas flores (SASU *et al.*, 2010). Ao analisar espécies de plantas da família Orchidaceae, Jacquemyn *et al.* (2013) observaram uma diversidade microbiana

existente no néctar. Entre as bactérias encontradas estão aquelas pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp.

Em estudos sobre a sanidade das abelhas sociais sem ferrão as doenças têm apresentado baixas taxas de infecção, sendo assim as abelhas permanecem em geral assintomáticas (GUIMARÃES-CESTARO, 2020). No entanto, o conhecimento sobre a saúde das abelhas sociais sem ferrão ainda é bastante limitado, havendo apenas alguns estudos publicados com essa abordagem (PURKISS e LACH, 2019).

Neste sentido, a realização de estudos que envolvem a sanidade meliponícola do Brasil é relevante, uma vez que há relatos de perdas de abelhas sociais sem ferrão no país (UEIRA-VIEIRA *et al.*, 2015), bem como a transmissão de patógenos de *A. mellifera* para espécies sociais sem ferrão (PECK *et al.*, 2016; PURKISS e LACH, 2019). Por este motivo mais pesquisas são necessárias, pois podem auxiliar na elaboração de medidas mitigadoras, na tentativa de reduzir as perdas ocasionadas por doenças, já que a meliponicultura é uma atividade sustentável e promissora (PIRES *et al.*, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área de estudo

O estudo foi desenvolvido na área experimental do Núcleo de Estudo dos Insetos (INSECTA) do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), campus de Cruz das Almas - BA ("12° 40' 39" S / 39° 06' 23" W, altitude 220 m). O município apresenta clima sub-úmido, sendo os meses de março a junho correspondente ao período chuvoso e de outubro a janeiro os mais secos. Apresenta temperatura média anual de 24,3° C (máx.: 29° C e mín.: 20,6°C), com precipitação pluviométrica média anual de 1.206 mm (máx.: 1.300 mm e mín.: 1.000 mm) e umidade relativa do ar com média anual de 81% (SILVA *et al.*, 2016).

3.2 Coleta das amostras

Foram avaliados um total de 80 amostras de abelhas provenientes de 40 colônias localizadas em apiário e meliponário no município de Cruz das Almas-BA durante dois períodos distintos: seco (outubro/dezembro/2018) e chuvoso (maio/julho/2019). A coleta no período seco foi composta por amostras de oito espécies de abelhas: *Apis mellifera* (n = 6) alojadas em caixas modelo Langstroth, *Melipona scutellaris* (n = 6), *M. quadrifasciata* (n = 6), *Nannotrigona testaceicornis* (n = 6), *Tetragonisca angustula* (n = 6) e *Scaptotrigona xanthotricha* (n = 6) todas instaladas em caixas modelo padrão (INPA), *Partamona helleri* (n = 2) e *Trigona spinipes* (n = 2) em ninhos naturais. No período chuvoso foram realizadas coletas nas mesmas colônias selecionadas anteriormente para o período seco. Cada colônia/ninho representa uma amostra. Para *Partamona helleri* e *T. spinipes* foram avaliados dois ninhos de cada espécie, devido à dificuldade em encontrar ninhos no entorno do apiário e meliponário.

Em cada colônia de *A. mellifera* avaliada foram coletadas aproximadamente cerca de 300 abelhas (DE MIRANDA *et al.*, 2013), enquanto nas colônias de abelha sem ferrão foram coletadas 90 abelhas campeiras de cada espécie (o número total de indivíduos coletados foi definido de acordo com o número de abelhas que seriam utilizadas para as análises descritas no item abaixo). As entradas de cada colônia das espécies de abelhas sem ferrão foram temporariamente fechadas utilizando rede entomológica para garantir a coleta de campeiras.

Durante o estudo foi observado que essas mesmas espécies de abelhas compartilhavam a flor de *Antigonon leptopus* L., espécie da família Polygonaceae, conhecida na região do Recôncavo Baiano como mimo-do-céu. Neste sentido, para avaliar a possível rota de transmissão de patógenos entre espécimes que forrageavam nas mesmas fontes de recurso floral foram coletados 15 indivíduos de cada espécie durante a visita nas flores em cada período (seco e chuvoso).

Imediatamente após a coleta, as abelhas foram imersas em álcool isopropílico (70%) e mantidas em ultrafreezer -80 °C. Os dados meteorológicos (temperatura, umidade e precipitação pluviométrica) foram coletados pela

plataforma do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2019). Todas as espécies de abelhas foram coletadas sob a licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) n°70465-1.

3.3 Avaliação dos Ácaros

Acarapis woodi

Um total de 30 abelhas *A. mellifera* por amostra teve a cabeça separada do tórax com auxílio de pinças sob microscópio estereoscópico Olympus (modelo P20, Massachusetts, EUA) com aumento de 2,5x. Posteriormente o entorno do episterno do tórax foi removido para exposição das tráqueias e observação dos tubos traqueais principais sob microscópio estereoscópico com aumento de 5x (foi observado dois tubos traqueais por abelha, totalizando 720 traquéias analisadas). A presença do ácaro é observada pela presença de pontos escurecidos na traquéia. Traqueias hialinas e transparentes sugerem a ausência do ácaro (SAMMATARO *et al.*, 2013). A avaliação do *A. woodi* por esse procedimento foi apenas para *A. mellifera* devido à dificuldade de visualização das tráqueias nas espécies de abelhas sociais sem ferrão, em razão do reduzido tamanho corporal. De forma complementar, esse ácaro também foi avaliado por meio da análise molecular descrita no item específico abaixo.

Leptus spp.

A detecção das larvas do *Leptus spp.* foi realizada por meio da limpeza das abelhas individualmente, já que o ácaro normalmente permanece aderido ao corpo da abelha ou no recipiente que contém a amostra (MARTIN e CORREIA-OLIVEIRA 2016). As abelhas com *Leptus spp.* foram acondicionadas em recipientes devidamente identificados e armazenadas em freezer a -80° C. O número total de ácaros foi transformado em porcentagem em relação ao número de abelhas analisadas por amostra. Esse método foi aplicado para *A. mellifera* e as espécies sociais sem ferrão.

Varroa destructor

A presença de *V. destructor* foi avaliada em *A. mellifera* e nas espécies sociais sem ferrão. As amostras de cada espécie foram transferidas separadamente para um contêiner de separação entre sólido e líquido, com malha de 3mm aclopado a outro contêiner para captação dos ácaros. Em seguida a amostra foi lavada para facilitar o desprendimento do ácaro das abelhas. Posterior à lavagem da amostra foi feita a quantificação dos ácaros desprendidos, para certificar que não havia nenhum ácaro aderido às abelhas. Foi feita uma triagem adicional, para isso todas as abelhas foram analisadas individualmente para verificar a aderência do ácaro no corpo da abelha (DIETEMANN *et al.*, 2013). Após a quantificação as abelhas foram armazenadas novamente em ultrafreezer -80°C para serem utilizadas nas análises de outros parasitas e patógenos.

O nível de infestação pelo ácaro foi obtido por meio da equação: $NI = A / B \times 100$, onde: NI = Nível de infestação; A = Número de ácaros encontrados na amostra; e B = Número total de abelhas contadas (DE MIRANDA *et al.*, 2013). Os dados de infestação por *V. destructor* entre os períodos das coletas foram avaliados pelo teste U de Mann-Whitney.

3.4 Avaliação do Fungo *Nosema* spp.

A presença do microsporídeo *Nosema* spp. foi avaliada em *A. mellifera* e nas espécies sociais sem ferrão. Foi separado um *pool* com 30 abelhas de cada espécie. Cada abelha teve o abdômen removido com o auxílio de pinças estéreis que, posteriormente foram macerados em cadinho de porcelana com o auxílio de pistilo, sendo em seguida acrescido 1 mL de água destilada por abelha (totalizando 30 mL em cada amostra) e homogeneizado. Sob a lâmina da câmara de Neubauer foi adicionado 1µL da mistura, após dois minutos em repouso foi realizada a contagem dos esporos no microscópio óptico com aumento de 40x (Microscópio estereoscópico Olympus, modelo P20, Massachusetts, EUA). Foi realizado um total de três leituras por amostra. A contagem dos esporos foi feita com base em cinco campos distintos e ao final da contagem foi feita uma média que compreende a soma das três leituras de

cada amostra (FRIES *et al.*, 2013; HUMAN *et al.*, 2013). Os resultados obtidos foram submetidos à equação descrita por Human *et al.* (2013) para determinar o nível de infecção: $(NE \times FD) / (AC \times P)$, onde: NE = Número de esporos contados; FD = Fator de diluição (se houver); AC = Áreas contadas (mm²); e P = Profundidade (mm) da câmara de Neubauer.

3.5 Análise molecular

Maceração e preparo das amostras

As amostras de *A. mellifera* e das espécies sociais sem ferrão foram maceradas e submetidas à análise molecular para verificar a presença ou ausência das bactérias *M. plutonius* e *P. larvae*, dos fungos *N. apis*, *N. ceranae* e *A. apis* e do ácaro *A. woodi* por meio da PCR. Foi também avaliado a presença de sete espécies de vírus: ABPV, IAPV, CBPV, BQCV, DWV, SBV e KBV por meio de RT-PCR.

Por amostra um *pool* de 30 abelhas de cada espécie foi utilizado para preparação do macerado. Cada abelha teve a cabeça removida e excluída para evitar contaminação pelos pigmentos ocelares e consequente interferência na reação de polimerase (BONCRISTIANI *et al.*, 2011). O restante do corpo (tórax e abdômen) foi macerado em cadinho com auxílio de pistilo (estéreis) adicionando-se nitrogênio líquido (pulverizar a amostra). O macerado foi armazenado em ultrafreezer -80 °C até o momento da extração do DNA e RNA. As 15 abelhas de cada espécie coletadas nas flores de *A. leptopus* também foram maceradas e em seguida armazenadas em ultrafreezer -80 °C.

Extração do DNA

Aproximadamente, 100 mg do macerado dos espécimes coletados na entrada da colônia foi pesado em crio tubo de 1,5 ml utilizando 1 mL do DNAzol (Invitrogen Carlsbad, California, US), 1 µL da proteinase K solution (Invitrogen, Carlsbad, California, US) e mantido em repouso a 37 °C por 18h para que ocorresse a lise celular. Após este tempo foi acrescido a amostra 2,5 µL de RNase A (Invitrogen, Carlsbad, California, US) para redução de contaminação por mRNA. Posteriormente, foram realizadas lavagens com clorofórmio, álcool

absoluto gelado, DNazol (2:1) e álcool isopropílico 75%. Ao final da extração foram adicionados 50 µL de água ultrapura tipo Milli-Q em cada amostra. Posteriormente o DNA foi quantificado em BioPhotometer D30 (Eppendorf, Hamburg, DE) com valores de $A_{260/280\text{nm}}$, variando entre 1,6 a 1,9 mm e diluído com água ultrapura para a concentração final de 20 – 25 ng / µL de DNA.

Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A PCR foi utilizada para detectar a presença das bactérias (*P. larvae* e *M. plutonius*), dos fungos (*N. apis*, *N. ceranae* e *A. apis*) e do ácaro (*A. woodi*). A PCR foi realizada em termociclador modelo Veriti 96-Well ThermalCycler, 0.2mL, Applied Biosystems utilizado, utilizando o kit PCR Supermix Brasil (Invitrogen Carlsbad, California, US), de acordo com o protocolo do fabricante (adaptado), com *primers* específicos (Tabela 4) de acordo com a programação específica para cada patógeno (Tabela 5).

Tabela 4 Lista de *primers* específicos utilizados na PCR para a detecção de ácaros, fungos e bactérias em abelhas sociais

Iniciador	Sequência	PB	Espécie
Foward	5'-AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC-3'	973	PL ¹
Reverse	3'-TCTATCTCAAACCGGTCAGAGG-5'		
Foward	5'-GTTAAAAGGCGCTTTTCGGGT-3'	281	MP ¹
Reverse	3'-GAGGAAAACAGTTACTCTTTCCCCTA-5'		
Foward	5'-TGTGTCTGTGCGGCTAGGTG-3'	136	AA ¹
Reverse	3'-GCTAGCCAGGGGGGAACTAA-5'		
Foward	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218	NC ²
Reverse	3'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG-5'		
Foward	5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'	321	NA ²
Reverse	3'GGGGGGCGTTTTAAAATGTGAAACAACACTAG-5'		
Foward	5'-AAGATATTGGAACATTATATTTTATTTT-3'	677	AW ³
Reverse	3'-CAAAAATCAGAATAAATGTTGAAATA-5'		

Primer = iniciadores, PB: pares de base, referência dos iniciadores: ¹GARRIDO-BAILÓN *et al.*, 2013, ²GOVAN *et al.*, 1999; ³KOJIMA *et al.*, 2011. PL = *Paenibacillus larvae*, MP = *Melissococcus plutonius*, AA = *Ascospaera apis*, NC = *Nosema ceranae*, NA = *Nosema apis* e AW = *Acarapis woodi*.

