



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

## **OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DA NOSEMOSE EM APIÁRIOS DO ESTADO DA BAHIA**

VIVIAN MARINA GOMES BARBOSA LAGE

Salvador, Bahia

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

## **OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DA NOSEMOSE EM APIÁRIOS DO ESTADO DA BAHIA**

VIVIAN MARINA GOMES BARBOSA LAGE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Dra. Suzana Telles da Cunha Lima

Co-orientadora: Dra. Cristiane de Jesus Barbosa

Salvador, Bahia

2018

**VIVIAN MARINA GOMES BARBOSA LAGE**

**Ocorrência e distribuição da nosemose em apiários do  
Estado da Bahia**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 26 de setembro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA:**

Suzana Telles da Cunha Lima  
Doutora em Biologia Vegetal  
Universidade Estadual de Campinas,  
UNICAMP, Brasil.

Universidade Federal da Bahia



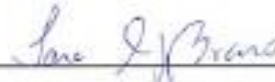
Luciana Veiga Barbosa  
Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).  
Universidade de São Paulo  
USP, Brasil.

Universidade Federal da Bahia



Iara Sordi Joachim Bravo  
Doutora em Psicobiologia.  
Universidade de São Paulo,  
USP, Brasil.

Universidade Federal da Bahia



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido saúde, força e determinação para cursar o mestrado.

Aos meus pais, Fernando e Vilma, por serem os meus maiores incentivadores e fazerem de tudo para realizar os meus sonhos.

À minha irmã Fernanda, por estar sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos.

À minha orientadora Dra. Cristiane Barbosa, por acreditar em mim desde o princípio e compartilhar diariamente sua sabedoria, carinho e atenção.

À minha orientadora Dra. Suzana Telles, por ter me acolhido a sua equipe, por todo o conhecimento compartilhado e dedicação.

À profa. Rejane Noronha, por dividir comigo todo o seu amor e sabedoria pela apicultura.

Aos doutores Frederico Medeiros, Paulo Mesquita e Grazielle Carvalho, por compartilharem os seus conhecimentos na área de Química Analítica e me auxiliarem na identificação de resíduos de agrotóxicos em abelhas, que será um próximo artigo desenvolvido.

Ao técnico Epaminondas do Patrocínio, por todo o suporte fornecido no Laboratório de Biologia Molecular, desde os ensinamentos até as criações de protocolos.

À estagiária Camila Dias, que esteve comigo nestes dois anos de mestrado, sem medir esforços para me ajudar. Só tenho a agradecer, esse projeto é nosso!

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular. Vocês foram muito mais do que colegas de trabalho, se tornaram grandes amigos e tornaram os meus dias mais leves.

À Universidade Federal da Bahia e o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter fornecido o apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

À Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), por fornecer os recursos necessários para realização do projeto de mestrado.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo apoio técnico no estabelecimento e otimização da diagnose molecular.

Ao Centro Tecnológico de Agropecuária da Bahia (CETAB), por fornecer toda a infraestrutura para a realização do meu projeto.

Ao *Centro de Investigación Apícola y Agroambiental* de Marchamalo, na Espanha, por fornecer o controle positivo de *N. apis*.

Aos apicultores envolvidos, por toda ajuda durante as coletas e análises de campo.

## EPÍGRAFE

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

**Victor Hugo (1802-1885)**

LAGE, Vivian Marina Gomes Barbosa. **Ocorrência e distribuição da nosemose em apiários do estado da Bahia.** Dissertação de Mestrado (Biotecnologia), Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2018.

