

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL – UERGS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, ÊNFASE EM BIOLOGIA
MARINHA E COSTEIRA**

LUCIANO CESAR POZZOBON

**CARACTERIZAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE UM DICISTROVÍRUS NA ABELHA
SEM FERRÃO MANDAÇAIA (*Melipona quadrifasciata* Lepeleiter, 1836)**

**IMBÉ
2021**

LUCIANO CESAR POZZOBON

**CARACTERIZAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE UM DICISTROVÍRUS NA ABELHA
SEM FERRÃO MANDAÇAIA (*Melipona quadrifasciata* Lepeleiter, 1836)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em convênio com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.^a Dra. Karen Luisa Haag
Orientador: Prof. Dr. Enéas Ricardo Konzen

IMBÉ
2021

CIP - Catalogação na Publicação

Pozzobon, Luciano Cesar
CARACTERIZAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE UM DICISTROVÍRUS
NA ABELHA SEM FERRÃO MANDAÇAIA (Melipona
quadrifasciata Lepeleiter, 1836) / Luciano Cesar
Pozzobon. -- 2021.
33 f.
Orientadores: Karen Luisa Haag, Enéas Ricardo
Konzen.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia
Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Melipona quadrifasciata. 2. Transmissão viral.
3. Dicistrovirus. 4. MqVlb. I. Haag, Karen Luisa,
orient. II. Konzen, Enéas Ricardo, orient. III.
Título.

LUCIANO CESAR POZZOBON

**CARACTERIZAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE UM DICISTROVÍRUS NA ABELHA
SEM FERRÃO MANDAÇAIA (*Melipona quadrifasciata* Lepeleiter, 1836)**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em convênio com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.^a Dra. Karen Luisa Haag
Orientador: Prof. Dr. Enéas Ricardo Konzen

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lílian Caesar,
Indiana University

Dr. Marcos Regueira,
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dra. Ester Wolff Loitzenbauer
Coordenadora da atividade
Trabalho de conclusão II – CBM

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Luciano e Jaciani, por terem me proporcionado o suporte e o amor necessário para que a realização do meu sonho de cursar ciências biológicas fosse possível.

Ao meu irmão Ricardo por ter sido um grande parceiro em todos os momentos compartilhados.

A toda minha família pelo amor, apoio e incentivo ao decorrer desses últimos anos.

Agradeço à minha mãe e suas amigas biólogas por terem me influenciado a gostar de biologia desde minha infância e por todo o carinho que recebi.

Aos meus amigos de longa data por compartilharem momentos de alegria e também de frustrações. Em especial as gurias do “Clube das Winx” e a Maria Eduarda por estarem presentes sempre que precisei.

A todos os amigos que realizei durante a faculdade, com os quais compartilhei diversos momentos incríveis em saídas de campos, grupos de estudo e rodas de chimarrão. Principalmente aos amigos da turma 10 que me receberam com muito carinho.

Aos meus orientadores, Karen Luisa Haag e Enéas Ricardo Konzen, pelos seus ensinamentos, paciência, amizade e por terem confiança no meu trabalho.

Aos colegas do departamento de genética (IB/UFRGS) que me auxiliaram durante os experimentos.

Às instituições públicas e ao povo brasileiro por proporcionarem uma educação gratuita e de qualidade.

RESUMO

Melipona quadrifasciata é uma abelha sem ferrão nativa do Brasil, chamada popularmente de “mandaçaia”. Uma doença acomete esta espécie todos os anos no final de março em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, conhecida pelos meliponicultores como “mal de março”. Diversos fatores estão relacionados à síndrome anual da mandaçaia, que ocasionam a queda da imunidade dos indivíduos. As abelhas adultas são encontradas rastejando com a probóscide evertida, com sintomas de paralisia ou mortas no interior ou no entorno da colônia. Dentre os vírus que infectam as mandaçaia, o vírus da família *Dicistroviridae Melipona quadrifasciata Virus 1 b* (MqV1b) é encontrado em indivíduos da cidade de Boqueirão do Leão (RS), local onde também foram detectados sintomas em mandaçaia. Sintomas similares são relatados em abelhas *Apis mellifera* infectadas pelos vírus *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV) e *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV), da mesma família. O propósito deste estudo foi caracterizar o mecanismo de transmissão viral do vírus MqV1b entre os estágios de desenvolvimento da abelha mandaçaia e o papel dos recursos alimentares na transmissão horizontal. Uma colônia de *M. quadrifasciata* foi coletada na cidade de Boqueirão do Leão (RS), a qual se encontrava debilitada, apresentando sintomas característicos do “mal de março”. Extraiu-se RNA de 47 amostras representando todos os estágios de desenvolvimento da mandaçaia, bem como o mel e pólen estocados na colônia. A detecção do vírus MqV1b foi executada por PCR. Todos os estágios de desenvolvimento apresentaram infecção viral (29 de 45 amostras) e o vírus esteve presente no mel e no pólen estocados na colônia. A transmissão do vírus MqV1b pode ocorrer horizontalmente entre as abelhas adultas, provavelmente por trofalaxia e pela ingestão do mel e pólen estocados. Outro mecanismo de transmissão horizontal pode acontecer por meio do alimento larval, em que as abelhas nutrizas transferem partículas virais para a prole em desenvolvimento. Além disso, a rainha pode transmitir o vírus verticalmente depositando ovos com partículas do vírus MqV1b e causando a infecção da prole. Desta forma, colônias de mandaçaia acometidas pelo “mal de março” estão suscetíveis a infecções virais que podem agravar a síndrome e ocasionar o colapso da colônia. A presença do vírus MqV1b nos potes de mel e pólen estocados é um mecanismo de permanência do vírus na colônia, representando uma fonte recorrente de transmissão horizontal.

Palavras-chave: Dicistrovírus. *Melipona quadrifasciata*. MqV1b. Transmissão viral.

ABSTRACT

Melipona quadrifasciata is a stingless bee native to Brazil, popularly known as “mandaçaia”. A disease affects this species every year at the end of March in Santa Catarina and Rio Grande do Sul, known by beekeepers as “evil of March”. Several factors are related to the annual mandaçaia syndrome, which causes a decrease in the immunity of individuals. Adult bees are found crawling with the everted proboscis, showing symptoms of paralysis or dead inside or nearby the colony. Among the viruses that infect *Melipona quadrifasciata*, a virus from the *Dicistroviridae* family *Melipona quadrifasciata Virus 1 b* (MqV1b) is found in individuals from the city of Boqueirão do Leão (RS), the same place where symptoms were detected in mandaçaia stingless bees. Similar symptoms have been reported for *Apis mellifera* infected by the *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV) and *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV) viruses from the same family. The purpose of this study is to characterize the transmission mechanism of the MqV1b virus between developmental stages of *Melipona quadrifasciata* and the role of food resources in horizontal transmission. One weakened colony of *M. quadrifasciata* showing symptoms of the “evil of March” was collected in the city of Boqueirão do Leão (RS). RNA was extracted from 47 samples representing all developmental stages as well as honey and pollen resources stored inside the colony. The detection of MqV1b virus was performed by PCR. All developmental stages showed viral infection (29 out of 45 samples), and the virus was present also in the honey and pollen stored inside the colony. Viral transmission of MqV1b occurs horizontally among adult bees, probably by trophalaxis and by feeding on stored resources. Another mechanism of horizontal transmission takes place through the larval food, by which adult bees transmit viral particles to the developing offspring. Moreover, the queen may transmit the virus vertically to the offspring, by lay eggs containing MqV1b particles. Thus, mandaçaia colonies affected by the "evil of March" disease are susceptible to viral infections that may aggravate the syndrome and cause the colony to collapse. The presence of MqV1b virus in the stored honey and pollen pots constitutes a persistence mechanism, representing a recurrent source of horizontal virus transmission.

Keywords: Dicistrovirus. *Melipona quadrifasciata*. MqV1b. Stingless bee. Viral transmission.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Abelhas mandaia mortas dentro da colônia e no chão, próximo a colônia	11
Figura 2 – Representação dos vírus da família <i>Dicistroviridae</i>	12
Figura 3 – Representação dos mecanismos de transmissão vertical e horizontal em <i>Apis mellifera</i>	14
Figura 4 - Área de ocorrência e local de coleta dos indivíduos de <i>M. quadrifasciata</i>	17
Figura 5 – Número de amostras positivas para o gene <i>rps5</i> e para o vírus MqV1b nos estágios de desenvolvimento de <i>M. quadrifasciata</i>	20
Figura 6 - Perfis eletroforéticos exemplificando a detecção do vírus MqV1b nos estágios de desenvolvimento de <i>M. quadrifasciata</i>	21
Figura 7 - Perfis eletroforéticos exemplificando a detecção do vírus MqV1b no mel e pólen estocados na colônia de <i>M. quadrifasciata</i>	21
Figura 8 – Perfis eletroforéticos exemplificando a detecção do gene endógeno <i>rps5</i> nos estágios de desenvolvimento de <i>M. quadrifasciata</i>	22
Figura 9 – Representação das possíveis formas de transmissão para a prole de <i>M. quadrifasciata</i>	25
Figura 10 – Representação de pote de pólen e de mel estocados com <i>M. quadrifasciata</i> se alimentando	26
Figura 11 – Representação de trofalaxia entre abelhas mandaia	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 TRANSMISSÃO VIRAL.....	13
1.2 OBJETIVOS.....	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos específicos.....	16
2 METODOLOGIA.....	17
2.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	17
2.2 EXTRAÇÃO DE RNA.....	17
2.3 DETECÇÃO DO VÍRUS POR PCR.....	19
4 RESULTADOS	20
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Melipona quadrifasciata, conhecida popularmente como mandaçaia, é uma abelha sem ferrão da tribo Miliponini (CAMARGO e PEDRO, 2013). O seu corpo é robusto e apresenta quatro listras amarelas no dorso do abdômen (BATALHA-FILHO *et al.*, 2009). Como método de coleta do pólen, as abelhas mandaçaias realizam uma vibração sobre as anteras das flores com os músculos torácicos (HARTER *et al.*, 2002; SILVA; HRNCIR; FONSECA, 2010). Sendo muito eficazes para a polinização de tomate, em que a *M. quadrifasciata* é mais eficiente que a *Apis mellifera* Linnaeus 1758 (SANTOS *et al.*, 2009).