Tabela 5 Temperaturas e ciclos programados no termociclador para detectar ácaros, fungos e bactérias em abelhas sociais

Ciclos	Temperaturas e tempos da PCR por microrganismo				
	<i>Nosema</i> spp ¹	<i>P. larvae</i>	<i>M. plutonius</i>	<i>A. apis</i>	<i>A. woodi</i>
Desnaturação inicial (1x)	94°C por 02 min	94°C por 01 min	94°C por 02 min	94°C por 02 min	94 °C por 2 min
Desnaturação (35x)	94°C por 30 seg	93°C por 30 seg			94 °C por 15 seg
Anelamento (35x)	61°C por 30 seg	57°C por 30 seg			55 °C por 30 seg
Extensão (35x)	72°C por 30 seg	72°C por 30 seg			72 °C por 60 min

M. plutonius = *Melissococcus plutonius*, *P. larvae* = *Paenibacillus larvae*, *A. apis* = *Ascosphaera apis*, *A. woodi* = *Acarapis woodi*. ¹O processo, tempo e temperatura são idênticos para ambas as espécies (*Nosema apis* e *Nosema ceranae*).

Ao final da reação em PCR, 10µL do produto de cada amostra foram corados com SYBR SAFE DNA (Cellco) e carregados em eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE (base Tris 89 mM, 89 Mm de ácido bórico e 2M de EDTA), por 60 minutos com a seguinte programação: 100 volts; Unidade de corrente: 66 ampères; e Unidade de potência: 0,06 watt. O produto da PCR foi visualizado em transiluminador UV gel (LTB HE, Loccus, Cotia, São Paulo, BR) e fotodocumentador L-PIX (Loccus, Cotia, 17 São Paulo, BR). O controle positivo foi com amostras positivas para cada patógeno avaliado no laboratório de biologia molecular do Núcleo de Estudo dos Insetos (INSECTA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) provenientes de um estudo anterior (MESCÊS, 2018). O controle negativo com água ultrapura tipo Milli-Q.

Extração de RNA

A extração do RNA foi feita nas amostras coletadas na entrada das colônias e as coletadas nas flores. Aproximadamente 100 mg de cada macerado foi pesado em criotudo de 1,5 mL para extração do RNA utilizando 1 mL do RNazol (Invitrogen Carlsbad, California, US), seguindo as instruções do fabricante (adaptado). O homogeneizado permaneceu em descanso por 30 minutos e posteriormente foi adicionado água ultrapura tipo Milli-Q, em seguida

o RNA foi lavado com álcool isopropílico absoluto gelado e álcool etílico a 75%. Posteriormente o RNA foi quantificado em BioPhotometer D30 (Eppendorf, Hamburg, DE) com valores de $A_{260/280\text{nm}}$, variando entre 1,7 a 2.0 mm.

Purificação do RNA

A purificação do RNA foi feita utilizando o Kit DNA free (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante, onde foram adicionados 5 μL de DNase Buffer e 1 μL de RNase Inactivation a 39 μL do RNA anteriormente extraído, sendo a amostra homogeneizada em seguida e permanecendo em repouso por 30 minutos a 37° C. Posteriormente, foi acrescentado 5 μL de reagente inibidor de DNase à amostra. Por fim, a amostra foi centrifugada a 9.000 rpm. O RNA foi quantificado e diluído com água ultrapura a concentração final de 25-30 ng/ μL .

Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase- RT-PCR

A RT-PCR foi empregada para a síntese de DNA de sete espécies de vírus utilizado uma mistura de SuperScript® III Reverse Transcriptase e Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen), RNase Inactivation (Invitrogen) e 2 μL do RNA extraído (25-30 ng/ μl). A reação foi em termociclador de acordo com o protocolo do fabricante (adaptado), com *primers* específicos (Tabela 6) e programação ajustada (Tabela 7).

O *primer* R do vírus ABPV codifica para o gene de uma sequência específica da poliproteína do capsídeo; o IAPV para uma poliproteína estrutural; o DWV para sequências conservadas de proteínas do capsídeo (VP2-VP1); o SBV para uma região conservada de poliproteína de SBV; o CBPV para à região conservada de RNA polimerase dependente de RNA e o BQCV para um gene de poliproteína de capsídeo parcial de BQCV (SGUAZZA *et al.*, 2013).

Ao final da RT-PCR, 10 μL do produto de cada amostra foram corados com SYBR SAFE DNA e carregados em eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE. O produto da RT-PCR foi visualizado em transiluminador e fotodocumentador. O controle positivo foi com amostras positivas para cada um

dos vírus avaliados no INSECTA na UFRB provenientes de um estudo anterior (PEIXOTO, 2020). O controle negativo com água ultrapura tipo Milli-Q.

Tabela 6 Lista de *primers* específicos utilizados na RT-PCR para a detecção de vírus em abelhas sociais

Iniciador	Sequência	PB	Vírus
Foward	5'-GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA-3'	158	IAPV ¹
Reverse	3'-GGGAGTATTGCTTTCTTGTGTTGTG-5'		
Foward	5'-GGTGCCCTATTTAGGGTGAGGA-3'	460	ABPV ¹
Reverse	3'- ACTACAGAAGGCAATGTCCAAGA-5'		
Foward	5'- CTTTATCGAGGAGGAGTTTCGAGT-3'	536	BQCV ¹
Reverse	3'-GCAATAGATAAAGTGAGCCCTCC-5'		
Foward	5'-AACCTGCCTCAACACAGGCAAC-3'		
Reverse	3'- ACATCTCTTCTTCGGTGTTCAGCC-5'	774	CBPV ¹
Foward	5'-CGTAATTGCGGAGTGGAAAGATT-3'	342	SBV ¹
Reverse	3'-AGATTCCTTCGAGGGTACCTCATC-5'		
Foward	5'-TAGTGCTGGTTTTCTTTGTC-3'	150	DWV ²
Reverse	3'-CTGTGTCGTTGATAATTGAATCTC-5'		
Foward	5'-GATGAACGTCGACCTATTGA-3'	415	KBV ³
Reverse	3'-TGTGGGTTGGCTATGAGTCA-5'		

Primer: iniciadores, PB: pares de base, referências dos iniciadores: ¹SGUAZZA *et al.* (2013), ²HIGHFIELD *et al.* (2009), ³STOLTZ *et al.* (1995). Vírus: israelense da paralisia aguda (IAPV), paralisia aguda (ABPV), realeira negra (BQCV), paralisia crônica (CBPV), cria ensacada (SBV), deformador de asas (DWV), *Kashmir* (KBV).

Tabela 7 Temperaturas e ciclos programados no termociclador para detectar vírus patogênicos em abelhas sociais

Ciclos	Temperaturas e tempos da PCR por microrganismo			
	DWV	KBV	IAPV, ABPV, CBPV e BQCV	SBV
Síntese de cDNA (1 x)	49 °C 30 min	49 °C 30 min	46 °C 30 min	46 °C 30 min
Desnaturação inicial (1x)	94 °C 02 min	94 °C 02 min	94 °C 02 min	94 °C 02 min
Desnaturação (35x)	94 °C 15 seg	94 °C 15 seg	94 °C 15 seg	94 °C 15 seg
Anelamento (35x)	55 °C 30 min	55 °C 30 min	58 °C 30 min	58 °C 30 min
Extensão (35x)	68 °C 01 min	68 °C 01 min	68 °C 01 min	68 °C 01 min

Vírus: deformador de asas (DWV), *Kashmir* (KBV), israelense da paralisia aguda (IAPV), paralisia aguda (ABPV), paralisia crônica (CBPV), realeira negra (BQCV), cria ensacada (SBV).

Sequenciamento

Os resultados positivos para os vírus ABPV e IAPV foram confirmados pelo sequenciamento de DNA Sanger (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) (código de submissão ABPV - MW598489 e IAPV - MW598490). O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTgene Análises Moleculares Ltda. O DNA foi purificado com o reagente ExoSAP seguindo o protocolo do fabricante. Após o sequenciamento os cromatogramas foram lidos usando o software Chromas 2.6.6 (Technelysium, South Brisbane, QLD, AU) e a similaridade da sequência de DNA com cada vírus foi realizada usando a ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST) do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ácaros

Os resultados para o ácaro traqueal foram negativos, tanto no método de dissecação das traquéias, quanto na análise molecular das abelhas *A. mellifera*. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Peixoto (2020), onde a presença do ácaro foi avaliada em colônias de abelhas africanizadas provenientes de apiários localizados em quinze estados brasileiros. De acordo com essa mesma autora, *A. woodi* não foi detectado nas colônias de *A. mellifera* no Brasil provavelmente por não estar adaptado a áreas que apresentem climas tropicais. Colônias presentes em países de climas secos e frios são propensas à infestação por *A. woodi* (OTIS e SCOTT-DUPREE, 1992; PIRK *et al.*, 2016) uma vez que, na colônia durante os períodos mais frios as operárias campeiras tendem a permanecer mais tempo dentro da colônia e agrupar-se com as demais abelhas, sendo está uma condição oportuna para o estabelecimento e propagação do *A. woodi*.

Para o ácaro ectoparasito *Leptus* spp. foi observado larvas em 15% das amostras avaliadas durante o período chuvoso, não sendo encontradas nas amostras do período seco. O ácaro foi encontrado apenas nas espécies *M. scutellaris* e *M. quadrisfasciata anthidioides* (Meliponini). Para a espécie *M. scutellaris* o índice de infestação pelo ácaro variou de 1,7% a 2,5%, com média

geral de 2,2%, enquanto para *M. quadrisfasciata anthidioides* foi confirmada em uma única colônia, que apresentou índice de infestação igual a 1,7%. Em ambas as espécies, as larvas do ácaro foram encontradas aderidas ao tórax das abelhas.

Este é o primeiro trabalho que detecta a presença de larvas de *Leptus* spp. nestas espécies de Meliponini no Recôncavo da Bahia. Apesar de o ácaro ter sido encontrado em poucas amostras, sua presença se apresenta como uma ameaça à colônia, pois é vetor da bactéria *Spiroplasma apis* (DIBLASI *et al.*, 2011) podendo levar a perda de colônia (SCHWARZ *et al.*, 2014). Embora não tenha sido encontradas larvas do ácaro nas amostras de *A. mellifera* avaliadas neste trabalho, o *Leptus* spp. já foi detectado nesta espécie no Recôncavo da Bahia, com baixos níveis de infestação (0,15% e 3,6% (MERCÊS, 2018), se comparado a outros estudos (MARTIN e CORREIA-OLIVEIRA, 2016).

Há uma limitação de estudos sobre a presença de *Leptus* spp. nas abelhas, sobretudo no Recôncavo Baiano onde a criação de abelhas vem crescendo devido ao potencial de exploração destes insetos na agricultura. Por este motivo, levantamentos são relevantes, pois demonstram a evidência do compartilhamento de ectoparasitos de *A. mellifera* para meliponíneos (MARTIN e CORREIA-OLIVEIRA, 2016; SALVATIERRA e ALMEIDA, 2017).

Estudos mais detalhados ainda são necessários para compreender o tipo de relação do *Leptus* spp. com as abelhas, assim como o real impacto nas colônias. Este ácaro apresenta hábito generalista e parasita outros grupos de artrópodes, o que levaria a sua maior propagação no ambiente, podendo afetar abelhas alojadas em colônias vizinhas e promover perdas de abelhas (TEIXEIRA, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2014; SALVATIERRA e ALMEIDA, 2017).