## RESUMO

A nosemose é considerada uma das doenças mais importantes entre as abelhas, sendo ocasionada por fungos microsporídios do gênero *Nosema spp.* A doença é citada como um dos fatores relacionados ao Distúrbio do Colapso das Colônias (DCC), caracterizado pela morte precoce de populações de abelhas. A nosemose pode ser ocasionada por *Nosema apis* ou *N. ceranae*, sendo esta última relatada como a mais prevalente no mundo e no Brasil. Entretanto, pouco se sabe sobre sua ocorrência e distribuição no estado da Bahia. O objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência e distribuição dos parasitas *N. apis* e *N. ceranae* em abelhas *Apis mellifera* L. coletadas em apiários no estado da Bahia, Brasil. Foram analisadas 154 amostras de abelhas coletadas em 20 apiários de seis regiões apícolas do Estado. As colmeias amostradas foram avaliadas quanto aos sintomas e sinais da doença, no período de dezembro de 2015 a julho de 2018, porém não foi observado nenhum sintoma. O diagnóstico molecular foi realizado via reação em cadeia da polimerase (PCR). Do total de 154 amostras analisadas, 96 estavam infectadas por *N. ceranae* e a espécie *N. apis* não foi detectada. O patógeno *N. ceranae* foi encontrado em amostras de todas as seis regiões avaliadas. Este resultado é coerente com outros trabalhos já publicados, nos quais *N. ceranae* vem sendo encontrado em alta frequência e *N. apis* é pouco relatado. A ausência de sintomas frente a um alto nível de infecção é discutida neste trabalho.

**Palavras-chave:** Abelhas, apicultura, nosemose, parasita, colapso das colônias.

LAGE, Vivian Marina Gomes Barbosa. **Ocurrence and distribution of noseose in apiaries of Bahia state.** Masters dissertation (Biotechnology), Federal University of Bahia, Institute of Health Sciences, Salvador, 2018.

## ABSTRACT

Nosema is considered one of the most important diseases among bees, caused by microsporidia fungi of the genus *Nosema* spp. The disease is cited as one of the factors related to Colony Collapse Disorder (DCC), characterized by the early death of bee populations. *Nosema* disease may be caused by *Nosema apis* or *N. ceranae*, the latter being reported as the most prevalent in the world and in Brazil. However, little is known about occurrence and distribution in the State of Bahia. The aim of this study was to identify the occurrence and distribution of parasites *N. apis* and *N. ceranae* in *Apis mellifera* L. bees collected in apiaries of Bahia, Brazil. 154 samples of bees collected in 20 apiaries of six bee regions of the State were analyzed. The hives were followed regarding the symptoms and signs of the disease, from December 2015 to July 2018, however no apparent symptom was found. The molecular diagnosis was carried out via polymerase chain reaction (PCR). From 154 samples analyzed, 96 were infected by *N. ceranae* and *N. apis* species was not detected. *N. ceranae* pathogen was found in samples from all six regions evaluated. This result is consistent with others already published, in which *N. ceranae* has been found in high frequency and *N. apis* is almost not reported. The absence of symptoms regardless the high level of infection is discussed in this article.

