

ALTA OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA REALEIRA NEGRA EM ABELHAS AFRICANIZADAS NO SUL DO BRASIL

DOMITILA BRZOSKOWSKI CHAGAS¹; **FRANCIELLE LIZ MONTEIRO²**; **LARIANE DA SILVA BARCELOS²**; **ALICE SILVEIRA BECKER²**; **MATHEUS IURI FRÜHAUF²**; **GEFERSON FISCHER³**

¹*Universidade Federal de Pelotas – chagas.domitila@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – franciellemonteiro09@gmail.com, larianebarcelos@gmail.com, asilveirabecker@gmail.com, matheus.fruhauf@outlook.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Os vírus afetam a saúde das abelhas e causam perdas econômicas na indústria apícola (McMAHON et al., 2016). Até o momento, aproximadamente 24 vírus foram identificados em abelhas (De MIRANDA et al., 2013; REMMANT, 2017). O vírus da realeira negra (*Black queen cell virus* - BQCV) é um vírus não envelopado, de genoma RNA de cadeia positiva de 9,5kb, pertencente ao gênero *Triatovirus* e à família *Dicistroviridae* (SPURNY et al., 2017). Originalmente foi isolado em amostras de pupas de rainhas decompostas com manchas pretas, dando-lhe o nome de "realéira negra" (De MIRANDA et al., 2013). Atualmente, é um dos vírus de abelhas mais comuns e abundantes em todo o mundo (GAJGER et al., 2014; ROBERTS et al., 2017; MOHARRAMI & MODIRROUSTA, 2018). No entanto, poucos relatos de infecções virais em abelhas são descritos no Brasil (TEIXEIRA et al., 2008).

Os principais sinais clínicos do BQCV ocorrem nas larvas, que apresentam uma aparência amarela e um tegumento duro e áspero, na fase inicial da infecção (De MIRANDA et al., 2013). Embora apenas as larvas sejam visivelmente afetadas por esta doença, os adultos também podem ser infectados, mas de forma assintomática (De MIRANDA et al., 2013; MUZ & MUZ, 2017). A transmissão do BQCV ocorre principalmente pela via fecal-oral (ONGUS et al., 2017). Tem sido relatada a replicação ativa do vírus em zangões e a transmissão pelo sêmen (ALGER et al., 2019; PRODELALOVÁ et al., 2019). O BQCV está amplamente associado ao fungo *Nosema* sp., um parasita intestinal de abelhas que causa a Nosemose, sendo que há evidências de que a coinfecção resulta em aumento da mortalidade de abelhas (FURST et al., 2014).

Neste estudo, relatamos a alta ocorrência de BQCV em apiários no Sul do Brasil. O Rio Grande do Sul (RS) é o maior produtor apícola do país e responde por 15% da produção brasileira de mel. Nos últimos anos, extensas perdas de colônias e declínio populacional de abelhas foram relatados na região. Diversos fatores podem contribuir para essas perdas, dentre elas diferentes tipos de patógenos, incluindo os vírus.

2. METODOLOGIA

Amostras foram coletadas de 13 apiários (66 colônias) de *Apis mellifera* (abelhas africanizadas), localizadas nos municípios de Piratini, Canguçu e Arroio do Padre, no Sul do Brasil. As amostras foram coletadas durante os meses de abril a junho de 2019. Para obter as larvas e pupas, foi retirado cerca de 10 cm² do favo de