Varroa destructor não foi encontrado nas amostras de Meliponini, entretanto foi detectado em todas as amostras de *A. mellifera*. Os níveis de infestação variaram de 0,9 a 9,1%, apresentando média geral (entre os dois períodos) igual a 4,3%. No período chuvoso houve maior infestação do *V. destructor* (PC= 4,9%), quando comparado com o período seco (PS = 3,7%). No entanto, não houve diferença estatística significativa.

Apesar da infestação por *V. destructor* ser baixa, em comparação com outros estudos (PEGORARO *et al.*, 2013), especial atenção deve ser dada às

colônias que apresentam o parasito pois é vetor de vírus patogênicos associados à perda de colônias (DE MIRANDA *et al.*, 2013).

Os sinais clínicos da varrotose não foram observados nas colônias de *A. mellifera*. Possivelmente isso se deve ao nível de infestação baixo nos dois períodos, quando comparado com a média de outros estudos (MORTENSEN *et al.*, 2016). De acordo com Frey *et al.* (2011), perdas de abelhas podem ocorrer quando os níveis de infestação do *Varroa* forem superiores a 10%, como ocorre nos casos relatados no Sudeste do Brasil, onde os índices ultrapassam o valor limiar (12,44%) (TURCATTO *et al.*, 2012), assim como na região Sul (14,40%) (PEGORARO *et al.*, 2013). Na região Nordeste, os resultados encontrados por Castagnino *et al.* (2016) (4,19%), (Mercês (2018) (4,8%) e Peixoto (2020) (3,8%) assemelha-se com este estudo, apresentando níveis baixos de infestação.

A infestação por *V. destructor* pode variar a depender da raça de *A. mellifera* (ROSENKRANZ *et al.*, 2010), dinâmica da reprodução e mortalidade do ácaro, comportamento higiênico da colônia e fatores ambientais (PINTO *et al.*, 2012). Por esta razão, as áreas de ocorrência do *V. destructor* devem ser vistoriadas constantemente para que, juntamente com o manejo adequado das colônias, possa reduzir ou manter os níveis de infestação abaixo de 10%, uma vez que esse ácaro é considerado uma ameaça para apicultura, tanto pelos danos causados pelo parasitismo, como por ser vetor de vírus.

4.2 Fungos

Não foi observada a presença dos fungos *A. apis* e *Nosema* spp. nas amostras de *A. mellifera* e nas espécies sociais sem ferrão avaliados nos dois períodos.

De acordo com Teixeira *et al.* (2018), o fungo *A. apis* e outros microrganismos estão presentes em apiários brasileiros, mas aparentemente sem causar grandes perdas. O *A. apis* também não foi detectado em *A. mellifera* no Recôncavo Baiano em 2018 (MERCÊS, 2018), assim como em abelhas sem ferrão durante uma avaliação no Nordeste brasileiro (TEIXEIRA *et al.*, 2020). Díaz *et al.* (2017) também não detectou a presença das espécies do *Nosema* spp. por meio da técnica de PCR em meliponíneos.

O comportamento higiênico das abelhas é o principal mecanismo de defesa contra patógenos, as abelhas faxineiras podem ter eliminado os esporos dos fungos por meio do *auto-grooming* removendo-os do próprio corpo ou por *allo-grooming* retirando os esporos do corpo de outras abelhas na colônia (DE JESUS *et al.*, 2017; SÁ e SOUSA, 2019).

A propólis e a geoprópolis também é utilizada por *A. mellifera* e meliponíneos, respectivamente, como produtos alternativos para o controle fúngico, agindo como uma barreira protetora nas colônias (SUWANNAPONG *et al.*, 2011). A atividade antimicrobiana destes produtos é devido à variedade de compostos químicos presentes nas resinas de diversas espécies de plantas em diferentes regiões. Tanto *A. mellifera*, quanto às espécies de meliponíneos são capazes de identificar e dar preferência às plantas cuja composição da resina possa beneficiá-las na defesa contra patógenos (DRESCHER *et al.*, 2014; WILSON *et al.*, 2017).

4.3 Bactérias

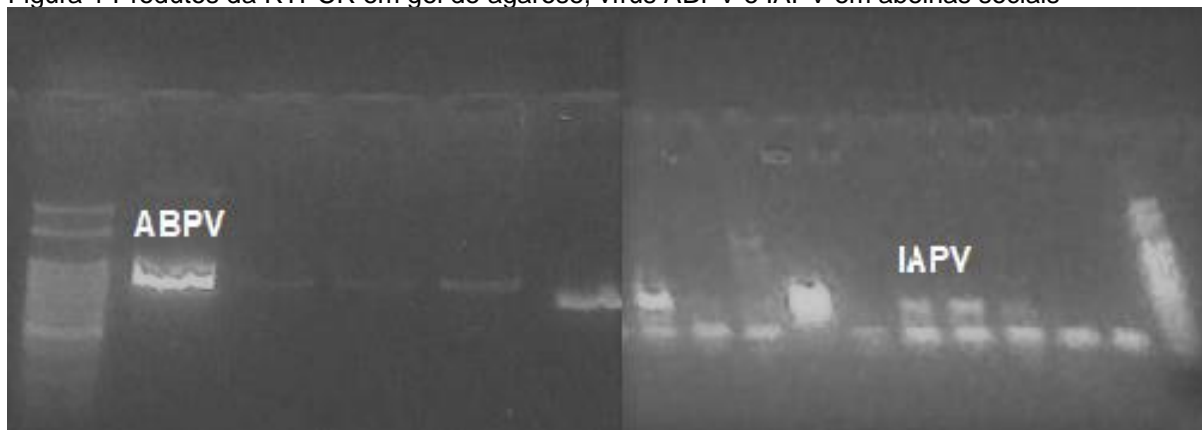
Não foi detectada a presença das bactérias *P. larvae* e *M. plutonius* para todas as espécies de abelhas avaliadas durante os dois períodos (seco e chuvoso). No Sudeste do Brasil, Teixeira *et al.* (2020) também não detectou *P. larvae* em *Melipona* spp. A ausência dessas bactérias nas amostras pode estar relacionada com diversos fatores externos e internos às colônias, como o uso de produtos da colônia (própolis, geoprópolis) que agem inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (WILSON *et al.*, 2015). Bem como o comportamento higiênico, o qual remove os esporos de microrganismos das abelhas e da colônia e acaba por impedir a contaminação das abelhas saudáveis (SÁ e SOUSA, 2019).

A associação mutualista entre a abelha com a sua microbiota é mais um dos mecanismos naturais de autodefesa e inibi o crescimento do *P. larvae* e *M. plutonius*, principais bactérias patogênicas (VAN ARNAM *et al.*, 2018; MELO *et al.*, 2019). São as bactérias lácticas presentes no lúmen do intestino das abelhas que impedem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (PROMNUAN *et al.*, 2009).

4.4 Vírus

Nas amostras coletadas na colônia durante os períodos avaliados (seco e chuvoso) trinta e oito foram positivas para dois vírus. O ABPV apresentou maior frequência (92,1%), seguido do IAPV (15,8%). Os vírus DWV, KBV, SBV, CBPV e BQCV não foram detectados em nenhuma das amostras avaliadas de cada espécie em estudo (Figura 1).

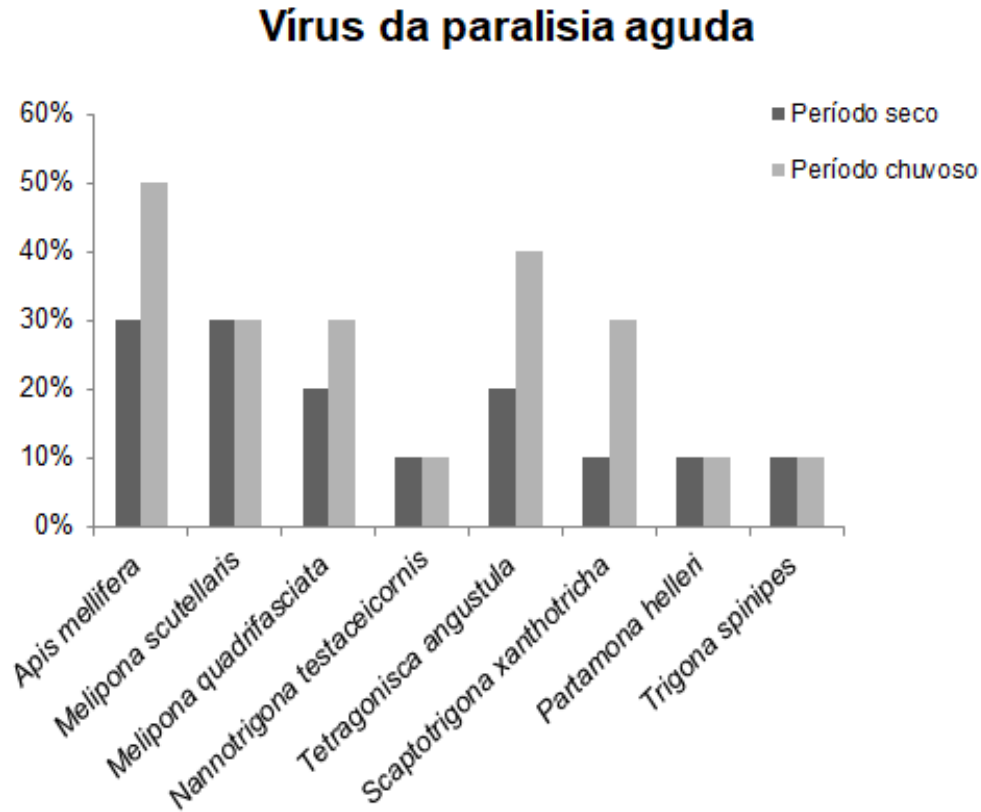
Figura 1 Produtos da RTPCR em gel de agarose, vírus ABPV e IAPV em abelhas sociais



Vírus da paralisia aguda ABPV (460 pb) e vírus israelense da paralisia aguda IAPV (158 pb). pb: pares de base.

Para a frequência dos vírus nas abelhas em cada período (amostras coletadas na entrada da colônia), o ABPV apresentou maior prevalência, estando presente em pelo menos uma amostra de todas as espécies de abelhas (Figura 2). Já o vírus IAPV esteve presente em amostras de *A. mellifera* durante o período seco e em *M. quadrifasciata* e *T. angustula* durante o período chuvoso.

Figura 2 Frequência do vírus da paralisia aguda (ABPV) em diferentes espécies de abelhas durante o período seco e chuvoso



Este é o primeiro estudo que tem como resultados a presença do vírus ABPV recorrentes em *A. mellifera* em sete espécies de abelhas sociais sem ferrão e do IAPV em duas espécies no Recôncavo baiano. A presença destes vírus nos meliponíneos apoia a hipótese que *A. mellifera* compartilha os mesmos patógenos virais com Melipinini. A análise dos resultados sugere que, independente da espécie, houve predominância dos vírus durante o período chuvoso. No entanto, a diferença estatística entre os dois períodos (seco/chuvoso) não foi significativa, tanto nas amostras coletadas na colônia, quanto nos exemplares coletados diretamente nas flores, de acordo com o teste do qui-quadrado ($p = 0,088$).