A mandaçaia é a segunda abelha sem ferrão nativa mais cultivada no Brasil, seguindo apenas a *Tetragonisca angustula* (Latreille 1811) (nome comum: jataí) (JAFFÉ *et al.*, 2015). Na pesquisa realizada com 251 meliponicultores de 20 regiões do Brasil, 13 das 19 espécies cultivadas pertencem ao gênero *Melipona* Illiger, 1806 (JAFFÉ *et al.*, 2015). Os meliponicultores utilizam os produtos das colônias para consumo próprio, venda de mel e venda de colônias. As abelhas nativas também são utilizadas para a polinização de cultivares agrícolas (SLAA *et al.*, 2006).

A área de ocorrência da mandaçaia no Brasil abrange os estados desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul, incluindo a região das missões no Paraguai e na Argentina (CAMARGO e PEDRO, 2013). No Brasil, os meliponicultores observaram uma redução populacional das abelhas nativas nos últimos 50 anos (JAFFÉ *et al.*, 2015). No estado do Rio Grande do Sul a *M. quadrifasciata* está ameaçada de extinção, classificada como em perigo (EN = “endangered”) (RIO GRANDE DO SUL, 2014).

Todos os anos, no final do verão, colônias de mandaçaias de diversos meliponicultores no Rio Grande do Sul e Santa Catarina são afetadas sincronicamente por uma síndrome que eventualmente as leva ao colapso (Figura 1). Observa-se que as abelhas operárias se tornam incapazes de voar, rastejam com a probóscide evertida, apresentam tremores e paralisia, além da alta taxa de mortalidade na colônia (CAESAR *et al.*, 2020; DÍAZ *et al.*, 2017). Essa síndrome é conhecida como “mal de março”. Estudos caracterizando a microbiota das abelhas saudáveis e doentes não encontraram diferenças consistentes na composição da comunidade bacteriana, e não implicaram nenhuma bactéria ou outro patógeno como agente causador da síndrome (DÍAZ *et al.*, 2017).

Figura 1– Abelhas mandaçaia mortas dentro da colônia e no chão, próximo a colônia



Fonte: Caesar (2020)

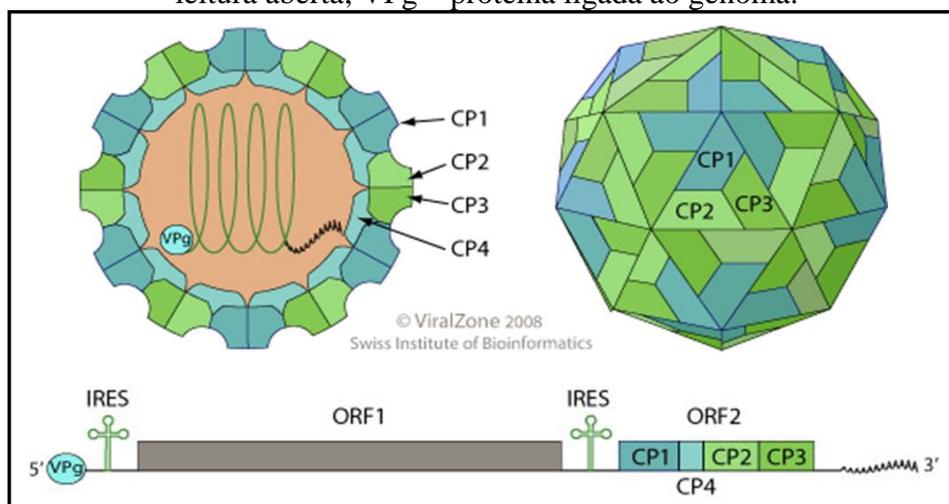
A partir de estudo prévio, verificou-se que no período que antecede a síndrome (janeiro a março), as colônias de mandaçaia debilitadas apresentaram um aumento na umidade e uma baixa da temperatura interna do ninho (CAESAR *et al.*, 2020). No mesmo período, as abelhas forrageiras apresentaram uma redução constante da sua massa corporal, e a composição do pólen estocado da colônia alterou de Myrtaceae para, principalmente, *Mimosa bimucronata* (De Candolle) Otto Kuntze. Evidenciou-se que os genes ligados às respostas metabólicas da imunidade, nutrição e ao metabolismo xenobiótico foram inibidos, provavelmente por agroquímicos (CAESAR *et al.*, 2020). Assim sendo, a síndrome anual da mandaçaia pode ocorrer por diversos fatores externos que são subletais aos indivíduos e afetam o sistema imune das abelhas (CAESAR *et al.*, 2020).

Ademais, a caracterização de viromas de mandaçaias doentes e saudáveis, com amostras de Boqueirão do Leão (RS), permitiu identificar alguns novos vírus em *M. quadrifasciata*. Sendo que os vírus *Melipona quadrifasciata cyclovirus* (MqC) (família: *Circoviridae*), *Melipona quadrifasciata densovirus* (MqD) (família: *Parvoviridae*) e *Melipona quadrifasciata vírus 1a* (MqV1a) (família: *Dicistroviridae*) apresentaram a maior associação a abelhas doentes, embora tenham sido encontrados também em abelhas saudáveis (CAESAR *et al.*, 2019). Caesar *et al.* (2019) não encontraram relações diretas das viroses com a síndrome anual da mandaçaia, porém a alta prevalência do vírus indica que os vírus são oportunistas e podem aumentar a mortalidade de indivíduos.

Os vírus da família *Dicistroviridae* (Figura 2) são caracterizados por apresentarem uma cadeia unifilamentar de RNA positiva, com capsídeo e sem envelope. O material genético dos vírus apresenta duas fases de leitura aberta (ORF) separadas por uma região não codificadora (UTR), com dois sítios de entrada do ribossomo (IRES), uma cauda de

adenosina na extremidade 3' do genoma para prevenir degradação, e uma proteína (VPg) na extremidade 5' do genoma (CHEN *et al.*, 2014; DE MIRANDA, *et al.*, 2012). A ORF 1 codifica as proteínas não estruturais, como a VPg, a helicase, a protease, replicase de RNA e um supressor de silenciador de RNA, enquanto que a ORF 2 codifica as proteínas estruturais, ou seja, as proteínas que fazem parte do capsídeo do vírus (CP1, CP2, CP3 e CP4) (BONNING; MILLER, 2010).

Figura 2 – Representação dos vírus da família *Dicistroviridae*. CP1, CP2, CP3 e CP4 – proteínas do capsídeo; IRES - sítios de entrada do ribossomo; ORF1 e ORF2 - fases de leitura aberta; VPg – proteína ligada ao genoma.



Fonte: ViralZone (Swiss Institute of Bioinformatics)

Caesar *et al.* (2019) identificaram dois *contigs* virais da família *Dicistroviridae* no viroma das manducaias, que foram chamados de o MqV1a e MqV1b. O genoma sequenciado do MqV1a corresponde à ORF 1, a qual codifica proteínas não estruturais, apresentando os domínios RNA_dep_RNAP (cd01699) e RNA_helicase (pfam00910), que, respectivamente, correspondem as enzimas replicase de RNA e helicase de RNA. Por outro lado, o genoma parcial do MqV1b corresponde à ORF 2, que codifica proteínas estruturais do capsídeo do vírus, evidenciando os domínios proteicos encontrados RHV_like (cd00205) e Dicistro_CP4 (cl13011), característicos de proteínas do capsídeo de picornavírus/calicivírus e a proteína CP4 de dicistrovírus. Há a possibilidade de as duas sequências virais representarem o mesmo vírus, entretanto as tentativas de conectá-las por PCR não foram eficazes (CAESAR *et al.*, 2019). Representantes de ambas sequências foram encontradas em abelhas doentes nos meliponários de Boqueirão do Leão (RS), mas apenas o vírus MqV1b foi encontrado também em abelhas saudáveis.

Os vírus MqV1a e MqV1b (família: *Dicistroviridae*) identificados por Caesar *et al.* (2019) são filogeneticamente relacionados aos vírus da família *Dicistroviridae* que infectam *A. mellifera* - *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV), *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV) e *Kashmir Bee Virus* (KBV) (CHEN *et al.*, 2012; NAZZI *et al.*, 2012; VANENGELSDORP *et al.*, 2009). Os sintomas da síndrome anual em mandacarias são semelhantes aos sintomas de IAPV e ABPV, em que as abelhas perdem a capacidade de voar e começam a rastejar, por conseguinte apresentam paralisia e em seguida morrem (BAILEY; GIBBS; WOODS, 1963; MAORI *et al.*, 2007). As abelhas infectadas com KBV sofrem de uma morte precoce, não havendo descrição de sintomas em abelhas infectadas (BAILEY; WOODS, 1977; DE MIRANDA *et al.*, 2013).