**Keywords:** Bees, beekeeping, *Nosema*, parasite, collapse of colonies.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Atividade polinizadora das abelhas <i>A. mellifera</i> .....	19
<b>Figura 02.</b> Microscopia ótica de esporos maduros de <i>Nosema apis</i> (A) e <i>Nosema ceranae</i> (B) presentes em <i>A. mellifera</i> .....	23
<b>Figura 03.</b> A- Sintoma de diarreia causado por <i>Nosema</i> na entrada da colmeia de <i>A. mellifera</i> . B- Tecido do intestino (ventrículo) de abelhas <i>A. mellifera</i> ; acima tecido infectado (branco leitoso) e abaixo tecido sadio (amarelado).....	25
<b>Figura 04.</b> Presença e distribuição de <i>Nosema</i> no mundo.....	30
<b>Figura 05.</b> Mapa do estado da Bahia com os seis municípios sinalizados, em vermelho, referentes à coleta das amostras de abelhas <i>A. mellifera</i> para os testes moleculares.....	34
<b>Figura 06.</b> Coleta de amostras de abelhas <i>A. mellifera</i> no município de Inhambupe realizada com apoio da equipe técnica da ADAB na Bahia.....	35
<b>Figura 07.</b> Monitoramento dos sintomas da nosemose em colmeias do município de Inhambupe.....	36
<b>Figura 08.</b> Processo de extração pelo método Doyle & Doyle (1987) modificado....	37
<b>Figura 09.</b> Gel de agarose 2% com os produtos de amplificação do DNA total utilizando os <i>primers</i> 218MITOC-F e 218MITOC-R para comparação entre os métodos de extração do Manual da OIE (2013) e Doyle & Doyle (1987). Canaletas A: Produtos do método OIE; Canaletas N: Produtos do método Doyle e Doyle. 1: Marcador de peso molecular (100 a 1200 pb); 2: Controle positivo; 3 e 4: Controles negativos; 5 a 28: Produtos da PCR (positivos com 218 pb).....	38
<b>Figura 10.</b> Gel de agarose 2% com os produtos de amplificação do DNA total obtidos de amostras de abelhas ( <i>A. mellifera</i> ) utilizando os <i>primers</i> 218MITOC-F e 218MITOC-R. 1: Marcador de peso molecular (50 a 1000 pb); 2: Controle positivo; 3 e 4: Controles negativos; 5 a 21: Produtos da PCR (positivos com 218 pb).....	39
<b>Figura 11.</b> Gel de agarose 2% com os produtos de amplificação do DNA total obtidos de amostras de abelhas ( <i>A. mellifera</i> ) utilizando os <i>primers</i> Mnceranae-F, Mnapis-F e Muniv-R. 1: Marcador de peso molecular (100 a 1000 pb); 2: Controle positivo para <i>N. apis</i> e <i>N. ceranae</i> ; 3: Controle positivo para <i>N. ceranae</i> ; 4 e 5: Controles negativos; 6 a 21: Produtos da PCR (224 pb <i>N. apis</i> e 143 pb <i>N. ceranae</i> ).....	40
<b>Figura 12.</b> Cladograma da amostra sequenciada de <i>N. ceranae</i> gerado pelo programa BLAST.....	41

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 01.</b> Lista de <i>primers</i> utilizados para a detecção molecular de <i>Nosema</i> spp. por PCR.....	28
<b>Tabela 02.</b> Municípios avaliados no estado da Bahia, número de apiários e amostras coletadas.....	35

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAB: Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia

AHB: Abelha africanizada (*Africanized honeybee*)

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CCD: Distúrbio do Colapso das Colônias (*Colony Collapse Disorder*)

CETAB: Centro Tecnológico de Agropecuária da Bahia

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EUA: Estados Unidos da América

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

IAPV: Vírus Israelense da Paralisia Aguda (*Israeli acute paralysis vírus*)

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health*)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

SEBRAE: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

UFBA: Universidade Federal da Bahia

## SUMÁRIO

Agradecimentos.....	IV
Epígrafe.....	VI
Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
Lista de figuras.....	IX
Lista de tabelas.....	X
Lista de siglas e abreviaturas.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1 Importância das abelhas.....	17
3.2 Distúrbio do Colapso das Colônias (CCD).....	20
3.2.1 CCD no mundo.....	21
3.2.2 CCD no Brasil.....	22
3.3 Nosemoses.....	23
3.3.1 Métodos de identificação de <i>Nosema</i> spp.....	26
3.3.2 Tratamento.....	29
3.3.3 Nosemose no mundo.....	29
3.3.4 Nosemose no Brasil.....	31
3.3.5 Prevalência de <i>N. ceranae</i> .....	32
4. METODOLOGIA.....	34
4.1 Amostragem.....	34
4.2 Avaliação das colmeias.....	36
4.3 Análise molecular.....	36
4.3.1 Testes para extração do DNA total.....	36
4.3.2 Testes para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	38