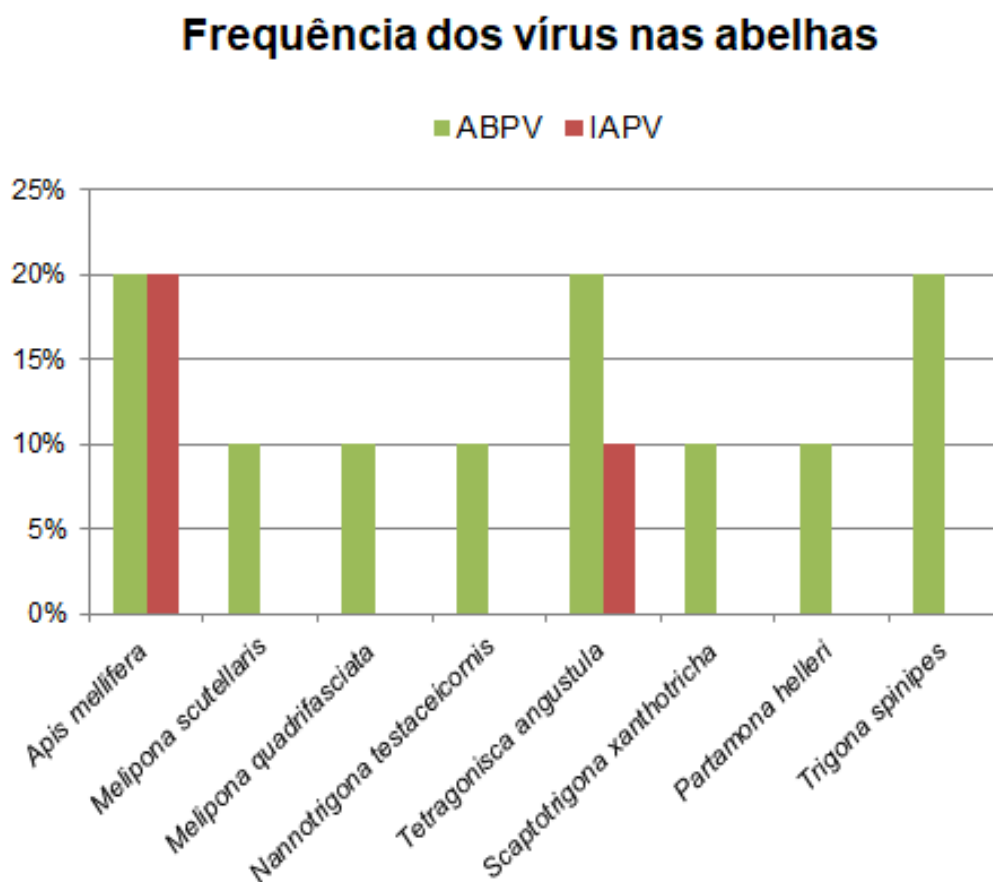
A ocorrência dos vírus nas abelhas pode não está associado à variação sazonal da região durante os períodos avaliados, portanto, os vírus podem está presentes nas abelhas em diferentes estações do ano. Assim como, os

resultados também demonstram que o vírus ABPV pode está presente nas abelhas independentemente da espécie, ou seja, tanto *A. mellifera* como as abelhas sem ferrão podem carregar este vírus, provavelmente pela falta de um número frequente de casos nas variáveis (espécies / diferentes locais / períodos).

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com os resultados encontrados por Peixoto (2020), onde foi detectada a presença das mesmas espécies viróticas (ABPV e IAPV) em *A. mellifera* no município de Cruz das Almas no estado da Bahia. O ácaro *V. destructor* pode agir como um vetor e transmitir ABPV e IAPV para *A. mellifera*, uma vez que o ectoparasito foi encontrado em todas as amostras desta espécie, tanto no período seco, como no chuvoso. Segundo Yang e Cox-Foster (2007) não há replicação do ABPV no ácaro, no entanto a transmissão do vírus para as abelhas implica diretamente no processo infeccioso e a principal consequência é o enfraquecimento da abelha, implicações no sistema imunológico e aumento da replicação da partícula viral, o que levaria a morte da abelha.

Para as amostras coletadas nas flores de *A. leptopus* dez amostras foram positivas. O vírus ABPV esteve presente em todas as amostras positivas em diferentes espécies, seguido do IAPV (30%) na espécie *A. mellifera* e *T. angustula* (Figura 3). Os vírus DWV, KBV, SBV, CBPV e BQCV não foram detectados nestas amostras.

Figura 3. Frequência dos vírus nas amostras de oito espécies de abelhas sociais coletadas nas flores de *Antigonon leptopus* L.



A interação entre plantas e polinizadores faz com que as flores sejam consideradas um reservatório natural de microrganismos. Flores visitadas por diversas abelhas, como as de *A. leptopus* (Polygonaceae), podem ter promovido um ambiente propício para o transbordamento de patógenos virais da *A. mellifera* para as abelhas sociais sem ferrão. Uma vez que foi detectado o vírus ABPV em *A. mellifera* e nas operárias de *M. quadrifasciata*, *M. scutellaris*, *N. testaceicornis*, *P. helleri*, *S. xanthotricha*, *T. angustula* e *Trigona spinipes*, bem como o IAPV em *A. mellifera* e *T. angustula* coletadas diretamente durante a visita nas flores de *A. leptopus*, portanto pode ser um indicativo e deve ser avaliado. Os resultados obtidos neste trabalho se somam a outros estudos que demonstram a prevalência dos vírus de *A. mellifera* em abelhas sociais sem ferrão (UEIRA-VIERIA *et al.*, 2015; TEHEL *et al.*, 2016; GUIMARÃES-CESTARO, 2020). Bem como a possível rota de transmissão

horizontal de patógenos através das flores (TEHEL *et al.*, 2016; PURKISS e LACH, 2019).

Os vírus podem estar presente de forma isolada ou ser detectados em associação com um ou mais vírus nas amostras. Neste estudo, durante a avaliação das amostras (coletadas na colônia e nas flores) foi observado que o ABPV esteve presente de forma isolada na maioria das amostras (84,2%), seguido do IAPV (7,9%), enquanto a associação dupla (ABPV e IAPV) ocorreu em 7,9% das amostras.

Os vírus, cuja sequência genômica e o modo de transmissão são similares, podem formar um complexo viral e interagir entre si e levar a múltiplas infecções (EVANS, 2001; DE MIRANDA *et al.*, 2010). Os vírus ABPV, IAPV pertencem à mesma família viral (Dicistroviridae) e, neste estudo, foi observado que as abelhas carregam estes vírus em associação, no entanto, não se sabe a carga viral de cada um dos vírus nas abelhas.

Estudos sobre a saúde das abelhas vêm crescendo nos últimos dez anos, mas especialmente no estado da Bahia, a sanidade apícola e meliponícola ainda são pouco exploradas. Portanto, ainda não se conhece o real impacto das infecções promovidas por vírus e, principalmente o impacto das associações entre os vírus, uma vez que pode levar a perdas de abelhas, como acontece em outros países (PORRINI *et al.*, 2017). Neste sentido, mais estudos necessitam ser feitos por se tratar de importantes polinizadores, os quais são susceptíveis a diferentes patógenos virais. Nesta perspectiva, este estudo fornece subsídios que auxiliam no diagnóstico da saúde das abelhas, em especial as sem ferrão.

5 CONCLUSÕES

Parasitos e patógenos recorrentes em *A. mellifera* estão presentes em espécies de abelhas sociais sem ferrão na região do Recôncavo Baiano. Este é o primeiro registro da presença do ectoparasito *Leptus* spp. em *Melipona quadrifascita anthidioides* e *M. scutellaris*, e dos patógenos virais ABPV em *Melipona quadrifascita*, *M. scutellaris*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Partamona helleri*, *Scaptotrigona xanthotricha*, *Tetragonisca angustula* e *Trigona spinipes* e do vírus IAPV em *M. quadrifascita anthidioides* e *T. spinipes* na região do Recôncavo baiano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. 2000. Toll like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature** 406: 782-787.
- AL TOUFAILIA, H.; ALVES, D. A.; BENTO, J. M. S.; MARCHINI, L. C.; RATNIEKS, F. L. W. 2016. Hygienic behavior in Brazilian stingless bees. **Biology Open** 5(11): 1712-1718.
- AL TOUFAILIA, H.; EVISON, S. E. F.; HUGHES, W. O. H.; RATNIEKS, F. L. W. 2018. Hygienic and non-hygienic honeybee, *Apis mellifera*, colonies remove dead and diseased larvae from open brood cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 373(1751): 20170201.
- ALATTAL, Y.; ALSHARHI, M.; ALGHAMDI, A.; ALFAIFY, S.; MIGDADI, H.; ANSARI, M. 2014. Characterization of the native honey bee subspecies in Saudi Arabia using the mtDNA COI–OII intergenic region and morphometric characteristics. **Bulletin of Insectology** 67(1): 31-37.
- ALAUX, C.; DUCLOZ, F.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y. 2010. Diet effects on honey bee immune competence. **Biology Letters** 6: 562-986.
- ALBO, G.N.; REYNALDI, F.J. 2010. *Ascospaera apis*, agente etiológico de la cría yesificada de las abejas. **Revista Argentina de Microbiología** 42: 80.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". **Nucleic Acids Research** 25(17): 3389- 3402.
- ALVAREZ, L.J.; REYNALDI, F.J.; RAMELLO, P.J.; GARCIA, M.L.G.; SGUAZZA, G.H.; ABRAHAMOVICH, A.H.; LUCIA, M. 2018. Detection of honeybee viruses in Argentinian stingless bees (Hymenoptera: Apidae). **Insectes Sociaux** 65(1): 191-197.
- AMIRI, E.; KRYGER, P.; MEIXNER, M.D.; STRAND, M.K.; TARPY, D.R.; RUEPPELL, O. 2018. Quantitative patterns of vertical transmission of deformed wing virus in honey bees. **PLoS One** 13(3): e0195283.
- AMIRI, E.L.; MEIXNER, M.D.; KRYGER, P. 2016. Deformed wing virus can be transmitted during natural mating in honey bees and infect the queens. **Scientific Reports** 6: 33065.
- ARAI, R.; TOMINAGA, K.W.U. M.; OKURA, M.; ITO, K.; OKAMURA, N.; TAKAMATSU, D. 2012. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. **PLoS ONE** 7(3): 1-708.
- BACANDRITSOS, N.; ROINIOTI, E.; PAPANASTASIOU, I. 2012. The important honey bee viruses: a short descriptive review enhanced with recent data. In: Florio, R. M. **Bees: Biology, Threats and Colonies**. New Science Publishers 170-189.
- BAILEY, L. European foulbrood. 1961. **American Bee Journal** 101: 89-92.
- BAILEY, L.; BALL, B.V. 1991. Honey bee pathology. 2nd ed. **Academic Press**, United Kingdom, London.
- BAILEY, L.; MILNE, R.G. 1969. The multiplication regions and interaction of acute and chronic bee-paralysis in adult honey bees. **Journal of General Virology** 4(1): 9-14.
- BAK, B.; WILDE, J.; SIUDA, M. 2010. Comparison of hygienic behaviour between five honey bee breeding lines. **Journal of Apicultural Science** 54(2): 17-24.
- BAKER A.; SCHROEDER D. 2008. The use of RNA-dependent RNA polymerase for the taxonomic assignment of Picorna-like viruses (order Picornavirales) infecting *Apis mellifera* L. populations. **Virology Journal** 5(1): 1-10.
- BAKER, A.S.; SELDEN, P.A. 1997. New morphological and host data for the ectoparasitic larva of *Leptus hidakai* Kawashima (Acari, Acariformes, Erythraeidae). **Sistematic Parasitology** 36: 183-191.