1.1 TRANSMISSÃO VIRAL

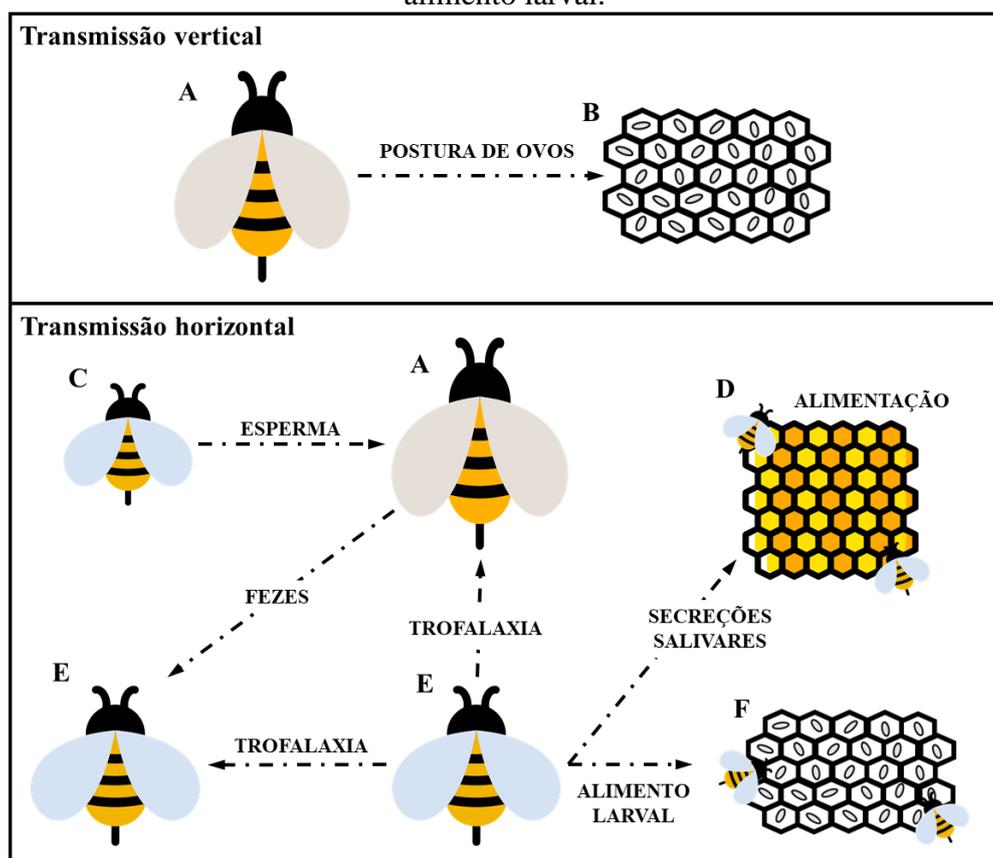
Há mais de 30 vírus conhecidos para *Apis mellifera*, sendo que IAPV, ABPV, KBV, *Black Queen Cell Virus* (BQCV), *Deformed Wing Virus* (DWV) e *Sacbrood Virus* (SBV) apresentam mais estudos por estarem relacionadas à desordem do colapso da colônia (CCD = “Colony Collapse Disorder”) (YAÑEZ *et al.*, 2020). A CCD é caracterizada pelo rápido declínio de abelhas adultas, não sendo evidenciadas abelhas mortas no entorno ou dentro da colônia, levando a tal ao colapso (VANENGELSDORP *et al.*, 2008, 2009). As perdas de colônias devido à CCD podem ocorrer por diversos fatores que agem em conjunto, tais como: viroses, mudanças climáticas, agroquímicos e patógenos (NAZZI *et al.*, 2012; VANENGELSDORP *et al.*, 2009).

A permanência dos vírus em insetos depende da infectividade do vírus e da biologia do hospedeiro (SPARKS; BARTHOLOMAY; BONNING, 2008). O vírus pode permanecer de forma latente nos indivíduos da colônia, ocorrendo a transmissão viral entre eles, mas sem apresentar sintomas (HAILS; BALL; GENERSH, 2008; NAZZI *et al.*, 2012). Fatores externos, como mudanças climáticas e agroquímicos, causam um estresse nas abelhas, resultando numa diminuição da resposta imune do organismo. Com a imunidade do indivíduo baixa, os vírus passam do estado latente para o virulento – maior replicação viral - causando o aumento da taxa de mortalidade e possivelmente o colapso da colônia (HAILS; BALL; GENERSH, 2008; NAZZI *et al.*, 2012; VANENGELSDORP *et al.*, 2008).

A transmissão viral entre os indivíduos de uma colônia pode ocorrer por duas vias, a vertical ou a horizontal. Pelo mecanismo de transmissão vertical, a rainha deposita ovos

com partículas virais (Figura 3). Exemplos de vírus que utilizam essa rota de transmissão na abelha melífera (*A. mellifera*) são o DWV, IAPV, SBV, BQCV, KBV e CBPV (AMIRI *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2014; DE MIRANDA e FRIES, 2008; YUE *et al.*, 2007). A transmissão vertical pode ser transovariana, quando o vírus está presente dentro do ovo, ou *transovum*, em que as partículas virais são transmitidas passivamente na superfície do ovo (AMIRI *et al.*, 2018). Apesar de não haver estudos sobre diferenças entre a capacidade de infecção da prole através dessas duas vias, a *transovum* ocorre com maior frequência (AMIRI *et al.*, 2018). De qualquer maneira a carga viral presente no ovo, bem como a porcentagem de ovos infectados, depende da carga viral presente no ovário da rainha (AMIRI *et al.*, 2018).

Figura 3– Representação dos mecanismos de transmissão vertical e horizontal em *Apis mellifera*. As setas indicam o sentido da transmissão viral. A - abelha rainha; B – células de cria com ovos; C- zangão; D – estoque de mel e pólen com abelhas adultas se alimentando; E – abelha adulta; F – células de cria com abelhas adultas depositando alimento larval.



Fonte: Autor (2021)

A transmissão horizontal do vírus presente nos zangões para a rainha (Figura 3) pode ocorrer durante a copulação mediante o esperma contaminado (AMIRI; MEIXNER;

KRYGER, 2016; YUE *et al.*, 2007). Amiri *et al.* (2016) identificaram a presença do vírus DWV na cabeça, tórax, abdômen, ovário e espermateca das rainhas de *A. mellifera* após terem acasalado naturalmente com zangões infectados para o vírus DWV (transmissão horizontal), e observaram que elas posteriormente depositaram ovos infectados (transmissão vertical).

Os recursos alimentares (mel e pólen) estocados na colônia podem estar contaminados com partículas virais de IAPV, DWV, SBV e KBV (CHEN *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2010). Assim sendo, é provável a transmissão horizontal do vírus pelo compartilhamento do alimento entre as abelhas (Figura 3). Da mesma forma, o mel e o pólen contaminados, que são utilizados para compor o alimento larval, podem infectar as larvas em desenvolvimento (CHEN *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2005). Outra forma de transmissão viral é através das secreções salivares no alimento larval (Figura 3), de modo que a presença do vírus SBV nas glândulas salivares de abelhas operárias e a presença da actina no alimento larval contestam a transmissão do vírus horizontalmente das abelhas adultas para a prole (BAILEY, 1969; SHEN *et al.*, 2005).

A trofalaxia é a transferência do alimento presente no tubo digestivo de um indivíduo para outro. Em abelhas, essa atividade é realizada por adultas para a alimentação da rainha e outras abelhas (CRAILSHEIM, 1998). Para identificar a possibilidade de transmissão horizontal de vírus por trofalaxia, Amiri *et al.* (2019) impediram o acesso de rainhas de *A. mellifera* ao alimento de forma que só pudessem se alimentar através de trofalaxia com abelhas infectadas por IAPV. O estudo constatou que tais rainhas se tornaram positivas para o vírus. No mesmo estudo, as rainhas foram ainda mantidas isoladas do alimento, porém com a opção de receber alimento por trofalaxia de operárias infectadas ou não infectadas com IAPV. Como resultado deste segundo experimento, a maioria das rainhas não foi infectada através da alimentação, sugerindo que a trofalaxia pode ser um meio de transmissão horizontal do vírus, em que as rainhas aparentemente preferem interagir com as abelhas não infectadas (Figura 3). Outra forma de transmissão horizontal, é através da infecção causada pela higienização da colônia. As abelhas que realizam esta atividade são expostas a vírus encontradas nas fezes das rainhas (BQCV, DWV e KBV) e estão sujeitas a infecções virais (CHEN *et al.*, 2006; HUNG, 2000; SHEN *et al.*, 2005).

A transmissão horizontal entre abelhas e outros polinizadores pode acontecer através do compartilhamento de recursos florais. Singh *et al.* (2010) demonstraram que as abelhas forrageiras de *A. mellifera* transportavam para dentro da colônia “pellets” de

pólen com partículas virais (BQCV, DWV e SBV) mesmo quando elas não estavam infectadas, sugerindo que o pólen contaminado pode ser uma forma de entrada dos vírus na colônia. Esse mecanismo de transmissão foi reafirmado em um experimento em que abelhas europeias positivas para IAPV e mamangavas livres do vírus (*Bombus impatiens* Cresson, 1863) foram mantidas na mesma estufa apenas compartilhando recursos florais (SINGH *et al.*, 2010). Por consequência, as abelhas mamangavas se infectaram pelo IAPV, comprovando a ocorrência de transmissão viral entre os indivíduos das distintas espécies através do compartilhamento dos recursos.