4.3.3 Sequenciamento do DNA.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
Artigo: Asymptomatic presence of <i>N. ceranae</i> from apiaries of Bahia State, Brazil.....	42
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas têm o seu surgimento estimado há cerca de 125 milhões de anos, no período Cretáceo, após as Angiospermas (WING & BOUCHER, 1998). São as principais agentes polinizadoras, sendo determinantes para o aumento da produção de diversos cultivos agrícolas, especialmente a fruticultura, além da produção de mel e derivados (D'ÁVILA & MARCHINI, 2005). Cerca de 20.000 espécies de abelhas foram descritas até o momento, sendo a *Apis mellifera* L. a de maior incidência mundial e influência econômica (TRINDADE et al., 2004).

O sucesso da espécie *A. mellifera* está relacionado ao seu fácil manejo, tamanho de suas colônias, alto rendimento, eficiente habilidade de forrageamento, abundância em diferentes ecossistemas e seu perfil generalista na busca de recursos (PIRES et al., 2016). As características de *A. mellifera* combinadas com a alta demanda por produtos de abelhas coloca a apicultura como uma atividade chave para a conservação dos ecossistemas e desenvolvimento econômico, atraindo assim um grande interesse em diferentes setores da sociedade e geração de renda (BORLACHENCO et al., 2017).

As populações de abelhas tem sofrido mundialmente uma grande redução que foi denominada como “Síndrome do desaparecimento das abelhas” ou “Distúrbio do Colapso das Colônias” (*Colony Collapse Disorder*, CCD). Entre os fatores associados como causas desta síndrome destaca-se a nosemose (HIGES et al., 2008).

A nosemose é considerada uma das doenças mais importantes entre as abelhas, sendo ocasionada por fungos microsporídios do gênero *Nosema* spp. (ADL et al., 2005). São parasitas intracelulares obrigatórios que se desenvolvem nas células da mucosa intestinal do hospedeiro, transmitindo-se horizontalmente por via fecal-oral (GISDER et al., 2011). A doença possui apenas duas espécies envolvidas, a *Nosema apis*, que foi identificada inicialmente em *Apis mellifera* (ZANDER, 1909), e a *Nosema ceranae*, proveniente das abelhas asiáticas *Apis cerana* (FRIES et al., 1996). Entretanto, ambas as espécies são encontradas parasitando *A. mellifera*, tanto em infecções individuais como em co-infecções (FRIES, 2006). As infecções por *Nosema* spp. ocasionam desordens digestivas, tremores, diminuição da longevidade das abelhas, da população da colmeia e conseqüentemente redução da

produção de mel e da capacidade de polinização (CHEN et al., 2008; WILLIAMS, 2000).

A nosemose possui distribuição mundial, mas sua ocorrência é ainda pouco conhecida no Brasil (PIRES et al., 2016). Embora o primeiro registro do patógeno no país tenha sido feito em 2007 (KLEE et al., 2007), recentemente foram realizadas análises moleculares de amostras de abelhas coletadas em 1979 que indicam a presença do microsporídio há pelo menos três décadas (TEIXEIRA et al., 2013). Os trabalhos publicados acerca da ocorrência da nosemose no Brasil sugerem que a doença está bem disseminada no país (KLEE et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2014; KRUGER, 2015; LIMA et al., 2015; GUIMARÃES-CESTARO et al., 2016; NASCIMENTO, 2016).

O nordeste brasileiro, devido a características climáticas e florísticas, possui grande competitividade no mercado apícola (VIDAL, 2017). O estado da Bahia ocupa a primeira posição na produção de mel da região nordeste e sexta colocação nacional, com 3.590 toneladas produzidas no último ano (IBGE, 2017). Apesar da intensa atividade apícola, a Bahia possui poucas informações acerca da sanidade das abelhas locais.