- BAKONYI, T.; GRABENSTEINER, E.; KOLODZIEJEK, J.; RUSVAI, M.; TOPOLSKA, G.; RITTER, W.; NOWOTNY, N. 2002. Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains. **Applied and Environmental Microbiology** 68(12): 6446-6450.
- BARTELLI, B.F.; NOGUEIRA-FERREIRA, F.H. 2014. Pollination services provided by *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini) in greenhouses with *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae). **Sociobiology** 61(4): 510-516.
- BIGIO, G.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F.L. 2013. Hygienic Behavior in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae): Effects of Brood, Food, and Time of the Year. **Journal of Economic Entomology** 106(6): 2280-2285.
- BLANCHARD, P.; OLIVIER, V.; ISCACHE, A.L.; CELLE, O.; SCHURR, F.; LALLEMAND, P.; RIBIÈRE, M. 2008. Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. **Journal of Invertebrate Pathology** 97(2): 182-185.
- BOSCOLO, D.; TOKUMOTO, P.; MFERREIRA, P.A.; RIBEIRO, J.W.; DOS SANTOS, J.S. 2017. Positive responses of flower visiting bees to landscape heterogeneity depend on functional connectivity levels. **Perspectives in Ecology and Conservation** 15(1): 18-24.
- BRAGANÇA, G.L.; BARRETO, R.W. 2015. Primeiro relato da doença “Cria-Giz” em Abelhas *Apis mellifera* no Estado de Minas Gerais. Revista **Ceres** 53: 306.
- BROSI, B.J.; DAILY, G.C.; CHAMBERLAINCP, M.M. 2009. Detecting changes in habitat-scale bee foraging in a tropical fragmented landscape using stable isotopes. **Gestão de Ecologia Florestal** 258(9): 1846-1855.
- CALDAS, M.J.M.; SILVA, I.P.; MACHADO, C.; CARVALHO, C.A.L.; SODRÉ, G. da S. 2020. Qualidade e perfil antimicrobiano do mel de *Melipona asilvai*. **Brazilian Journal of Development** 6: 32760-32768.
- CARVALHO, R.M.A.; MARTINS, C.F.; DA SILVA M.J. 2014. Meliponiculture in Quilombola communities of Ipiranga and Gurugi, Paraíba state, Brazil: an ethnoecological approach. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 10(1): 3.
- CASTAGNINO, G.L.B.; ORSI, R.O. 2012. Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47(6): 738-744.
- CASTAGNINO, G.L.B.; PINTO, L.F.B.; CARNEIRO, M.R.L. 2016. Correlação da infestação de *Varroa destructor* sobre o comportamento higiênico de abelhas *Apis mellifera*. **Archivos de Zootecnia** 65(252): 549-554.
- CEPERO, A.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; PRIETO, L.; GÓMEZ-MORACHO, T.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; BARTOLOMÉ, C.; HIGES, M. 2015. Is *Acarapis woodi* a single species? A new PCR protocol to evaluate its prevalence. **Parasitology Research** 114(2): 651-658.
- CAESAR, L.; CIBULSKI, S.P.; CANAL, C.W.; BLOCHTEIN, B.; SATTLER, A.; HAAG, K. L. 2019. The virome of an endangered stingless bee suffering from annual mortality in southern Brazil. **Journal of General Virology** 100(7): 1153-1164.
- CHAGAS, D.B.; MONTEIRO, F.L.; HÜBNER, S.D.O.; LIMA, M.D.; FISCHER, G. 2019. Viruses that affect *Apis mellifera* and their occurrence in Brazil. **Ciência Rural** 49(9): e20181042.
- CHAMBÓ, E. D. 2016. **Beekeeping and bee conservation: advances in research**. Rijeka: InTech, 242.
- CHEN, Y.; EVANS, J.; FELDLAUFER, M. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology** 92(3): 152-159.
- CHEN, Y.; EVANS, J.D.; SMITH, I.B.; PETTIS, J.S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology** 97(2): 186-188.
- CHEN, Y.; EVANS, J.D.; ZHOU, L.; BONCRISTIANI, H.; KIMURA, K.; XIAO, T.; PETTIS, J.S. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honeybees. **Journal of Invertebrate Pathology** 101(3): 204–209.

- CHEN, Y.P.; PETTIS, J.S.; CORONA, M.; CHEN, W.P.; LI, C.J.; SPIVAK, M.; VISSCHER, P.K.; DeGRANDI-HOFFMAN, G.; BONCRISTIANI, H.; ZHAO, Y.; vanENGELSDORP, D.; DELAPLANE, K.; SOLTER, L.; DRUMMOND, F.; KRAMER, M.; LIPKIN, W.I.; PALACIOS, G.; HAMILTON, M.C.; SMITH, B.; HUANG, S.K.; ZHENG, H.Q.; LI, J.L.; ZHANG, X.; ZHOU, A.F.; WU, L.Y.; ZHOU, J.Z.; LEE, M.-L.; TEIXEIRA, E.W.; LI, Z.G.; EVANS, J.D. 2014. Israeli Acute Paralysis Virus: epidemiology, pathogenesis and implications for honey bee health. **PloS Pathogens** 10(7): e1004261.
- CORREIA-OLIVEIRA, M.E.; MERCÊS, C.D.C.; MENDES, R.B.; NEVES, V.S.D.; SILVA, F.D.L.; CARVALHO, C.A.D. 2018. Can the environment influence varroosis infestation in Africanized Honey Bees in a Neotropical Region?. **Florida Entomologist** 101(3): 464-469.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ROUBIK, D.W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; NOGUEIRA-NETO, P. 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**. 37(2): 275-292.
- CRANE, E. 1987. **O livro do mel**. São Paulo, Brasil.
- DAMIANI, N.; GENDE, L.B.; BAILAC, P.; MARCANGELI, J.A.; EGUARAS, M.J. 2009. Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Parasitology Research** 106(1): 145-152.
- DE GRAAF, D.C.; ALIPPI, A.M.; ANTÚNEZ, K.; AROSTEIN, K.A.; BUDGE, G.; DE KOKER, D.; DE SMET, L.; DINGMAN, D.W.; EVANS, J.D.; FOSTER, L.J.; FUNFHAUS, A.; GARCIA-GONZALEZ, E.; GREGORC, A.; HUMAN, H.; MURRAY, K.D.; NGUYEN, B.K.; POPPINGA, L.; SPIVAK, M.; vanENGELSDORP, D.; WILKINS, S.; GENERSCH, E. 2013. Standard methods for American foulbrood research. **Journal of Apicultural Research** 52(1): 1-28.
- DE GUZMAN, L.; RINDERER, T.E.; STELZER, J.A.; ANDERSON, D. 1997. Congruence of RAPD and mitochondrial DNA markers in assessing *Varroa jacobsoni* genotypes. **Journal of Apicultural Research** 37(1): 49-51.
- DE JESUS, J.N.; CHAMBÓ, E.D.; DA SILVA S.G.; DE OLIVEIRA, N.T.E.; DE CARVALHO, C.A.L. 2017. Hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). **Apidologie** 48(4): 504-512.
- DE JONG, D.; GONÇALVES, L.S. 1981. The *Varroa* problem in Brazil. **American Bee Journal** 34(121): 186-198.
- DE MIRANDA, J.R.; BAILEY, L.; BALL, B.V.; BLANCHARD, P.; BUDGE, G.E.; CHEJANOVSKY, N.; RIBIÈRE, M. 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. **Journal of apicultural research** 52(4): 1-56.
- DE MIRANDA, J.R.; CORDONI, G.; BUDGE, G. 2010. The acute bee paralysis virus - *Kashmir bee virus* - *Israeli acute paralysis virus* complex. **Journal of Invertebrate Pathology** 103(1): 30-47.
- DE MIRANDA, J.R.; GENERSCH, E. 2010. Deformed wing virus. **Journal of Invertebrate Pathology** 103(1): S48-S61.
- DE OLIVEIRA, P.D.A.; DE SOUZA S.M.; DE MELO, A.B.; DA ROCHA JR.C.J.G.; CAVALCANTE, M.C. 2016. Levantamento das organizações associativas de apicultores e meliponicultores no Brasil. **Revista Econômica do Nordeste** 47(4): 51-62.
- DÍAZ, S.; DE SOUZA URBANO, S.; CAESAR, L.; BLOCHTEIN, B.; SATTLER, A.; ZUGE, V.; HAAG, K.L. 2017. Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. **Journal of invertebrate pathology** 143: 35-39.
- DIBLASI, E.; MORSE, S.; MAYBERRY, JR.; ÁVILA, L. J.; MORANDO, M.; DITTMAR, K. 2011. New *Spiroplasma* in parasitic *Leptus* mites and their *Agathemera* walking stick hosts from Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology** 107(3): 225-228.
- DIETEMANN, V.; ELLIS, J.D.; NEUMANN, P. 2013. The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. **Journal of Apicultural Research** 52(1): 1-51.

- DIETEMANN, V.; PFLUGFELDER, J.; ANDERSON, D.; CHARRIÈRE, J. D.; CHEJANOVSKY, N.; DAINAT, B.; GALLMANN, P. 2012. *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. **Journal of Apicultural Research** 51(1): 125-132.
- DO NASCIMENTO, A.S.; CHAMBÓ, E.D.; DE JESUS O.D.; ANDRADE, B.R.; BONSUCCESSO, J.S.; DE CARVALHO, C.A.L. 2018. Honey from Stingless Bee as Indicator of Contamination with Metals. **Sociobiology** 65(4): 727-736.
- DRESCHER, N.; WALLACE, H.M.; KATOULI, M.; MASSARO, C.F.; LEONHARDT, S.D. 2014. Diversity matters: how bees benefit from different resin sources. **Oecologia** 176(4): 943-953.
- DUNN, A.M.; MARK E. TORCHIN, M.J.; HATCHER, P.M.; KOTANEN, D.M.; BLUMENTHAL, J.E.; BYERS, C.A.C.; COON, V. M.; FRANKEL, R.D; HOLT, R.A.; HUFBAUER, A.R.; KANAREK, K.A.; SCHIERENBECK, L.M.W.; SARAH E. P. 2012. Indirect effects of parasites in invasions. **Functional Ecology** 26(6): 1262-1274.
- ELLIS, J.D.; NALEN, C.Z. 2010. Bee louse, bee fly, braulid, *Braula coeca* Nitzsch (Insecta: Diptera: Braulidae). **Department of Entomology and Nematology UF/IFAS Extension**. Original Publication 1-3.
- ESCOBAR, A.L.S.; XAVIER, F.B. 2018. Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas. **Revista Uningá** 37: 1.
- EVANS J.D. 2001. Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses. **Journal Invertebrate Pathology** 78(4): 189- 193.
- EVANS, J.D. 2003. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 83(1): 46-50.
- FLORES, J.M.; FUNARI, S.R.C.; RUIZ, J.A.; RUIZ, J.M.; PUERTA, F.; CAMPANO, F. 2000. Ascoferiose (*Ascosphaera apis*): Causas predisponentes, medidas de controle e prevenção. **Boletim de Indústria Animal** 57(2): 201-209.
- FOLEY, K.; FAZIO, G.; JENSEN, A.B.; HUGHES, W.O. 2014. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. **Veterinary microbiology** 169(3-4): 203-210.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. 2018 - Production. Disponível em: <faostat.fao.org>. Acesso: 20 mar. 2020.
- FORSGREN, E. 2010. European foulbrood in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology** 103(1): S5-S9, 2010.
- FORSGREN, E.; BUDGE, G.E.; CHARRIÈRE, J.D.; HORNITZKY, M.A. 2013. Standard methods for European foulbrood research. **Journal of Apicultural Research** 52(1): 1-14.
- FRANCIS, R.; KRYGER, P. 2012. Single assay detection of *acute bee paralysis virus*, *Kashmir bee virus* and *Israeli acute paralysis virus*. **Journal of Apicultural Science** 56(1): 137-146.
- FRAZIER, M.T.; FINLE, J.; HARKNESS, W.; RAJOTTE, E.G. 2000. Sequential sampling scheme for detecting infestation levels of tracheal mites (Heterostigmata: Tarsonemidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. **Journal of Economic Entomology** 93(3): 551-558.
- FREIBERG, M.; DE JONG, D.; MESSAGE, D.; COX-FOSTER, D. 2012. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. **Genetics and Molecular Research** 11(3): 3310-3314.
- FREY, E.; SCHNELL, H.; ROSENKRANZ, P. 2011. Invasion of *Varroa destructor* mites into mite-free honey bee colonies under the controlled conditions of a military training area. **Journal of Apicultural Research** 50(2): 138-144.
- FRIES, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology** 103: S73-S79.
- FRIES, I.; CHAUZAT, M.P.; CHEN, Y.P.; DOUBLET, V.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; HIGES, M.; MCMAHON, D.P.; G.; WEBSTER, T.C.; WILLIAMS, G.R. MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.;