Acredita-se que os vírus não atuem diretamente na doença “mal de março” que atinge a abelha mandaçaia. Não obstante, a debilidade do sistema imune das abelhas, causada por fatores subletais, as torna suscetíveis aos vírus oportunistas que agravam a situação da doença, podendo levar a tal ao colapso (CAESAR *et al.*, 2019, 2020). Como a *M. quadrifasciata* é ameaçada de extinção no estado do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2014) e possui importância econômica e cultural no Brasil (JAFFÉ *et al.*, 2015), é de suma importância entendermos melhor a sua ecologia e as simbioses que ocorrem com outros organismos, bem como esclarecer a síndrome anual que afeta esta espécie. Desta forma, será possível aprimorar as ações de manejo para a preservação da abelha mandaçaia.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o mecanismo de transmissão viral, vertical e/ou horizontal, do vírus MqV1b (família: *Dicistroviridae*) em mandaçaia.

1.2.2 Objetivos específicos

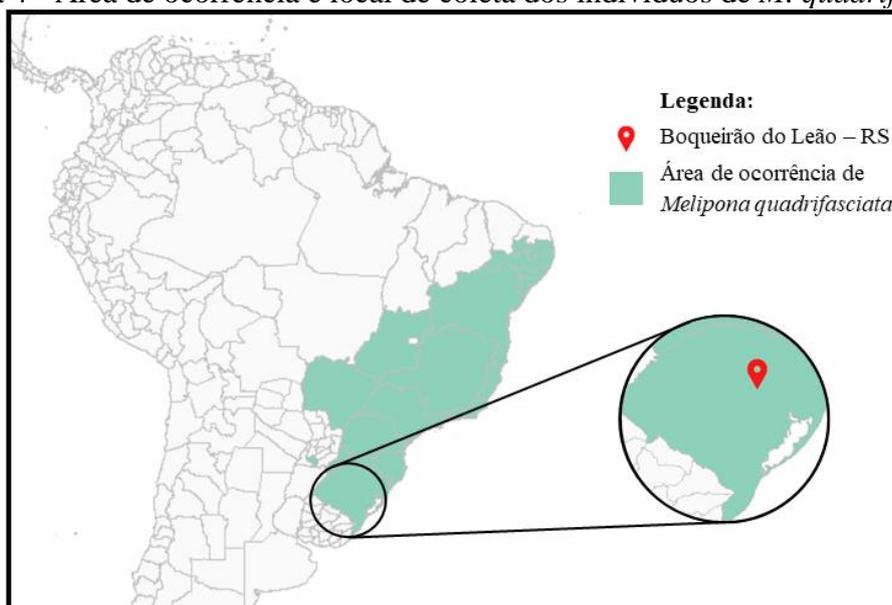
- Averiguar a presença do vírus MqV1b nas fases de desenvolvimento da abelha mandaçaia.
- Verificar a presença do vírus MqV1b no mel e no pólen estocados da colônia.
- Inferir os mecanismos de transmissão do vírus MqV1b nas mandaçaia.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Uma colônia de *M. quadrifasciata* apresentando sintomas do “mal de março” foi coletada em Boqueirão do Leão (RS) (Figura 4) com a autorização do proprietário, no dia 23 de março de 2019. Esta colônia apresentou abelhas adultas com sintomas de paralisia e alta taxa de mortalidade. Seu alto grau de debilidade foi reconhecido pelo meliponicultor como um forte sinal de que poderia entrar em colapso (comunicação pessoal)¹. A abelha rainha, ovos, larvas, pupas, abelhas adultas e abelhas recém-emergidas, bem como o mel e o pólen estocados na colônia, foram coletados. As amostras foram armazenadas à -80°C no Departamento de Genética do Campus do Vale (UFRGS/IB).

Figura 4 - Área de ocorrência e local de coleta dos indivíduos de *M. quadrifasciata*



Fonte: Adaptado de Camargo e Pedro (2013)

2.2 EXTRAÇÃO DE RNA

Extrações de RNA foram realizadas, individualmente, em 23 abelhas adultas, oito abelhas recém-emergidas, abelha rainha, cinco larvas e cinco pupas da colônia de

¹ Informação recebida pelo meliponicultor Valmir Zage durante a coleta da colônia de *Melipona quadrifasciata*.

Boqueirão do Leão (RS), enquanto que os ovos foram homogeneizados em três “pools” contendo sete ovos cada. No total, 45 extrações de RNA foram realizadas para os diferentes estágios de desenvolvimento de *Melipona quadrifasciata*. A superfície corporal dos indivíduos adultos foi lavada com 500µl de PBS 1x (tampão fosfato-salino) para remover partículas virais externas no corpo. Os indivíduos foram homogeneizados por 1min utilizando um pistilo esterilizado em um microtubo de 1,5ml (ambion™) com TRIzol™ Reagent (Invitrogen), e após procedeu-se a extração do RNA de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a extração de RNA de uma amostra de mel e uma amostra de pólen, seguiu-se o protocolo adaptado de Gismondì, Di Marco e Canini (2017). Adicionou-se 100mg de pólen e de 250µl de mel em tubos separados de 2ml (ambion™). Em seguida, acrescentou-se 250µl de tampão de lise (Applied Biosystems) em cada tubo, seguido de incubação à 37°C por uma hora. Posteriormente procedeu-se com a extração de RNA com TRIzol™ Reagent (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Os ácidos nucleicos de todas as amostras foram quantificados por espectrofotometria no equipamento NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Para a remoção de moléculas de DNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com TURBO™ DNase (ambion™) em reação de 50µl, contendo 44µl da amostra em concentração inferior a 200ng.µl⁻¹, 1µl da TURBO DNase e 5µl de tampão de reação 10X. A reação foi incubada por 30min a 37°C. Por fim, a DNase foi desativada com a adição de 1,55µl de EDTA 0,5M, para uma concentração final de 15mM na reação, seguido de uma incubação a 75°C por 10min.

O RNA foi novamente quantificado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), e a sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1%, corado com brometo de etídeo, na qual foi utilizado como marcador de peso molecular o DNA do fago lambda digerido com *HindIII* (Invitrogen™).

A cadeia simples de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada com a enzima High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), seguindo o protocolo do fabricante e utilizando 500ng de RNA em reações de 20µl por amostra, numa concentração final de 25ng.µl⁻¹. A reação ocorreu a 25°C por 10min, 37°C por 120min e 85°C por 5min.

2.3 DETECÇÃO DO VÍRUS POR PCR

Para detectar a presença do vírus MqV1b (Genbank: MH340500.1), os “primers” foram desenhados no programa Primer3 do GeniousR11 (<https://www.geneious.com/>) baseados no genoma do vírus MqV1b (Genbank: GCA_001276565.1), sendo o *MqV1b* F (ACGCATCGCTACAGTTCCTA) e o *MqV1b* R (GCTAGCCCATTTCCAAACGT), que geram um produto de PCR de 130pb (comunicação pessoal)². Para verificar a qualidade do RNA foi amplificado um gene de expressão constitutiva em *M. quadrifasciata* (*rps5* Genbank: MN687947.1), utilizando os primers *rps5* F (ATAATTCACCTGTTGACCGGGG) e *rps5* R (TTACTCGTAGCGGAGAAAC), desenhados no programa Primer3 do GeniousR11 (<https://www.geneious.com/>) baseados no genoma da manduca (Genbank: GCA_001276565.1), que geram um “amplicon” de 148 pb (CAESAR *et al.*, 2020).

As reações de PCR foram realizadas com 0,1µl de Platinum™ *Taq* DNA Polymerase 5U.µl⁻¹ (Invitrogen), tampão para PCR 1X, 3mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 20pmol de cada primer e 250ng de cDNA com um volume total de 25µl. O PCR do vírus MqV1b procedeu-se em uma desnaturação inicial de 2min a 94°C, seguido de 45 ciclos de 30seg a 94°C, 30seg a 56°C e 30seg a 72°C. Similarmente, o ciclo de temperatura para a PCR do gene endógeno *rps5* decorreu em 2min a 94°C, seguido de 45 ciclos de 30seg a 94°C, 30seg a 60°C e 30seg a 72°C. Duas reações extras para o controle positivo e o controle negativo (água ultra destilada) foram adicionadas para cada PCR. Para o vírus MqV1b o controle positivo consistiu em um “amplicon” de fragmentos longos do vírus (comunicação pessoal)³. Já para o gene *rps5*, o controle positivo foram amostras de RNA de abelhas adultas da colônia PA1, criada no Departamento de Genética (IB/UFRGS).

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, em que se adicionou como marcador de peso molecular o 100bp DNA ladder (Ludwig biotecnologia). O vírus MqV1b e o gene *rps5* foram considerados positivos para as amostras que não apresentaram banda no controle negativo e estavam coerentes com o controle positivo.

² Dado fornecido pela Dr^a. Lílian Caesar por troca de mensagens por meio eletrônico.