O estudo de Teixeira et al. (2013), investigou a ocorrência e distribuição da nosemose no país, em amostras advindas de 10 estados brasileiros, incluindo a Bahia, e detectou a presença de *N. ceranae*. Não existem outros trabalhos publicados acerca da doença no Estado. Tendo em vista a extensa dimensão do estado da Bahia, intensa atividade apícola e escassez de trabalhos, há uma demanda de informações acerca da nosemose. Considerando o contexto apresentado, o estabelecimento de técnicas moleculares para o diagnóstico da nosemose no estado da Bahia mostra-se necessário para se conhecer a sanidade dos apiários locais e embasar ações governamentais, políticas e técnicas, visando o manejo mais adequado dos apiários e a manutenção da capacidade de polinização das colônias.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Conhecer a etiologia, ocorrência e distribuição da nosemose no estado da Bahia.

### **2.2 Específicos**

- Estabelecer e otimizar técnicas moleculares para o diagnóstico de nosemoses em *A. mellifera*;
- Conhecer a ocorrência, distribuição e sintomas associados à nosemose em apiários das principais regiões apícolas da Bahia;
- Identificar as espécies de *Nosema* associadas à nosemose no estado da Bahia.



### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Importância das abelhas**

As abelhas têm o seu surgimento estimado há cerca de 125 milhões de anos, no período Cretáceo, após as Angiospermas (WING & BOUCHER, 1998). São vespas (Hymenoptera, Aculeata) que alteraram seu comportamento alimentar, modificando a fonte de nutrientes de insetos e ácaros para o néctar e o pólen (SILVEIRA et al., 2002). A partir disto, estes insetos criaram uma forte relação com as plantas angiospermas, sendo os seus principais agentes polinizadores. Estão inseridas na superfamília Apoidea, juntamente com as vespas (BROTHERS & CARPENTER, 1993). Alexander & Michener (1995), propuseram uma classificação das abelhas em 9 famílias (Colletidae, Stenotritidae, Andrenidae, Halictidae, Melittidae, Dasypodaidae, Meganomiidae, Megachilidae e Apidae). No mundo, cerca de 20.000 espécies de abelhas já foram descritas até o momento (MICHENER, 2007), sendo que apenas 2% são consideradas sociais.

As abelhas sociais são as principais polinizadoras das comunidades de plantas, sendo o sucesso deste domínio relacionado à capacidade de recrutar outras abelhas da colmeia para o forrageamento e a eficiência na comunicação da fonte de alimento (ALVES et al., 2015). As abelhas são responsáveis pela polinização de diversas culturas, sendo determinantes para a manutenção de várias espécies vegetais em todo o mundo (MORSE & CALDERONE, 2000). Cerca de 70% das plantas cultivadas para o consumo humano tem aumento de produção em consequência da atividade polinizadora, principalmente a promovida pelas abelhas (KLEIN et al., 2007). Estima-se que o valor econômico da polinização promovida por insetos corresponde a 9,5% do valor total da produção agrícola mundial, o que representa cerca de 153 bilhões de euros (GALLAI et al., 2009). No Brasil, aproximadamente 60% das espécies de plantas cultivadas dependem em certo grau da polinização animal (GIANNINI et al., 2015).

Além da visita às flores e dos benefícios no incremento da polinização, as abelhas apresentam produtos e subprodutos bastante valorizados economicamente, tais como mel, pólen, própolis e cera. Sendo estes produtos os principais atrativos para a sua criação racional e manejo. A apicultura é uma atividade sustentável, que gera impactos positivos tanto no aspecto socioeconômico, pela renda gerada ao

agronegócio, como também do ponto de vista ambiental, devido à importância da polinização para a manutenção da biodiversidade do planeta (SANTOS & RIBEIRO, 2009). Esta atividade contempla principalmente a agricultura familiar, na qual estão inseridos 90% dos apicultores, sendo estes responsáveis por 60% da produção de mel do Brasil (ABEMEL, 2015).