- NATSOPOULOU, M.; PAXTON, R.J.; TANNER, 2013. Standard methods for *Nosema* research. **Journal of Apicultural Research** 52: 1-28.
- GARIBALDI, L.A.; CARVALHEIRO, L.G.; LEONHARDT, S.D.; AIZEN, A.M.; BLAAUW, B.R.; ISAAC, R.; KUHLMANN, M.; KLEIJN, D.; KLEIN, A.M.; KREMEN, C.; MORANDIN, L.; SCHEPER, J.; WINFREE, R. 2016. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. **The Ecological Society of America** 12(8): 439-447.
- GARIBALDI, L.A.; CARVALHEIRO, L.G.; LEONHARDT, S.D.; AIZEN, M.A.; BLAAUW, B.R.; ISAACS, R.; MORANDIN, L. 2014. Da pesquisa à ação: aumentando o rendimento das culturas através de polinizadores selvagens. **Fronteiras em Ecologia e Meio Ambiente** 12(8): 439-447.
- GENERSCH, E; AUBERT, M. 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Veterinary Research** 41(6): 54.
- GENERSCH, E. 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. **Applied Microbiology and Biotechnology** 87(1): 87-97.
- GHOSH, R.C.; BALL, B.V.; WILLCOCKS, M.M.; CARTER, M.J. 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. **Journal of General Virology** 80(6): 1541-1549.
- GIACOBINO, A.M.A.I.; PACINI A.F. N.; PIETRONAVE H.; RODRIGUEZ G.; PALACIO A.B.C. N.; ORELLANO E, SALTO C.E.; SIGNORINI, M.L.; MERKE J. 2016. *Varroa destructor* and viruses association in honey bee colonies under different climatic conditions. **Environmental Microbiology Reports** 8(3): 407-412.
- GIFFORD, C. 2011. **Colony collapse disorder**. The vanishing honeybee (*Apis mellifera*). University of Colorado at Boulder 2-59.
- GOBLIRSCH, M.; HUANG, Z.Y.; SPIVAK, M. 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. **PLoS ONE** 8(3): 58-165.
- GOULSON, D. 2003. Effects of introduced bees on native ecosystems. **Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 34(1): 1-26.
- GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E.L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science** 347: 6229.
- GOVAN, V.A.; ALLSOPP, M.H.; DAVISON, S. 1999. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology** 65: 2243-2245.
- GRAYSTOCK, P.; GOULSON, D.; HUGHES, W.O. 2015. Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1813): 1371.
- GRECO, M.K.; HOFFMANN, D.; DOLLIN, A.; DUNCAN, M.; SPOONER-HART, R.; NEUMANN, P. 2010. The alternative Pharaoh approach: stingless bees mummify beetle parasites alive. **Naturwissenschaften** 97(3): 319-323.
- GUIDOTTI, L.G.; CHISARI, F.V. 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. **Annual Review of Immunology** 19(1): 65-91.
- GUIMARÃES-CESTARO, L.; MARTINS, M.F.; MARTÍNEZ, L.C.; ALVES, M.L.T.M.F.; GUIDUGLI-LAZZARINI, K.R.; NOCELLI, R.C.F.; TEIXEIRA, É.W. 2020. Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. **The Science of Nature** 107: 1-14.
- GUIMARÃES-CESTARO, L.; SERRÃO, J.E.; MESSAGE, D.; MARTINS, M.F.; TEIXEIRA, E. W. 2016. Simultaneous detection of *Nosema* spp., *Ascosphaera apis* and *Paenibacillus larvae* in honey bee products. **Journal of Hymenoptera Research** 49(1): 43-50.
- GUZMAN-NOVOA, E.; HAMIDUZZAMAN, M.M.; ANGUIANO-BAEZ, R.; CORREA-BENÍTEZ, A.; CASTAÑEDA-CERVANTES, E.; ARNOLD, N.I. 2016. First detection of honey bee viruses in stingless bees in North America. **Journal of Apicultural Research** 54(2): 93-95.

- HARPER, A.D.; STALNAKER, S.H.; WELLS, L.; DARVILL, A.; THORNBURG, R.; YORK, W.S. 2010. Interaction of Nectarin 4 with a fungal protein triggers a microbial surveillance and defense mechanism in nectar. **Phytochemistry** 71(17-18): 1963-1969.
- HENRY, M.; ROLLIN, O.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; DECOURTYE, A. A. 2012. Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science** 336(6079): 348-350.
- HIGES, M.; HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; GARRIDO-BAILÓN, E.; GONZÁLEZ-PORTO, A.V.; MEANA, A.; BERNAL, J. 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. **Environmental Microbiology Reports** 2(2): 243-250.
- HIGES, M.; MATÍN-HERNANÉZ, R.; GARRIDO-BAILÓN, E.; BOTÍAS, C.; MEANA, A. 2009. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology** 10(10): 2659-2669.
- HIGHFIELD, A.C.; EL NAGAR, A.; MACKINDER, L.C.; NOËL, L.M.; HALL, M.J.; MARTIN, S.J.; SCHROEDER, D.C. 2009. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. **Applied and Environmental Microbiology** 75(2): 7212-7220.
- HUANG, W.F.; SOLTER, L.F. 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 113(1): 35-41.
- HUMAN, H.; BRODSCHNEIDER, R.; DIETEMANN, V.; DIVELY, G.; ELLIS, J.; FORSGREN, E.; FRIES, I.; HATJINA, F.; HU, F.L.; JAFFÉ, R.; KÖHLER, A.; PIRK, C.W.W.; ROSE, R.; STRAUSS, U.; TANNER, G.; VAN DER STEEN, J. J. M.; VEJSNÆS, F.; WILLIAMS, G. R.; ZHENG, H. Q. 2013. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. **Journal of Apicultural Research** 52: 1-53.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2019.** Disponível em: <<http://https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso: 19 de jan de 2020.
- IFANTIDIS, M.D. 1988. Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. **Apidologie** 19(4): 387-396.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; CANHOS, D.A.L.; ALVES, D.A.; SARAIVA, A.M. 2012. **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais.** São Paulo: EDUSP.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. 2019. Dados climáticos para o estado da Bahia.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Produção da pecuária municipal. 2019.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. 2016. **Produção da Pecuária Municipal.** Rio de Janeiro, Brasil, 41.
- JACQUEMYN, H.; LENAERTS, M.; BRYNS, R.; WILLEMS, K.; HONNAY, O.; LIEVENS, B. 2013. Among-population variation in microbial community structure in the floral nectar of the bee-pollinated forest herb *Pulmonaria officinalis* L. **PLoS ONE** 8(3): e56917.
- JARA, L.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, D.; MUÑOZ, I.; DE LA RUA, P. 2018. Epidemiological survey of *Ascospaera apis* in small-scale migratory *Apis mellifera iberiensis* colonies. **Sociobiology** 65(2): 285-290.
- JENSEN, A.B.; ARONSTEIN, K.; FLORES, J.M.; VOJVODIC, S.; PALACIO, M.A.; SPIVAK, M. 2013. Standard methods for fungal brood disease research. **Journal of Apicultural Research** 52(1): 1-20.
- KEVILL, J.L.; SOUZA, F.S.; SHARPLES, C.; OLIVER, R.; SCHROEDER, D.C.; DECLAN, C.; MARTIN, S.J. 2019. DWV-A lethal to honey bees (*Apis mellifera*): a colony level survey of DWV variants (A, B e C) in England, Wales, and 32 states across the US. **Viruses** 11(5): 426-427.
- KOJIMA, Y.; YOSHIYAMA, M.; KIMURA, K.; KADOWAKI, T. 2011. PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*. **Journal of Invertebrate Pathology** 108: 135-137.

- LANZI, G.; MIRANDA, J.R. DE; BONIOTTI, M.B.; CAMERON, C.E.; LAVAZZA, A.; CAPUCCI, L.; CAMAZINE, S.M.; ROSSI, C. 2006. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Virology** 80(10): 4998–5009.
- LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties** 27(2): 499-510.
- LEAT, N; BALL, B; GOVAN, V; DAVISON, S. 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. The GenBank accession number of the sequence reported in this paper is AF183905. **Journal of General Virology** 81(8): 2111-2119.
- LEE, K.V.N.; STEINHAEUER, K.; RENNICH, M.E.; WILSON, D.R.; TARPY, D.M.; CARON, R.; ROSE, K.S.; DELAPLANE, K. BAYLIS.; E. J. LINGERICH. 2015. A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. **Apidologie** 46(3): 292-305.
- LEE, PETER E.; FURGALA, B. 1965. Chronic bee paralysis virus in the nerve ganglia of the adult honey bee. **Journal of Invertebrate Pathology** 7(2): 170-174.
- LEITE, D.T.; SAMPAIO, R.B.; DOS SANTOS, C.O.; DOS SANTOS, J.N.; CHAMBÓ, E.D.; DE CARVALHO, C.A.L.; DA SILVA S.G. 2018. Toxicity of Fenpyroximate, Difenconazole and Mineral Oil on *Apis mellifera* L. Introduction. **Sociobiology** 65(4): 737-743.
- LEVIN, S.; SELA, N.; EREZ, T.; NESTEL, D. PETTIS, J.; NEUMANN, P.; CHEJANOVSKY, N. 2019. New viruses from the ectoparasite mite *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Viruses** 11(2): 94.
- LI, J.; WANG, T.; EVANS, J D.; ROSE, R.; ZHAO, Y.; LI, Z.; BANMEKE, O. 2019. The phylogeny and pathogenesis of Sacbrood virus (SBV) infection in European honey bees, *Apis mellifera*. **Viruses** 11(1): 61.
- LIMA, M.C.D.; ROCHA, S.D.A. 2012. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil**. Brasília: IBAMA.
- LOPES, M.D.R.; GONÇALVES, J.; PEREIRA, F.D.M.; DE CAMARGO, R.C.R. 2004. **Doenças e inimigos naturais das abelhas**. Embrapa Meio-Norte 26.
- MA, Z.; LI, C.; PAN, G.; LI, Z.; HAN, B. 2013. Genome-Wide Transcriptional Response of Silkworm (*Bombyx mori*) to Infection by the Microsporidian *Nosema bombycis*. **PLoS ONE** 8(12): e84137.
- MAIA, U. M.; JAFFE, R.; CARVALHO, A. T.; FONSECA, V. L. I. 2015. Meliponicultura no Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine** 37(4): 327-333.
- MARTIN, S. J. 2016. Does a remote Brazilian island hold the key to varroa tolerance?. **American Bee Journal** 1217-1218.
- MANLEY, R.; BOOTS, M.; WILFERT, L. 2017. Condition-dependent virulence of slow bee paralysis virus in *Bombus terrestris*: are the impacts of honeybee viruses in wild pollinators underestimated?. **Oecologia** 184(2): 305-315.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARÍN, P.; BOTÍAS, C.; GARRIDOBAILÓN, E.; BARRIOS, L.; HIGES, M. 2009. Temperature effect on biotic potential of honey bee microsporidia. **Applied and Environmental Microbiology** 75(8): 2554-2557.
- MARTIN, S. J.; BRETTELL, L.E. 2019. Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. **Annual Review of Virology** 6(1): 49-69.
- MARTIN, S. J.; CORREIA-OLIVEIRA, M. E. 2016. The occurrence of ecto-parasitic *Leptus* sp. mites on Africanized honey bees. **Journal of Apicultural Research** 55(3): 243-246.
- MARTÍNEZ-CESÁREO, M; ROSAS-CÓRDOBA, J; PRIETO-MERLOS, D; CARMONA-GASCA, A; PEÑA-PARRA, B.; ÁVILA-RAMOS, F. 2016. Presence of *Varroa destructor*, *Nosema apis*, and *Acarapis woodi*, in honey bee (*Apis mellifera*) of the east region in the State of Mexico. **Abanico Veterinario** 6(2): 30-38.