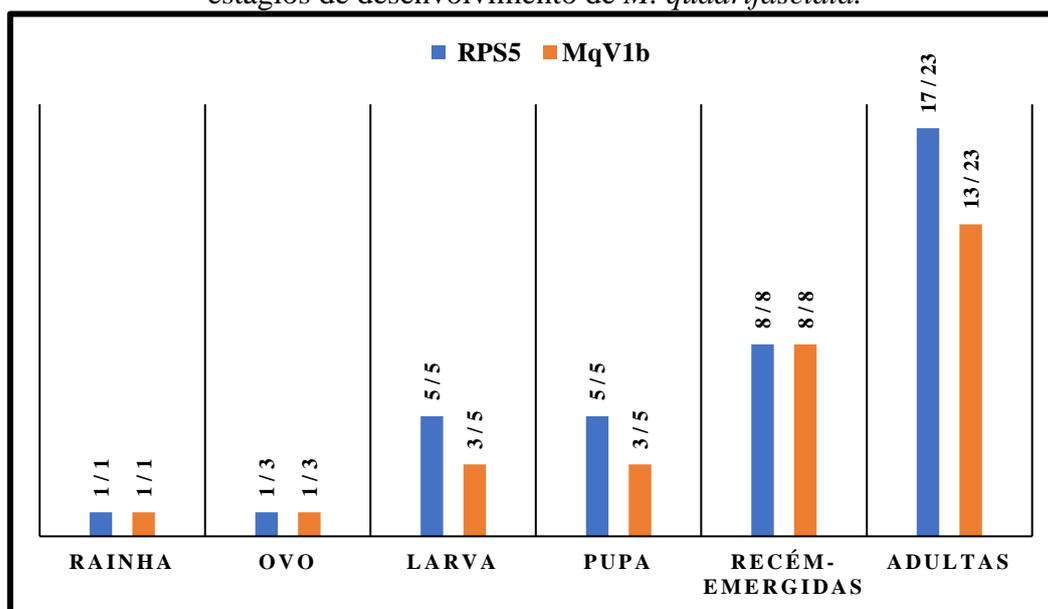
³ Amplicon disponibilizado pelo Laboratório de Genômica Evolutiva e Parasitismo (Departamento de genética/IB/UFRGS).

4 RESULTADOS

O vírus MqV1b foi detectado em todos os estágios de desenvolvimento da abelha manducaia na colônia de Boqueirão do Leão (RS) (Tabela 1), sendo a abelha rainha (1/1), “pool” de ovos (1/3), larvas (3/5), pupas (3/5), abelhas recém-emergidas (8/8) e abelhas adultas (13/23) (Figuras 5 e 6; Tabela 1), totalizando 29 de 45 amostras positivas. Da mesma forma, foi detectado a presença do vírus MqV1b para o mel e para o pólen (Figura 7; Tabela 1).

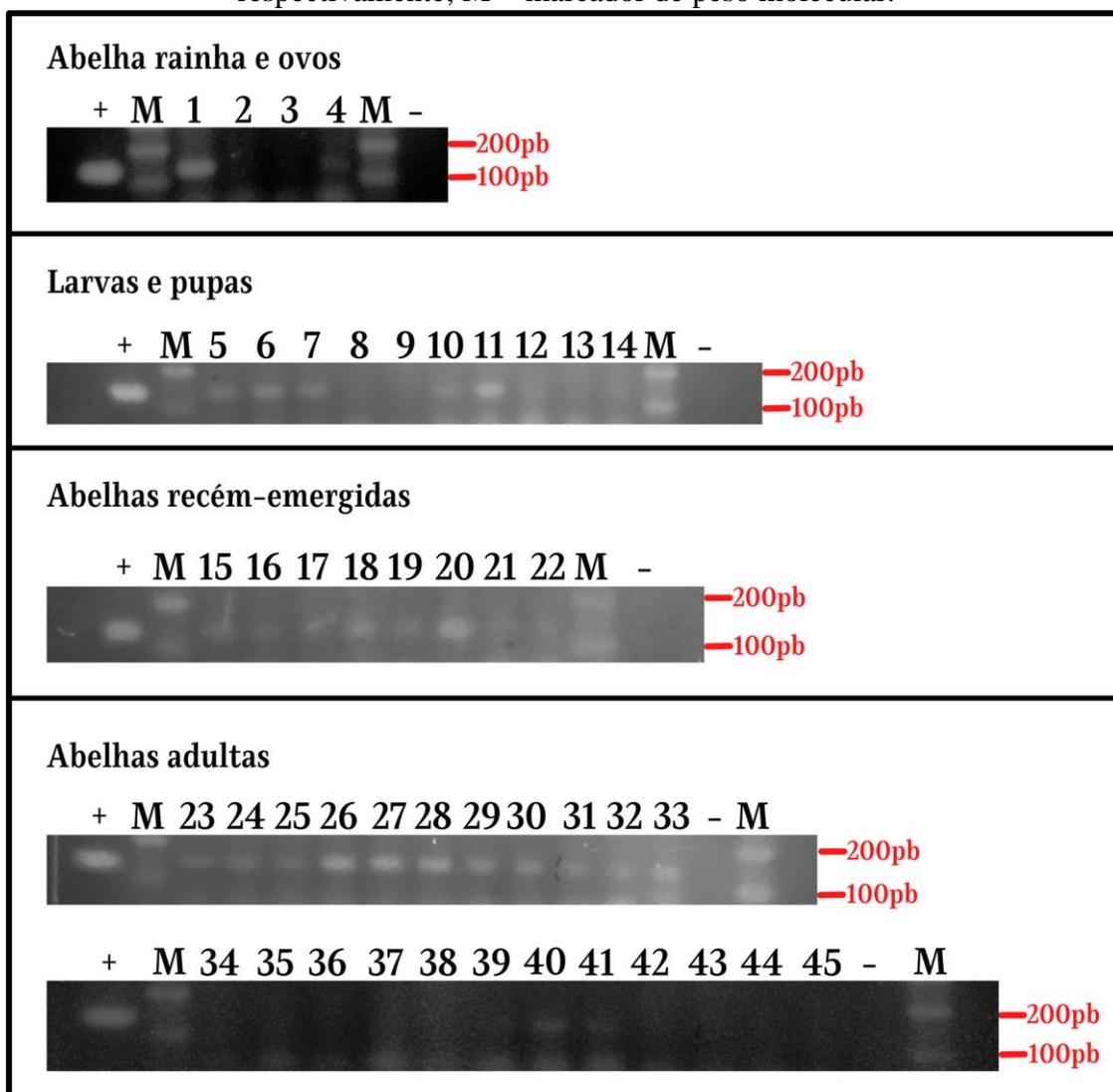
Dentre as 45 amostras dos estágios de desenvolvimento, 37 se mostraram positivas para o gene *rps5* (abelha rainha, um “pool” de ovos, 5 larvas, 5 pupas, 8 abelhas recém-emergidas e 17 abelhas adultas) (Figuras 5 e 8; Tabela 1). Dentre as 8 amostras que se mostraram negativas para o gene *rps5*, 6 eram de abelhas adultas e 2 eram de “pools” de ovos (ovos 1 e 3). Uma vez que o gene *rps5* é de expressão constitutiva, o resultado negativo da PCR para esse gene indica a baixa qualidade do RNA extraído destas amostras. Curiosamente, a PCR de detecção do vírus foi consistente com os resultados da PCR para *rps5* em apenas 4 das 6 abelhas adultas negativas para *rps5* e 1 dos 2 “pools” de ovos negativos para *rps5* (Tabela 1). Por outro lado, detectou-se o vírus MqV1b em duas amostras de abelhas adultas (amostras 18 e 19) bem como na amostra de ovos nº 3, as quais foram negativas para o gene *rps5*.

Figura 5 – Número de amostras positivas para o gene *rps5* e para o vírus MqV1b nos estágios de desenvolvimento de *M. quadrifasciata*.



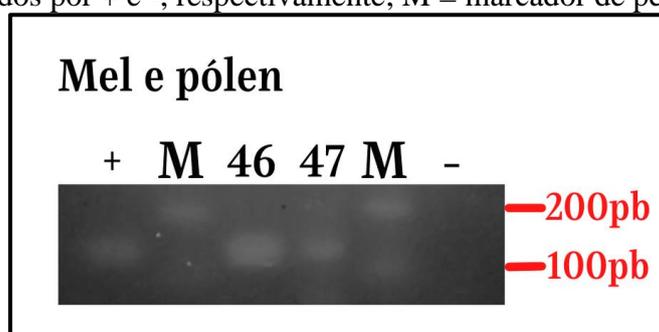
Fonte: Autor (2021)

Figura 6 - Perfis eletroforéticos exemplificando a detecção do vírus MqV1b nos estágios de desenvolvimento de *M. quadrifasciata*. Os números das amostras correspondem aos apresentados na Tabela 1. Controles negativos e positivos estão indicados por + e -, respectivamente; M = marcador de peso molecular.