cada colônia. Abelhas adultas (≥ 20) foram coletadas em potes. Todas as amostras foram mantidas refrigeradas durante o transporte. No Laboratório de Imunologia e Virologia da Universidade Federal de Pelotas (LabVir/UFPel), as larvas e pupas foram removidas do favo, homogeneizadas com 1mL do reagente TRIzol[®] (Thermo Fisher) e congeladas a -70°C. Os potes contendo as abelhas adultas foram imediatamente congelados a -70°C. Posteriormente, apenas o abdômen das abelhas adultas foi utilizado para a extração de RNA. Após a extração, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit iScriptTM (Bio-Rad). O cDNA foi submetido ao ensaio de PCR para o gene da proteína do capsídeo, utilizando os primers BQCV_11: 5'-AGTGGCGGAGATGTATGC-3' e BQCV_12: 5'GGAGGTGAAGTGGCTATATC-3' (TSEVEGMID et al., 2016). O produto amplificado foi de 294pb.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L, utilizando 100-200ng de cDNA, 1x GoTaq[®] Master Mix Colorless (Promega) e 0,4 μ M de cada primer. As condições foram: 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94, 55 e 72°C por 30, 30 e 40 segundos, respectivamente, e 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados utilizando eletroforese em gel de agarose 2%. Todas as amostras de cDNA foram testadas com o controle endógeno (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH) (SCHARLAKEN et al. 2008) para verificar a eficiência de todo o processo. O RNA extraído de um pool de abelhas foi usado como controle negativo e o gBlock[®] Gene Fragment (Integrated DNA Technologies) foi usado como controle do BQCV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O BQCV foi identificado em 37,9% (26/66) das colônias de *Apis mellifera* coletadas em 13 apiários do Sul do Brasil. O maior número de colônias positivas foi observado no município de Canguçu (16/32 - 50%), seguido por Arroio do Padre (6/18 - 33,3%) e Piratini (3/16 - 18,7%). A presença de RNA viral foi identificada apenas em amostras de abelhas adultas. No Brasil, em 2007, o BQCV foi detectado em 37% das abelhas coletadas em 10 apiários da região Sudeste do país (TEIXEIRA et al., 2008).

Estudos em outros países também demonstraram a alta ocorrência de BQCV em abelhas adultas, 29,3% na Croácia (GAJGER et al., 2014), 65% na Austrália (ROBERTS et al., 2017) e 25,6% no Irã (MOHARRAMI & MODIRROUSTA 2018). Na França, amostras coletadas em apiários durante a primavera, verão e outono, o BQCV foi detectado em abelhas adultas em 86% dos apiários (TENTCHEVA et al., 2004). Vargas et al. (2017) demonstraram uma maior ocorrência de BQCV na primavera-verão, considerando o ciclo de *Nosema*. Além disso, Furst et al. (2014) demonstraram que a associação de *Nosema* sp. e o BQCV causa um aumento na mortalidade de abelhas. *Nosema* sp. tem alta ocorrência na região Sul do Brasil, o que pode estar associado ao elevado número de amostras positivas para o BQCV relatada neste estudo.

Em contraste aos dados comumente observados na literatura, Shumkova et al. (2018) detectou apenas um caso de BQCV na Bulgária. Na Argentina, apenas 8% das amostras foram positivas para o vírus (MOLINERI et al., 2017). Esses dados demonstram que, embora a alta ocorrência de BQCV seja frequentemente relatada, a presença desse vírus pode ser menor em alguns locais, o que reforça a importância de estudos em diferentes regiões do mundo, especialmente no Brasil, onde os estudos sobre os vírus de abelhas são escassos (TEIXEIRA et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

O BQCV apresenta elevada ocorrência no Sul do Brasil, o que pode resultar, dentre outros fatores, na perda de colônias e declínio populacional das abelhas. Assim, nossos achados incluem informações importantes sobre o BQCV na região Sul do Brasil, e certamente contribuirão para o conhecimento da epidemiologia desse vírus. Mais estudos estão sendo realizados para verificar a relação entre o BQCV e o fungo *Nosema* sp.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGER, S.A.; BURNHAM, A., BONCRISTIANI, H.F.; BRODY, A.K. RNA virus spillover from managed honeybees (*Apis mellifera*) to wild bumblebees (*Bombus* spp.). **PLoS ONE**. 14, e0217822, 2019.

De MIRANDA, J. R.; BAILEY, B., BALL, V.B.; BLANCHARD, G.; BUDGE, G.E. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. **Journal Apicultural Research**, 52, 1-56, 2013.

FÜRST, M.A.; MCMAHON, D.P.; OSBORNE, J.L.; PAXTON, R.J.; BROWN, M.J. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. **Nature**. 506, 364–366, 2014.