- MATARRITA-CARRANZA, B.; MOREIRA-SOTO, R. D.; MURILLO-CRUZ, C.; MORA, M.; CURRIE, C. R.; PINTOTOMAS, A. A. 2017. Evidence for widespread associations between neotropical hymenopteran insects and actinobacteria. **Frontiers in Microbiology** 8: 2016
- MAXFIELD-TAYLOR, S.A.; MUJIC, A.B; RAO, S. 2015. First detection of the larval chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* (Ascomycota: Eurotiomycetes: Ascosphaerales) in adult bumble bees. **PloS ONE** 10(4): e0124868.
- MCAFEE, A.; CHAPMAN, A.; IOVINELLA, I.; GALLAGHER-KURTZKE, Y.; COLLINS, T. F.; HIGO, H.; MADILAO, L. L.; PELOSI, P.; FOSTER, L. J. 2018. A death pheromone, oleic acid, triggers hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Scientific Reports**, 8(1): 5719.
- McART, S.H.; KOCH, H.; IRWIN, R.E.; ADLER, L. S. 2014. Arranging the bouquet of disease: floral traits and the transmission of plant and animal pathogens. **Ecology letters** 17(5): 624-636.
- MEDINA, L.M.; HART, A.G.; RATNIEKS, F.L. W. 2009. Hygienic behavior in the stingless bees *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini). **Genetics and Molecular Research** 8(2): 571-576.
- MELO, W. G. P.; PEREIRA, C. F.; TAISE, T. H.F.; PUPO, M. T. 2019. Interações simbióticas entre micro-organismos e insetos. **Revista RG News** 5(1).
- MENDOZA, Y.; ANTÚNEZ, K.; BRANCHICCELA, B.; ANIDO, M.; SANTOS, E.; INVERNIZZI, C. 2014. *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. **Apidologie** 45(2): 224-234.
- MERCÊS, C. C. **Parasitas e microrganismos patogênicos em *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) no Recôncavo baiano**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- MICHENER, C. D. 2007. **The Bees of the World**. Ed. 2º Johns Hopkins University. Baltimore.
- MÖCKEL, N.; GISDER, S.; GENERSCH, E. 2011. Transmissão horizontal do vírus da asa deformado: conseqüências patológicas em abelhas adultas (*Apis mellifera*) dependem da via de transmissão. **Journal of General Virology** 92(2): 370-377.
- MOLINERI, G.; PACINIA, C.; FONDEVILAN, F.C.; MERKE, J.O. E; BERTOZZI, E; MASCIANGELO, G; PIETRONAVE, H; SIGNORINI, M. 2017. Risk factors for the presence of deformed wing virus and acute bee paralysis virus under temperate and subtropical climate in Argentinian bee colonies. **Preventive Veterinary Medicine** 140: 106-115.
- MORDECAI, GIDEON J.; WILFERT, L.; MARTIN, S.J.; JONES, I.M.; SCHROEDER, D.C. 2016. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the *Deformed Wing Virus* quasispecies. **The ISME Journal** 10(5): 1264-1273.
- MORETTI, C.J.; COSTA, C.P.; FRANCOY, T.M. 2018. Wing morphometrics reveals the migration patterns of Africanized honey bees in Northeast Brazil. **Sociobiology** 65(4): 679-685.
- MORRISSEY, B.J.; HELGASON, T.; POPPINGA, L.; FUNFHAUS, A.; GENERSCH, E.; BUDGE, G.E. 2015. Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. **Environmental Microbiology** 17(4): 1414-1424.
- MORTENSEN, A. N.; SCHMEHL, D. R.; ALLSOPP, M.; BUSTAMANTE, T.A.; KIMMEL, C.B.; DYKES, M.E.; ELLIS, J.D. 2016. Differences in *Varroa destructor* infestation rates of two indigenous subspecies of *Apis mellifera* in the Republic of South Africa. **Experimental and Applied Acarology** 68(4): 509-515.
- MOURE, J.M.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. 2007. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. Curitiba: **Sociedade Brasileira de Entomologia** 1058.
- MULLAPUDI, E.; PŘIDAL, A.; PÁLKOVÁ, L.; DE MIRANDA J.R.; PLEVKA, P. 2016. Virion Structure of Israeli Acute Bee Paralysis Virus. **Journal of Virology** 90(18): 8150-8159.
- MULLER, S.S.I; SALVATORI, R.U; MAJOLO, C; FRODER, H. 2011. Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey samples from beekeepers of the Taquari Valley, Rio Grande do Sul state, Brazil. **International Journal of Applied Microbiology** 2(3): 217-221.

- MURILHAS, A; CASACA J. 2004. **Ácido oxálico**. Guia de utilização do ácido oxálico na luta contra a *Varroa*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas 18.
- NASCIMENTO, C.B.; MELLO, R.P.; SANTOS, M.V.; NASCIMENTO, R.V.; SOUZA, D.J. 1971. Ocorrência de acariose em *Apis mellifera* L. no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 6: 57-60.
- NATSOPOULOU, M.E.; MCMAHON, D.P.; DOUBLET, V.; FREY, E.; ROSENKRANZ, P.; PAXTON, R.J. 2017. The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss. **Scientific Reports** 7(1): 5242.
- NEMOSE. *Varroa destructor*. 2013. Disponível em: <<http://www.metapathogen.com/varroa/>>. Acesso em: 24/01/2014.
- NEVES, C.M. de L.; BRITO, B.B.P.; SODRÉ, G.; JESUS, J.N. de; RIBEIRO, G.S.; AGUIAR, C.M.L.; CARVALHO, C.A.L. de. 2020. Toxidade de produtos comerciais a base de *Azadirachta indica* em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidea). **Diversitas Journal** 5: 1547-1560.
- NUNES-SILVA, P.; PIOT, N.; MEEUS, I.; BLOCHTEIN, B.; SMAGGHE, G. 2016. Absence of Leishmaniinae and Nosematidae in stingless bees. **Scientific Reports** 6: 32547.
- NUNES-SILVA, P.; ROLDÃO, Y.; SILVA, C.I.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZFONSECA, V.L. 2013. Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. **Apidologie** 44(5): 537-546.
- OĞUZ, B.; KARAPINAR, Z.; DINCER, E.; DEĞER, M. S. 2017. Molecular detection of *Nosema* spp. and black queen-cell virus in honeybees in Van Province, Turkey. **Journal of Veterinary and Animal Sciences** 41(2): 221-227.
- OLIVIER, V.; BLANCHARD, P.; CHAOUCH, S.; LALLEMAND, P.; SCHURR, F.; CELLE, O.; RIBIÈRE, M. 2008. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of *Chronic bee paralysis virus*, a honey bee virus. **Virus Research** 132(1-2): 59-68.
- OTIS, G.W.; SCOTT-DUPREE, C.D. 1992. Effects of *Acarapis woodi* on overwintered colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in New York. **Journal of Economic Entomology** 85(1): 40-46.
- PASIN, L.E.V.; TERESO, M.J.A.; BARRETO, L.M.R.C. 2012. Análise da produção e comercialização de mel natural no Brasil no período de 1999 a 2010. **Agroalimentária** 29-42.
- PAXTON, R. 1992. The mite marches on: *Varroa jacobsoni* found in the UK. **Bee World** 73(2): 94-99.
- PECK, D.T.; SMITH, M.L.; SEELEY, T.D. 2016. *Varroa destructor* mites can nimbly climb from flowers onto foraging honey bees. **PLoS ONE** 11(12): e0167798.
- PEDRO, S.R.M. 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology** 61(4): 348-354.
- PEGORARO, A.; NUNES, F.L.; PEREIRA, F.F.; TEIXEIRA, R.A.; KRUGER, E.; SERMANN, K. C. 2013. Perdas de colônias de *Apis mellifera* L. no inverno suplementadas com alimentação artificial com pólen e favos de mel. **Revista Agrarian** 6: 67-74.
- PEIXOTO, C. M. 2020. **Patógenos e parasitas associados à abelha africanizada *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera - Apidae) no Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- PEIXOTO, C.M.; CORREIA-OLIVEIRA, M.E.; DE CARVALHO, C.A.L. 2020. Current status of *Acarapis woodi* mite infestation in Africanized honey bee *Apis mellifera* in Brazil. **Florida Entomologist** 102(4): 775-777.
- PETTIS, J.S.; WILSON, W.T.; EISCHEN, F.A. 1992. Nocturnal dispersal by female *Acarapis woodi* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Experimental and Applied Acarology** 15(2): 99-108.
- PINTO, F.A.; PUKER, A.; BARRETO, L.M.R.C. 2015. Infestation rate of the mite *Varroa destructor* in commercial apiaries of the Vale do Paraíba and Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 67(2): 631-635.

- PINTO, F.D.A.; PUKER, A.; BARRETO, L.M.R.C. 2012. The ectoparasite mite *Varroa destructor* Anderson and Trueman in southeastern Brazil apiaries: effects of the hygienic behavior of Africanized honey bees on infestation rates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 64: 1194-1199.
- PIRES, C.S.S.; PEREIRA, F.D.M.; LOPES, M.T.D.R.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J.S.; TEIXEIRA, É.W. 2016. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51(5): 422-442.
- PIRK, C.W.; STRAUSS, U.; YUSUF, A.A.; DÉMARES, F.; HUMAN, H. 2016. Honeybee health in Africa a review. **Apidologie** 47: 276-300.
- PORRINI, M.P.; PORRINI, L.P.; GARRIDO, P.M.; PORRINI, D.P.; MULLER, F.; NUÑEZ, L.A.; EGUARAS, M.J. 2017. *Nosema ceranae* in South American native stingless bees and social wasp. **Microbial ecology** 74(4): 761-764.
- PROCHÁZKOVÁ, M.; FÜZIK, T.; ŠKUBNÍK, K.; MORAVCOVÁ, J.; UBIPARIP, Z.; PŘIDAL, A.; PLEVKA, P. 2018. Virion structure and genome delivery mechanism of sacbrood honeybee virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 115(30): 7759-7764.
- PROMNUAN, Y.; KUDO, T.; CHANTAWANNAKUL, P. 2009. Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25(9): 1685-1689.
- PURKISS, T.; LACH, L. 2019. Pathogen spillover from *Apis mellifera* to a stingless bee. **Proceedings of the Royal Society B** 286: 1908: 20191071.
- RANGEL, J.; GIRESI, M.; PINTO, M.A.; BAUM, K. A.; RUBINK, W.L.; COULSON, R.N.; JOHNSTON, J.S. 2016. Africanization of a feral honey bee (*Apis mellifera*) population in South Texas: does a decade make a difference?. **Ecology Evolution** 6(7): 2158-2169.
- REHNER, S.A.; EVANS, J. D. 2009. Microsatellite loci for the fungus *Ascosphaera apis*: cause of honey bee chalkbrood disease. **Molecular Ecology Resources** 9: 855-858.
- REYNALDI, F.J.; SGUAZZA, G.H.; ALBICORO, F.J.; PECORARO, M.R.; GALOSI, C.M. 2013. First molecular detection of co-infection of honey bee viruses in asymptomatic *Bombus atratus* in South America. **Brazilian Journal of Biology** 73(4): 797-800.
- REYNALDI, F.J.; SGUAZZA, G.H.; PECORARO, M.R.; TIZZANO, M.A.; GALOSI, M.C., 2010. First report of viral infection that affect argentine honeybees. **Environmental Microbiology Reports** 2: 749-751.
- RIBIÈRE, M.; OLIVIER, V.; BLANCHARD, P. 2010. Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? **Journal of Invertebrate Pathology** 103: S120-S131.
- RIVEROS, G.; ARISMENDI, N.; ZAPATA, N. SMAGGHE, G.; RODRÍGUEZ, M.; GERDING, M.; VARGAS, M. 2018. A scientific note on first detection of Kashmir bee virus in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in South America. **Apidologie** 49(2): 220-223.
- ROCHA, M.C.L.S.A.; ALENCAR, S. 2012. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Brasília: IBAMA.
- RODRÍGUEZ, M.; VARGAS, M.; GERDING, M.; NAVARRO, H.; ANTÚNEZ, K. 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. **Journal of Apicultural Research** 51(3): 285-287.
- ROSA, J.M.; ARIOLI, C.J.; NUNES-SILVA, P.; GARCIA, F.R.M. 2019. Desaparecimento de abelhas polinizadoras nos sistemas naturais e agrícolas: Existe uma explicação?. **Revista de Ciências Agroveterinárias** 18(1): 154-162.
- ROSELINO, A.C.; DOS SANTOS, S.A.B.; BEGO, L.R. 2010. Qualidade dos frutos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) a partir de flores polinizadas por abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier 1836 e *Melipona scutellaris* Latreille 1811) sob cultivo protegido. **Revista brasileira de Biociências** 8: 2.
- ROSENKRANZ, P.; AUMEIER, P.; ZIEGELMANN, B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. **Journal of Invertebrate Pathology** 103: S96-S119.