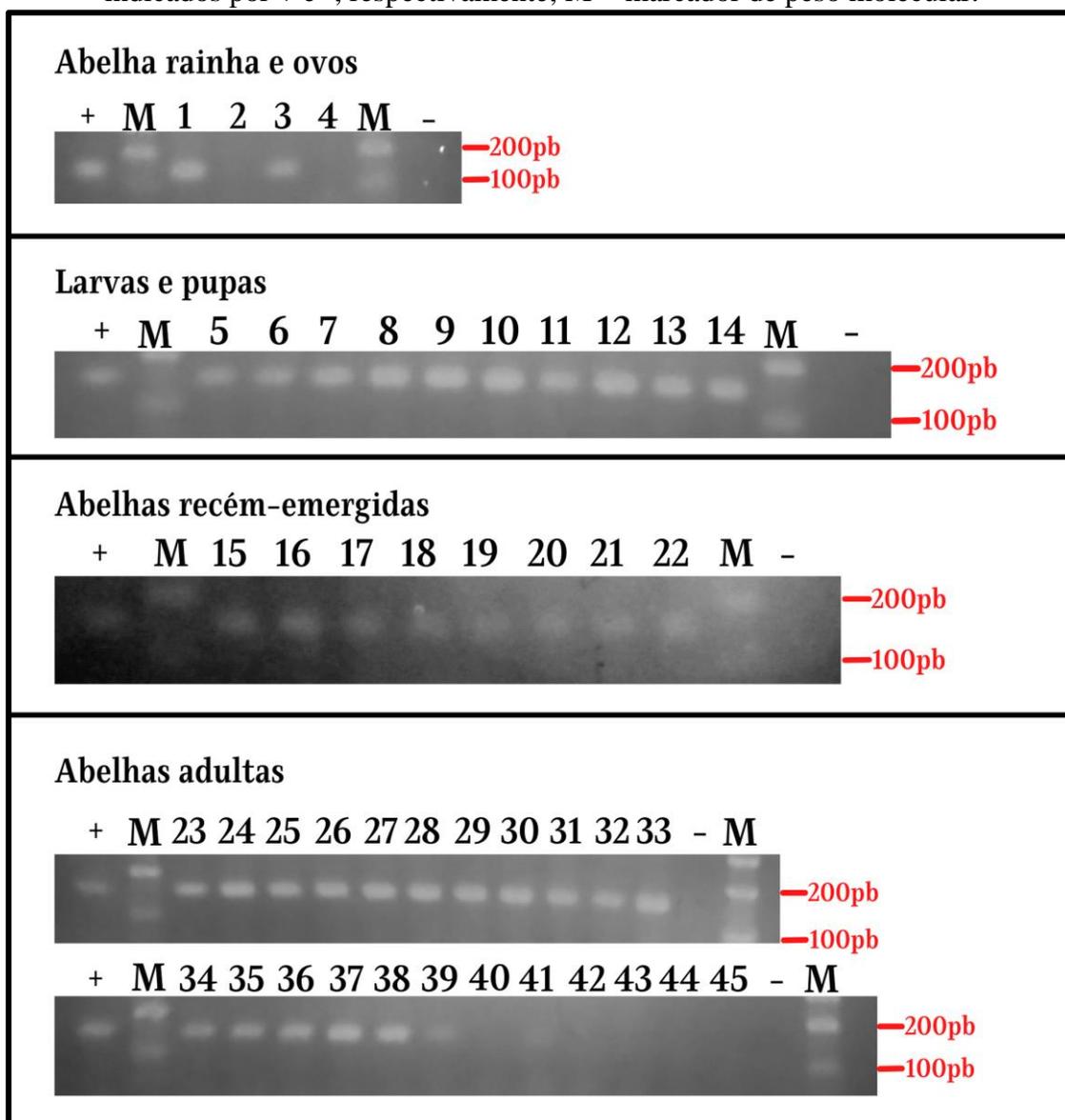
Fonte: Autor (2021)

Figura 7 - Perfis eletroforéticos exemplificando a detecção do vírus MqV1b no mel e pólen estocados na colônia de *M. quadrifasciata*. Os números das amostras correspondem aos apresentados na Tabela 1. Controles negativos e positivos estão indicados por + e -, respectivamente; M = marcador de peso molecular.



Fonte: Autor (2021)

Figura 8 – Perfis eletroforéticos exemplificando a amplificação do gene endógeno *rps5* nos estágios de desenvolvimento de *M. quadrifasciata*. Os números das amostras correspondem aos apresentados na Tabela 1. Controles negativos e positivos estão indicados por + e -, respectivamente; M = marcador de peso molecular.



Fonte: Autor (2021)

Tabela 1– Resultado da PCR para o vírus MqV1b e para o gene endógeno *rps5* nos estágios de desenvolvimento de *M. quadrifasciata*, bem como para o mel e pólen estocados na colônia

NÚMERO	AMOSTRA	<i>rps5</i>	MqV1b
1	Abelha rainha	+	PRESENTE
2	“Pool” de ovos – 1	-	AUSENTE
3	“Pool” de ovos – 2	+	AUSENTE
4	“Pool” de ovos – 3	-	PRESENTE
5	Larva – 1	+	PRESENTE
6	Larva – 2	+	PRESENTE
7	Larva – 3	+	PRESENTE
8	Larva – 4	+	AUSENTE
9	Larva – 5	+	AUSENTE
10	Pupa – 1	+	PRESENTE
11	Pupa – 2	+	PRESENTE
12	Pupa – 3	+	AUSENTE
13	Pupa – 4	+	AUSENTE
14	Pupa – 5	+	PRESENTE
15	Abelha recém-emergida – 1	+	PRESENTE
16	Abelha recém-emergida – 2	+	PRESENTE
17	Abelha recém-emergida – 3	+	PRESENTE
18	Abelha recém-emergida – 4	+	PRESENTE
19	Abelha recém-emergida – 5	+	PRESENTE
20	Abelha recém-emergida – 6	+	PRESENTE
21	Abelha recém-emergida – 7	+	PRESENTE
22	Abelha recém-emergida – 8	+	PRESENTE
23	Abelha adulta – 1	+	PRESENTE
24	Abelha adulta - 2	+	PRESENTE
25	Abelha adulta - 3	+	PRESENTE
26	Abelha adulta – 4	+	PRESENTE
27	Abelha adulta – 5	+	PRESENTE
28	Abelha adulta – 6	+	PRESENTE
29	Abelha adulta – 7	+	PRESENTE
30	Abelha adulta – 8	+	PRESENTE
31	Abelha adulta – 9	+	PRESENTE
32	Abelha adulta – 10	+	PRESENTE
33	Abelha adulta - 11	+	PRESENTE
34	Abelha adulta – 12	+	AUSENTE
35	Abelha adulta – 13	+	AUSENTE
36	Abelha adulta – 14	+	AUSENTE
37	Abelha adulta – 15	+	AUSENTE
38	Abelha adulta – 16	+	AUSENTE
39	Abelha adulta – 17	+	AUSENTE
40	Abelha adulta – 18	-	PRESENTE
41	Abelha adulta – 19	-	PRESENTE
42	Abelha adulta – 20	-	AUSENTE
43	Abelha adulta – 21	-	AUSENTE
44	Abelha adulta – 22	-	AUSENTE
45	Abelha adulta – 23	-	AUSENTE
46	Mel		PRESENTE
47	Pólen		PRESENTE
	TOTAL	37	31

Fonte: Autor (2021)

5 DISCUSSÃO

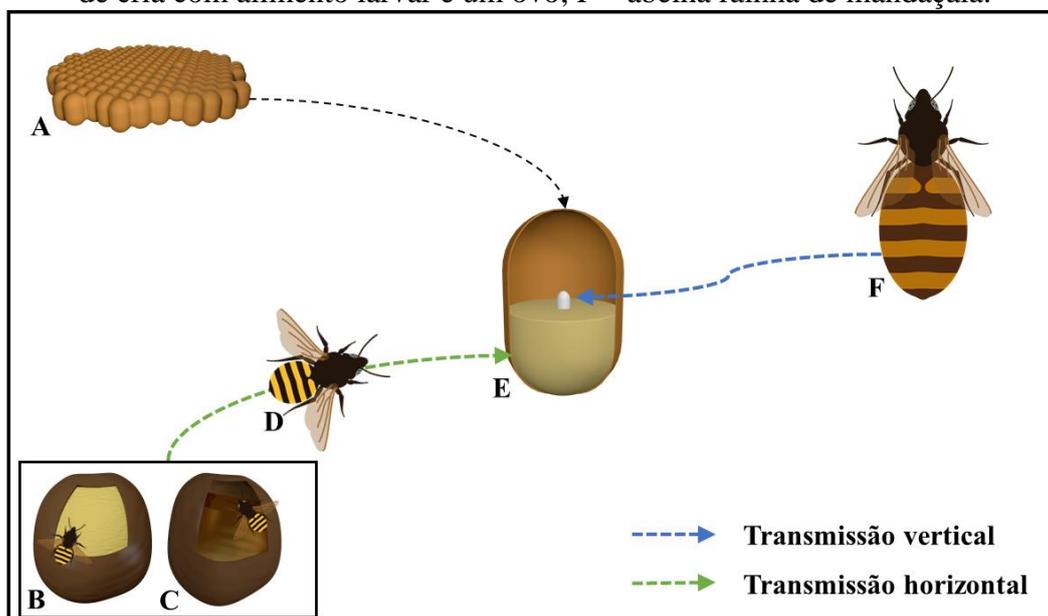
A presença do vírus em todos os estágios de desenvolvimento, bem como nos recursos alimentares da colônia, indica que o vírus MqV1b pode ser transmitido verticalmente da rainha para o ovo, e horizontalmente via trofalaxia, alimentação larval e compartilhamento dos recursos estocados na colmeia. Ademais, a detecção do vírus nos indivíduos de diferentes fases de desenvolvimento demonstra que uma colônia debilitada é suscetível a infecções virais que podem agravar a situação da colônia durante a síndrome, o que pode levá-la ao colapso. O vírus MqV1b é filogeneticamente relacionado aos vírus ABPV e IAPV, caracterizados para *A. mellifera*, os quais também causam tremores e paralisia (BAILEY; GIBBS; WOODS, 1963; MAORI *et al.*, 2007), sintomas observados nas mandaçaias durante o “mal de março”. Seria possível investigar se os sintomas são de fato causados pelo vírus MqV1b em futuros estudos, inoculando partículas virais em diferentes concentrações nas abelhas mandaçaias e observando as manifestações da infecção, bem como eventualmente a taxa de mortalidade.