GAJGER, I.T.; KOLODZIEJEK, J.; BAKONYI, T.; NOWOTNY, N. Prevalence and distribution patterns of seven different honeybee viruses in diseased colonies: a case study from Croatia. **Apidologie**. 45, 701-706, 2014.

McMAHON, D.P; WILFERT, L.; PAXTON, J.R.; BROWN, M.J. Emerging viruses in bees: from molecules to ecology. **Advances Virus Research**, 101, 251-291, 2018.

MOHARRAMI, M.; MODIRROUSTA, H. Molecular identification of six honeybee viruses in Iranian apiaries. **Archives of Razi Institute**, 73, 311-318, 2018.

MOLINERI, A.; GIACOBINO, A.; PACINI, A.; BULACIO, C.A.; FONDEVILA, N.; FERRUFINO, C.; MERKE, J.; ORELLANO, E.; BERTOZZI, E.; MASCIÁNGELO, G.; PIETRONAVE, H.; SIGNORINI, M. Risk factors for the presence of *Deformed wing virus* and *Acute paralysis virus* under temperate and subtropical climate in Argentinian bee colonies. **Preventive Veterinary Medice**, 140, 106-115, 2017.

MUZ, D.; MUZ, M.N. A molecular epidemiological study of black queen cell virus in honeybees (*Apis mellifera*) of Turkey: the first genetic characterization and phylogenetic analysis of field viruses. **Apidologie**. 49, 89–100, 2017.

ONGUS, J. R.; FOMBONG, A.T.; IRUNGU, J.; MASIGA, D.; RAINA, S. Prevalence of common honey bee pathogens at selected apiaries in Kenya, 2013/2014. **International Journal of Tropical Insect Science**, 38, 58-70, 2017.

PRODELALOVÁ, J.; MOUTELÍKOVÁ, R.; TIT'ERA, D. Multiple virus infections in western honeybee (*Apis mellifera* L.) ejaculate used for instrumental insemination. **Viruses**. 11, 306, 2019.

REMNANT, E.; SHI, M.; BUCHMANN, G.; BLACQUIÈRE, T.; HOLMES, E.C., BEEKMAN, M.; ASHE, A. A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. **Journal of Virology**, 91, e00158-17, 2017.

ROBERTS, M.K.J.; ANDERSON, D.L.; DURR, A.P. Absence of deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses. **Scientific Reports**, 7, 6925, 2017.

SCHARLAKEN, B.; DE GRAAF, D.C.; GOOSSENS, K.; BRUNAIN, M.; PEELMAN, L.J.; JACOBS, F.J. Reference gene selection for insect expression studies using Quantitative real-time PCR: the head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. **Journal of Insect Science**, 8, 33, 2008.

SHUMKOVA, R.; NEOV, B.; SIRAKOVA, D.; GEORGIEVA, A.; GADJEV, D.; TEOFANOVA, D.; RADOSLAVOV, G.; BOUGA, M.; HRISTOV, P. Molecular detection and phylogenetic assessment of six honeybee viruses in *Apis mellifera* L. colonies in Bulgaria. **PeerJ**, 20, e5077, 2018.

SPURNY, R.; PRÝDAL, A.; PÁLKOVÁ, L KIEM, H.K.T.; De MIRANDA, J.; PLEVKA, P. Virion structure of *black queen cell virus*, a common honey bee pathogen. **Journal of Virology**, 91, e02100-16, 2017.

TEIXEIRA, E.W.; CHEN, Y.; MESSAGE, D.; PETTIS, J.; EVANS, D.J. Virus infection in Brazilian honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, 99, 117- 119, 2008.

TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; ZAPPULLA, N.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; COLIN, M.E.; BERGOIN, M. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 7185–7191, 2004.

TSVEGMID, K.; NEUMANN, P.; YAÑEZ, O. The honey bee pathosphere of Mongolia: European viruses in Central Asia. **PLoS ONE**, 11, e0151164, 2016.

VARGAS, M.; ARISMENDI, N.; RIVEROS, G.; ZAPATA, N.; BRUNA, A.; VIDAL, M.; RODRÍGUEZ, M.; GERDING, M. Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. **Chilean Journal of Agricultural Research**, 77, 243-249, 2017.