- RUNCKEL, C.; FLENNIKEN, M.L.; ENGEL, J.C.; RUBY, J.G.; GANEM, D.; ANDINO, R.; DERISI, J.L. 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. **PLoS ONE** 6: (6).
- SÁ, F.A.S.; SOUSA, P.H.A.A. 2019. Defensividade de abelhas *Apis mellifera* L. africanizadas. *Revista Científica de Medicina Veterinária* (32).
- SALVATIERRA, L.; ALMEIDA, M.Q. 2017. First record of a *Leptus latreille* mite (Trombidiformes, Erythraeidae) associated with a Neotropical trapdoor spider (Araneae: Mygalomorphae: Actinopodidae). **Cogent Biology** 1: 1295823.
- SAMMATARO, D.; DE GUZMAN, L.; GEORGE, S.; OCHOA, R.; OTIS, G. 2013. Standard methods for tracheal mite research. **Journal of Apicultural Research** 52(4): 1-20.
- SAMMATARO, D.; GERSON, U.; NEEDHAM, G. 2000. Parasitic Mites of Honey Bees: Life History, Implications, and Impact. **Annual Review of Entomology** 45(1): 519–548.
- SAMMATARO, D.; UNTALAN, P.; GUERRERO, F.; FINLEY, J. 2005. The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. **International Journal of Acarology** 31(1): 67-74.
- SANCHES, M.A.; PEREIRA, A.M.S.; SERRÃO, J.E. 2017. Pharmacological actions of extracts of própolis of stingless bees (Meliponini). **Journal of Apicultural Research** 56(1): 50-57.
- SANT'ANA, R.A.S.; DE CARVALHO, C.A.L.; ODASOUZA, M.; SOUZA, B.D.A.; DIAS, F.D.S. 2020. Characterization of honey of stingless bees from the Brazilian semi-arid region. **Food Chemistry** 327: 127041.
- SANTOS, L.G.A.; MESSAGED, P.; TEIXEIRA, E.W. 2014. Honey bee health in apiaries in the Vale do Paraíba, São Paulo State, Southeastern Brazil. **Sociobiology** 61: 307–312.
- SASU, M.A.; WALL, K.L.; STEPHENSON, A.G. 2010. Antimicrobial nectar inhibits a florally transmitted pathogen of a wild Cucurbita pepo (Cucurbitaceae). **American Journal of Botany** 97: 1025-1030.
- SCHWARZ, R. S.; TEIXEIRA, E.W.; TAUBER, J.P.; BIRKE, J.M.; MARTINS, M.F.; FONSECA, I.; EVANS, J.D. 2014. Honey bee colonies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. **Microbiology Open** 3(3): 341-355.
- SEITZ, K.; BUCZOLICH, K.; DIKUNOVÁ, A.; PLEVKA, P.; POWER, K.; RÜMENAPF, T.; LAMP, B. 2019. A molecular clone of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes mortality in honey bee pupae (*Apis mellifera*). **Scientific Reports** 9(1): 1-11.
- SGUAZZA, G.H.; REYNALDI, F.J.; GALOSI, C.M.; PECORARO, M.R. 2013. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. **Journal of Virological Methods** 194(1-2): 102-106.
- SHEN, M; CUI, L.; OSTIGUY, N.; COX-FOSTER, D. 2005. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (*kashmir bee virus* and *sacbrood virus*) with the honeybee host and the parasitic *varroa* mite. **Journal of General Virology** 86(8): 2281-2289.
- SILVA, C.I.; ALEIXO, K.P.; NUNES-SILVA, B.; FREITAS, B.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2014. Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil. São Paulo: Instituto Avançado da Universidade de São Paulo, **Ministério do Meio Ambiente-Brasil**.
- SILVA, C.M.R. 2010. **Luta contra *Varroa destructor* Anderson & Trueman: avaliação de estratégias biotécnicas e bioquímicas com o óleo de *Mentha cervina* L.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- SILVA, T.S.M. DA.; COELHO FILHO, M.A.; COELHO, E.F. 2016. Boletim meteorológico da estação convencional de Cruz das Almas, Ba: variabilidade e tendências climáticas. Cruz das Almas-BA: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 77 (Documentos, 216).
- SINGH, R.; LEVITT, A.L.; RAJOTTE, E.G.; HOLMES, E.C.; OSTIGUY, N.; LIPKIN, W.I.; COX-FOSTER, D L. 2010. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. **PLoS ONE** 5 (12): 14357.

- ŠKUBNÍK, K.; NOVÁČEK, J.; FÜZIK, T.; PŘIDAL, A.; PAXTON, R. J.; PLEVKA, P. 2017. Structure of *deformed wing virus*, a major honey bee pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 114(12): 3210-3215.
- SMIRNOV, A. 1979. Research results obtained in USSR concerning aetiology, pathogenesis, epizootiology, diagnosis and control of *Varroa* disease in bees. **Apiacta** 13(4): 149-162.
- SOUTHCOTT, R.V. 1961. Studies on the systematic and biology of the Erythraeoidea (Acarina), with critical revision of the genera and subfamilies. **Journal of Zoology** 9(3): 367-611.
- SOUZA, F.S.; KEVILL, J.L.; CORREIA-OLIVEIRA, M.E.; CARVALHO, C.A.L. de; MARTIN, S.J. 2019. Occurrence of *deformed wing virus* variants in the stingless bee *Melipona subnitida* and honey bee *Apis mellifera* populations in Brazil. **Journal of General Virology** 100(2): 289-294.
- SPURNY, R.; PŘIDAL, A.; PÁLKOVÁ, L.; KIEM, H.K.T.; DE MIRANDA, J.R.; PLEVKA, P. 2017. Virion structure of black queen cell virus, a common honeybee pathogen. **Journal of virology** 91(6): e02100-16.
- STEPHENS, P.R.S.; OLIVEIRA, M.B.S.C.; RIBEIRO, F.C.; CARNEIRO, L.A.D. 2009. Virologia. In: MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. (org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, (4): 125-220.
- STOLTZ, D.; SHEN, X.R.; BOGGIS, C.; SISSON, G. 1995. Molecular diagnosis of *Kashmir bee virus* infection. **Journal of Apicultural Research** 34(3): 153-160.
- SUWANNAPONG, G.; MAKSONG, S.; BENBOW, M.E. 2011. Stingless bee própolis effects on experimental infection of *Apis florea* with *Nosema ceranae*. **Journal Agriculture Science Technology** 1: 818-825.
- TAPIA, C.E. 2010. **Un nuevo concepto en Sanidad Apícola**. Buenos Aires. Dunken 176.
- TAVARES, P. 2018. The bacteriophage head-to-tail interface. **Virus Protein and Nucleoprotein Complexes** 305-328.
- TEHEL, A.; BROWN, M.J.; PAXTON, R.J. 2016. Impact of managed honey bee viruses on wild bees. **Current Opinion in Virology** 19: 16-22.
- TEIXEIRA, É.W.; GUIMARÃES-CESTARO, L.; ALVES, M.L.T.M.F, MENSAGEM, D.; MARTINS, M.F, DA LUZ, C.F.P.; SERRÃO, J.E. 2018. Esporos de larvas de *Paenibacillus*, *Ascospaera apis*, *Nosema ceranae* e *Nosema apis* em produtos apícolas supervisionados pelo Serviço de Inspeção Federal do Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia** 62(3): 188-194.
- TEIXEIRA, E.W. 2011. Larvas de *Leptus* sp. Latreille, 1796 (Acarina: Erythraeidae) em abelhas africanizadas *A. mellifera* Linnaeus 1758 (Hymenoptera: Apidae) no Brasil. **Pesquisa & Tecnologia** 8(27).
- TEIXEIRA, E.W. 2008. Ocorrência de larvas de *Leptus* sp. Latreille 1796 (Acarina: Erythraeidae) em operárias de abelhas africanizadas *A. mellifera* Linnaeus 1758 (Hymenoptera: Apidae), no Brasil. **Boletim de Indústria Animal** 65(3): 249-251.
- TEIXEIRA, E.W.; DOS SANTOS, L.G.; SATTLER, A.; MENSAGEM, D.; ALVES, M.; MARTINS, M.F.; FRANCOY, T. M. 2013. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology** 114(3): 250-254.
- TEIXEIRA, É.W.; FERREIRA, E.A.; DA LUZ, C.F.P.; MARTINS, M.F.; RAMOS, T.A.E.; LOURENÇO, A.P. 2020. European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: old disease, renewed threat. **Journal of Invertebrate Pathology** 172: 107357.
- TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; ZAPPULLA, N.; DAINAT, B., COUSSERANS, F.; COLIN, M. E.; BERGOIN, M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. **Applied and environmental microbiology** 70(12): 7185-7191.

- TOPLAK, I.; CIGLENECKI, U.J.; ARONSTEIN, K.; GREGORC, A. 2012. Chronic bee paralysis virus and *Nosema ceranae* experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). **Viruses-Basel** 5: 2282-2297.
- TORRES, R.D.N.S.; BARRETO, M.R. 2013. Incidence of *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) in stinging bees in the Sinop region, Mato Grosso, Brazil. **Entomo Brasilis** 6(1): 3033.
- TURCATTO, A.P.; ISSA, M.C.; MORAIS, M.M.; ALMEIDA, R. 2012. *Varroa destructor* (Anderson & Trueman) mite infestation (Mesostigmata: Varroidae) in adult workers and in Africanized honeybee cells *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) in the Franca Region - SP. **Entomo Brasilis** 5(3): 198-203.
- UEIRA-VIEIRA, C.; ALMEIDA, L.O.; DE ALMEIDA, F.C; AMARAL, I.M.R.; BRANDEBURGO, M. A.M.; BONETTI, A.M. 2015. Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. **Apidologie** 46(5): 628-630.
- VALLES, S.M.; STRONG, C.A.; DANG, P.M; HUNTER, W.B.P.R.M.; OI, D.H; SHAPIRO, A.M; WILLIAMS, D.F. 2004. A picorna-like virus from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*: initial discovery, genome sequence, and characterization. **Virology** 328:151-157.
- VAN ARNAM, E.B.; CURRIE, C.R.; CLARDY, J. 2018. Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses. **Chemical Society Reviews** 47(5): 1638-1651.
- VANDAME, R.; COLIN, M.E.; MORAND, S.; OTERO-COLINA, G. 2000. Levels of compatibility in a new host-parasite association: *Apis mellifera* / *Varroa jacobsoni*. **Canadian Journal of Zoology** 78(11): 2037-2044.
- VANDAME, R.; MORAND, S.; COLIN, M.E.; BELZUNCES, L.P. 2002. Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. **Apidologie** 33: 433-445.
- vanDENBERG, J. D. 1992. Bioassay of the chalkbrood fungus *Ascosphaera aggregata* on larvae of the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*. **Journal of Invertebrate Pathology** 60(2): 159-163.
- vanENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B.K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS ONE** v. 4(8): 6481.
- VENTURIERI, G.C.; ALVES, D.A.; VILLAS-BÔAS, J.K.; de CARVALHO, C.A.L.; MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F.A.L.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2012. Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In: Imperatriz-Fonseca, V.L.; Canhos, D.A.; Alves, D.A.; Saraiva, A.M. (Org.). **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. EDUSP: 349-360.
- WIEGERS F.P. 1988. Transmission of honeybee viruses by *Varroa jacobsoni* Oud. In: CAVALLORO R.; BALKEMA A.A. (eds). **European research on varroa control** Rotterdam, 99-104.
- WILSON-RICH, N.; SPIVAK, M.; FEFFERMAN, N. H.; STARKS, P.T. 2009. Genetic, Individual and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. **Annual Review of Entomology** 54: 405-23.
- WILSON, M.B.; BRINKMAN, D.; SPIVAK, M.; GARDNER, G.; COHEN, J.D. 2015. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 1244: 4-50.
- WILSON, M.B.; PAWLUS, A.D.; BRINKMAN, D.; GARDNER, G.; HEGEMAN, A.D.; SPIVAK, M; COHEN, J.D. 2017. 3-Acyl dihydroflavonols from poplar resins collected by honey bees are active against the bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. **Phytochemistry** 138, 83-92.
- WINSTON, M. L. 1991. **The biology of the honey bee**. Harvard University Press.

- YANG, X.; COX-FOSTER, D. 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. **Parasitology** 134(3): 405.
- YOUSSEF, I.; SCHURR, F.; GOULET, A.; COUGOULE, N.; RIBIÈRE-CHABERT, M.; DARBON, H.; E DUBOIS, E. 2015. RNA 1 and RNA 2 Genomic Segments of Chronic Bee Paralysis Virus Are Infectious and Induce Chronic Bee Paralysis Disease. **Journal of Immunology Research** 423493
- YUE, C.; GENERSCH, E. 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). **Journal of General Virology** 86(12): 3419-3424.
- YUE, C.S.M.; BIENEFELD, K.; GENERSCH, E. 2006. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones. **Journal Invertebrate Pathology** 92: 105-108.
- ZHANG, X.H.E.S.Y.; EVANS, J.D.; PETTIS, J.S.; YIN, G.F.; CHEN, Y.P. 2012. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. **Journal of Invertebrate Pathology** 109(1): 156-159.
- ZHANG, Z. 1997. Biology and ecology of trombidid mites. **Experimental and Applied Acarology** 22: 139-155.