A presença do vírus MqV1b na abelha rainha de mandaçaias, bem como nos ovos, sugere uma provável transmissão vertical (Figura 9), em que a abelha rainha infectada deposita ovos com partículas virais que posteriormente causam a infecção da prole. Não foi possível diferenciar as vias da transmissão vertical, transovariana ou *transovum*, uma vez que as superfícies dos ovos não foram esterilizadas. Pela superfície dos ovos não ter sido esterilizado, é plausível que o vírus estivesse presente no alimento larval presente nas células de cria, visto que o alimento larval é depositado pelas operárias antes do ovo (NOGUEIRA-NETO, 1997). Um experimento para comprovar a via da transmissão vertical pode ser desenvolvido. Para tanto seria necessário coletar ovos de abelhas rainhas infectadas com MqV1b, obtidas de colônias com a presença do vírus, ou através da inoculação de partículas virais nas rainhas. Posteriormente seria possível comparar a carga viral, através de PCR em tempo real, de amostras de ovos com as superfícies esterilizadas e não esterilizadas, como já demonstrado para o vírus DWV em *A. mellifera* (AMIRI *et al.*, 2018).

Três larvas, 3 pupas e 8 abelhas recém-emergidas foram positivas para o vírus, bem como o mel e o pólen, indicando que o alimento larval é uma possível via de transmissão horizontal do vírus MqV1b em *M. quadrifasciata* (Figura 9). Esta via de transmissão para o vírus MqV1b é validada pela presença do vírus nos componentes do alimento larval, que são os recursos alimentares da colônia (mel e pólen) (VOLLET-NETO *et al.*, 2010). Outro mecanismo de contaminação do alimento larval são as

secreções salivares das abelhas que o depositam nas células de cria. Bailey (1969) detectou carga viral de SBV nas secreções de glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera*, constatando a transmissão horizontal da abelha adulta para a prole. Nutrizes infectadas podem também ser uma causa da transmissão do vírus MqV1b para os estágios de desenvolvimento mais jovens (larva, pupa e abelhas recém-emergidas).

Figura 9 – Representação das possíveis formas de transmissão para a prole de *M. quadrifasciata*. A – disco de cria; B – pote de pólen com uma abelha adulta; C – pote de mel com uma abelha adulta; D – abelha adulta de mandaçaia; E – célula de cria com alimento larvar e um ovo; F – abelha rainha de mandaçaia.



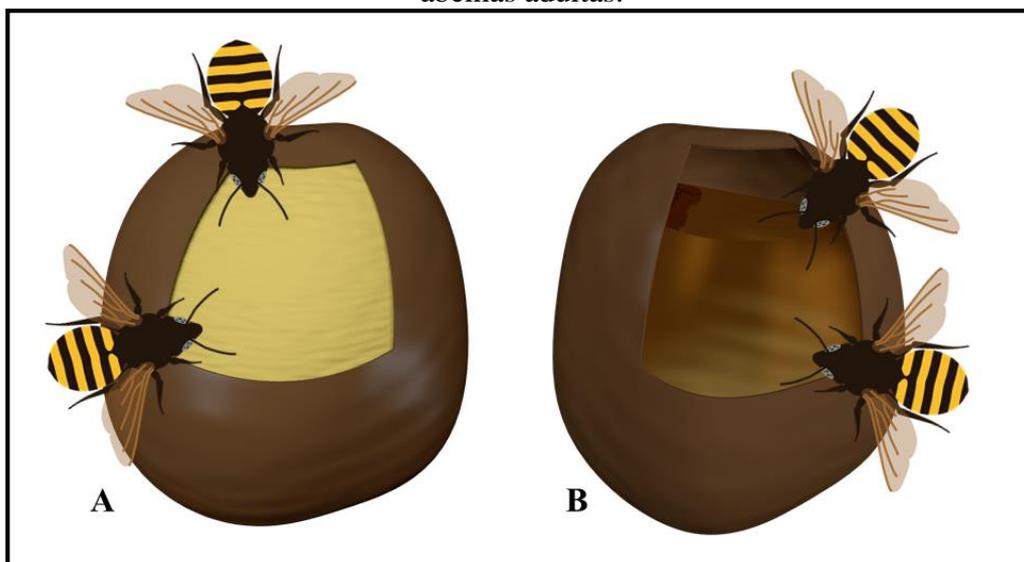
Fonte: Compilação do autor (2021)⁴

O mel e o pólen contaminados pelo vírus MqV1b podem servir como um reservatório viral da colônia, estando envolvidos no processo de transmissão horizontal entre os indivíduos (Figura 10). As abelhas adultas, ao ingerirem mel ou pólen com partículas virais, estão passíveis a infecção pelo vírus MqV1b. Para comprovar a infectividade a longo prazo do vírus MqV1b presente no mel e no pólen armazenados na colônia, seria possível armazenar alíquotas de mel e pólen contaminados, e após distintos intervalos de tempo, utilizá-lo na alimentação de abelhas adultas. Então seria necessário aguardar alguns dias para verificar se as abelhas apresentariam sintomas e confirmar a infecção por PCR. Essa abordagem foi utilizada por Singh *et al.* (2010), demonstrando que o vírus DWV se manteve infeccioso para *A. mellifera* por seis meses no mel e pólen estocado a temperaturas entre -6°C e 32°C. Durante o manejo, os meliponicultores

⁴ Ilustrações cedidas por Bruno Ribeiro

utilizam seringas para coletar o mel (JAFFÉ *et al.*, 2015), o que seria uma possível via de transmissão de partículas virais de uma colônia para outra, caso não haja cuidado o suficiente na esterilização dos materiais.

Figura 10 – Representação de pote de pólen e de mel estocados com *M. quadrifasciata* se alimentando. A – pote de pólen com duas abelhas adultas; B – pote de mel com duas abelhas adultas.



Fonte: Compilação do autor (2021)⁵

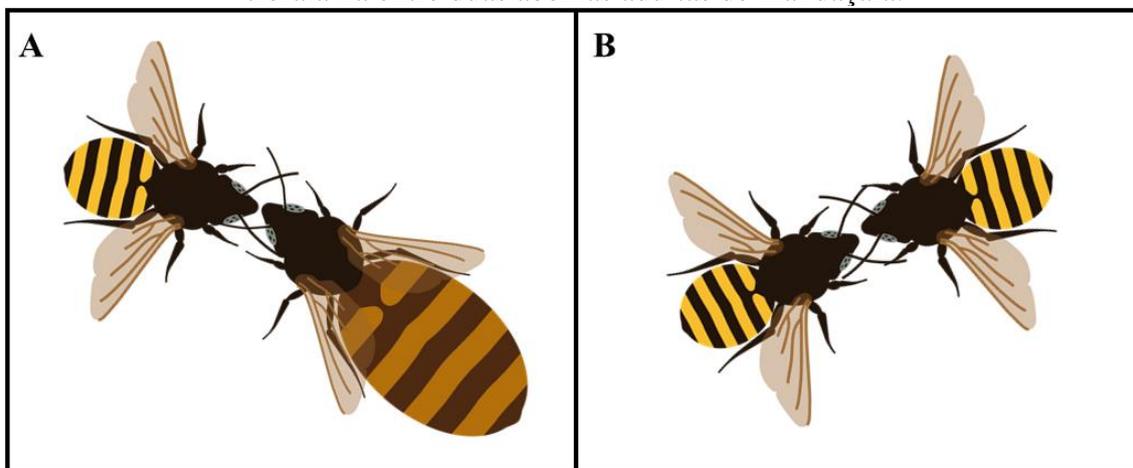
O pólen contaminado deixa em aberto a possibilidade de transmissão horizontal entre os indivíduos de diferentes colônias de abelhas sem ferrão através do compartilhamento de recursos florais. Neste mecanismo de transmissão, abelhas infectadas depositam partículas virais nas flores durante a coleta de néctar e pólen (ALGER; BURNHAM; BRODY, 2019). Para testar essa via de transmissão, abelhas forrageiras das colônias criadas na cidade de Boqueirão do Leão (RS) podem ser capturadas para verificar a presença dos sete vírus identificadas por Caesar *et al.* (2019), bem como os pellets de pólen carregados, da mesma forma que demonstrado para os vírus DWV, BQCV e SBV em abelhas *A. mellifera* (SINGH *et al.*, 2010). Além disso, as flores visitadas pelas abelhas podem ser amostradas para a detecção dos mesmos vírus.

A abelha rainha e 13 abelhas adultas foram positivas para o vírus MqV1b. Apesar de não ter sido possível diferenciar as abelhas forrageiras das abelhas nutrízes, é provável que a rainha tenha sido infectada por trofolaxia, mostrando que a transmissão horizontal do vírus MqV1b pode ocorrer entre as castas da abelha mandaçaia (Figura 11). Para

⁵ Ilustrações cedidas por Bruno Ribeiro

comprovar a transmissão por trofolaxia seria necessário realizar um estudo similar ao realizado por Amiri *et al* (2019), descrito anteriormente, em que foi evidenciado o mecanismo de transmissão via trofolaxia para o vírus IAPV em *A. mellifera*. Seria possível desenhar um experimento com mandaçaias em que algumas abelhas sadias e a abelha rainha fossem privadas do contato direto com o alimento e recebessem a alimentação de abelhas infectadas com o vírus MqV1b por meio da trofolaxia. Seria necessário observar, posteriormente, a presença ou ausência do vírus nas abelhas por PCR, bem como acompanhar o aparecimento ou não de sintomas.

Figura 11 – Representação de trofolaxia entre abelhas mandaçaia. A - Representação de trofolaxia entre abelha adulta e abelha rainha de mandaçaia; B – representação de trofolaxia entre duas abelhas adultas de mandaçaia.



Fonte: Compilação do autor (2021)⁶

A degradação do RNA por RNases pode ter sido a causa de oito amostras terem se mostrado negativas para detecção do gene *rps5* (Tabela 1). Dessas amostras, duas abelhas adultas (abelha adulta 18 e 19) apresentaram infecção viral do MqV1b. É possível que o material genético do vírus esteja protegido da ação de RNases pela proteína supressora de silenciador de RNA do hospedeiro, característica de vírus da família *Dicistroviridae* (BONNING; MILLER, 2010). Outra possibilidade, é a presença de partículas virais no corpo da abelha, em que o seu material genético se manteve protegido das ações das RNases pelo seu capsídeo até o momento da extração de RNA. De qualquer maneira, uma possível contaminação por partículas virais do MqV1b presentes no ninho durante o manuseio das amostras no momento da coleta não pode ser descartada.

⁶ Ilustrações cedidas por Bruno Ribeiro

É notável uma diferença nas intensidades das bandas para as amostras que apresentaram infecção viral do vírus MqV1b (Figura 6, 7 e 8), sugerindo que as amostras possuem distintas cargas virais. Desta forma, as 11 amostras que não apresentaram infecção viral do vírus MqV1b, mas foram positivas para o gene endógeno *rsp5*, podem apresentar infecção viral caso o experimento seja realizado por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que possui um limite de detecção maior que a PCR “endpoint”. Por questões de logística, a carga viral do MqV1b não foi quantificada por qPCR, entretanto, os futuros estudos podem utilizar essa técnica para aumentar o poder de discriminação e quantificação do vírus nas mandacaias e seus recursos alimentares.

6 CONCLUSÃO

A transmissão do vírus MqV1b entre os estágios de desenvolvimento da abelha mandaçaia pode ocorrer verticalmente, da rainha para a prole, ou horizontalmente, por trofalaxia, alimento larval e alimentação. O mel e o pólen contaminados são estoques virais que favorecem a permanência do vírus na colônia.

A presença do vírus MqV1b em todos os estágios de desenvolvimento em uma colônia debilitada de mandaçaias indica que o vírus é oportunista, sugerindo que o vírus está contribuindo para o colapso final da colônia que sofre da doença “mal de março”. Dois mecanismos contribuem para a prevalência de MqV1b em uma colônia: 1) a infecção da prole em desenvolvimento pelos mecanismos de transmissão vertical (da rainha) ou horizontal (pelo alimento larval), levando à permanência do vírus nas abelhas recém-emergidas; 2) a infecção de abelhas saudáveis ao ingerirem mel ou pólen estocado contaminados com partículas virais.

Com a confirmação da presença de partículas virais do MqV1b no mel e no pólen, é importante que os equipamentos utilizados por meliponicultores sejam devidamente esterilizados e trocados ao manejar diferentes colônias de mandaçaia durante o manejo e extração do mel. É necessário evitar a transferência de recursos entre as diferentes colônias. Estes procedimentos poderão evitar a entrada do vírus em uma colônia saudável.

O presente trabalho abre novas questões para futuros estudos visando um melhor entendimento da transmissão viral em abelhas mandaçaias, abelha acometida anualmente pela doença “mal de março”, bem como para outras espécies de abelhas nativas sem ferrão, por possuírem um comportamento e estrutura da colônia similares.

REFERÊNCIAS

ALGER, S. A.; BURNHAM, P. A.; BRODY, A. K. Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. **PLOS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0221800, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221800>

AMIRI, E. *et al.* Israeli Acute Paralysis Virus: Honey Bee Queen–Worker Interaction and Potential Virus Transmission Pathways. **Insects**, v. 10, n. 1, p. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects10010009>

AMIRI, E. *et al.* Quantitative patterns of vertical transmission of deformed wing virus in honey bees. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0195283, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195283>

AMIRI, E.; MEIXNER, M. D.; KRYGER, P. Deformed wing virus can be transmitted during natural mating in honey bees and infect the queens. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33065, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep33065>

BAILEY, L. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. **Annals of Applied Biology**, v. 63, n. 3, p. 483–491, 1969. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1969.tb02844.x>

BAILEY, L.; GIBBS, A. J.; WOODS, R. D. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). **Virology**, v. 21, n. 3, p. 390–395, 1963. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(63\)90200-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(63)90200-9)

BAILEY, L.; WOODS, R. D. Two More Small RNA Viruses from Honey Bees and Further Observations on Sacbrood and Acute Bee-Paralysis Viruses. **Journal of General Virology**, v. 37, n. 1, p. 175–182, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-37-1-175>

BATALHA-FILHO, H. *et al.* Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 26, n. 2, p. 213–219, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-46702009000200003>

BERTHOUD, H. *et al.* Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 60–65, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.08>

BONNING, B. C.; MILLER, W. A. Dicistroviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 129–150, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085457>

CAESAR, L. *et al.* Longitudinal survey reveals delayed effects of forager gene expression on stingless bee colony health. **bioRxiv**, p. 2020.10.13.337527, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.10.13.337527>

CAESAR, L. **Síndrome anual da abelha mandacaiá (*Melipona quadrifasciata*) - o papel de simbiotes, sistema imune e ambiente**. 101 f. 2020. Tese (doutorado) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 2020.

- CAESAR, L. *et al.* The virome of an endangered stingless bee suffering from annual mortality in southern Brazil. **Journal of General Virology**, v. 100, n. 7, p. 1153–1164, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001273>
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. **Melipona (Melipona) quadrifasciata Lepeletier, 1836**, 2013. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 27 abr. 2021.
- CHEN, Y. P. *et al.* Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 606–611, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.606-611.2006>
- CHEN, Y. P. *et al.* Israeli Acute Paralysis Virus: Epidemiology, Pathogenesis and Implications for Honey Bee Health. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. e1004261, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004261>
- CRAILSHEIM, K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 29, n. 1–2, p. 97–112, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/apido:19980106>
- DE MIRANDA, J. R. *et al.* Honey bee viruses and they effect on bee and colony health. *In*: SAMMATARO, D.; YODER, J. A. (org.) **HONEY BEE COLONY HEALTH: CHALLENGES AND SUSTAINABLE SOLUTIONS**. CRC Press, 2012. p. 71–102.
- DE MIRANDA, J. R. *et al.* Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, p. 1–56, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>
- DE MIRANDA, J. R.; FRIES, I. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 2, p. 184–189, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.02.004>
- DÍAZ, S. *et al.* Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 143, p. 35–39, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.012>
- GISMONDI, A.; DI MARCO, G.; CANINI, A. Detection of plant microRNAs in honey. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172981, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172981>
- HAILS, R. S.; BALL, B. V.; GENERSH, E. Infection strategies of insects viruses. *In*: AUBERT, M. *et al.* (org.) **Virology and the honey bee**. Luxemburgo: European communities, 2008.
- HARTER, B. *et al.* Bees collecting pollen from flowers with poricidal anthers in a south Brazilian *Araucaria* forest: a community study. **Journal of Apicultural Research**, v. 41, n. 1–2, p. 9–16, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.2002.11101063>

HUNG, A. C. F. PCR detection of Kashmir bee virus in honey bee excreta. **Journal of Apicultural Research**, v. 39, n. 3–4, p. 103–106, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.2000.11101029>

JAFFÉ, R. *et al.* Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121157, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121157>

MAORI, E. *et al.* Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 12, p. 3428–3438, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/vir.0.83284-0>

NAZZI, F. *et al.* Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002735, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002735>

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.

NUNES-SILVA, P. N.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. I. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 01, p. 140–151, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.07>

RIO GRANDE DO SUL. **Decreto Nº 51.797, de 8 de setembro de 2014. Declara as Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Palácio Piratini, 2014. Disponível em: <http://www.legislacao.sefaz.rs.gov.br/Site/Document.aspx?inpKey=233283&inpCodDispositive=&inpDsKeywords=51797>. Acesso em: 18 nov. 2018.

SANTOS, S. A. B. dos *et al.* Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 751–757, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr015>

SHEN, M. *et al.* 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**, v. 86, n. 8, p. 2281–2289, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/vir.0.80824-0>

SINGH, R. *et al.* RNA Viruses in Hymenopteran Pollinators: Evidence of Inter-Taxa Virus Transmission via Pollen and Potential Impact on Non-*Apis* Hymenopteran Species. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e14357, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014357>

SLAA, E. J. *et al.* Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 293–315, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/apido:2006022>

SPARKS, W. O.; BARTHOLOMAY, L. C.; BONNING, B. C. Insect immunity and viruses. *In*: BECKAGE, N. E. (org.). **Insect immunology**. 1. eded. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2008.

VANENGELSDORP, D. *et al.* A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, p. e4071, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004071>

VANENGELSDORP, D. *et al.* Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6481, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>

VIRALZONE, SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. **ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity**. 2011. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/36>. Acesso em: 27 abr. 2021.

VOLLET-NETO, A. *et al.* Dietas proteicas para abelhas sem ferrão. **Anais do IV Encontro sobre Abelhas**, p. 121–129, 2010.

YAÑEZ, O. *et al.* Bee Viruses: Routes of Infection in Hymenoptera. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 943, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00943>

YUE, C. *et al.* Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of General Virology**, v. 88, n. 8, p. 2329–2336, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/vir.0.83101-0>