O investimento em apicultura no Brasil está baseado na produção de mel e derivados, com poucas experiências do uso das abelhas em serviço de polinização (GONÇALVES, 2012). O grande impulso ao crescimento da apicultura no país aconteceu em 2001, quando as exportações de mel para a Europa e os Estados Unidos foram intensificadas. Antes disso, a produção nacional era predominantemente comercializada no mercado interno (LEGLER, 2008). Em relação à produção do mel no Brasil, a produção do último ano foi de 39,59 mil toneladas, o equivalente a 470,51 milhões de reais (IBGE, 2017). A região nordeste contribuiu com 26,1% da produção brasileira, gerando 10,39 mil toneladas de mel (IBGE, 2017). O estado da Bahia ocupou a primeira posição na produção de mel no nordeste e sexta colocação nacional, com 3.590 toneladas produzidas no último ano (IBGE, 2017). Devido ao clima e a grande biodiversidade da flora, o Brasil ainda apresenta um grande potencial apícola a ser explorado (AMARAL, 2010).

Além das aplicações no agronegócio, como a polinização de culturas e a produção de mel e derivados para venda, as abelhas também possuem um grande potencial biotecnológico. Os insetos podem ser utilizados como bioindicadores ambientais, indicando possíveis poluições ambientais por pesticidas, metais e compostos químicos (PALAZUELOS BALLIVIÁN, 2008). Também podem ser aplicadas no controle biológico de pragas e doenças, atuando como meio de transporte de inimigos naturais ou diretamente (DEDEJ et al., 2004). Além disso, a maioria dos seus derivados pode ser utilizada na produção de fármacos e produtos terapêuticos. A apitoxina (o veneno das abelhas do gênero *Apis*) pode ser empregada no tratamento de artrite, reumatismo e doenças autoimunes (DANTAS et al., 2013), assim como o mel, própolis e geleia real possuem diversas propriedades, tais como antibiótica, anti-inflamatória, anestésica, antioxidante e cicatrizante (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Os produtos apícolas também possuem aplicações na indústria cosmética, como na produção de cremes e tônicos, devido as suas propriedades adstringentes e suavizantes (RIBEIRO et al., 2009), assim como na indústria de alimentos e diversas outras áreas da biotecnologia.

A utilização dos produtos das abelhas pelo homem possui origem estimada há mais de 7.000 anos, para fins alimentares e medicinais. Os serviços de polinização nas áreas agrícolas dependem tanto das espécies domesticadas quanto das populações de abelhas silvestres (GARIBALDI et al., 2013). As abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) têm sido as mais utilizadas em todo o mundo para a polinização de plantas cultivadas (SOUZA, 2007) (Figura 01).

O sucesso da espécie *A. mellifera* está relacionado ao seu fácil manejo, tamanho de suas colônias, alto rendimento, eficiente habilidade de forrageamento, abundância em diferentes ecossistemas e seu perfil generalista na busca de recursos (PIRES et al., 2016). As características de *A. mellifera* combinadas com a alta demanda por produtos de abelhas coloca a apicultura como uma atividade chave para a conservação dos ecossistemas e desenvolvimento econômico, atraindo assim um grande interesse em diferentes setores da sociedade e geração de renda (BORLACHENCO et al., 2017).



Figura 01: Atividade polinizadora das abelhas *A. mellifera*. Fonte: CPT, 2017; GLOBO RURAL, 2015.

Até 1840 a criação de abelhas no Brasil era realizada com espécies nativas, denominadas abelhas indígenas sem ferrão ou meliponídeos, tais como as abelhas uruçú, mandaçaia e mandaguari (CAMARGO, 1972). O padre Antônio Carneiro Aureliano trouxe as primeiras abelhas europeias *A. mellifera* para o Brasil e, ainda no mesmo século, os colonizadores de várias partes da Europa trouxeram as subespécies *Apis mellifera mellifera* da Alemanha, a *Apis mellifera ligustica* da Itália, a *Apis mellifera carnica* da Áustria e a *Apis mellifera caucasica* da Rússia para a região Sul do País. O poli-híbrido resultante dessas linhagens deu início à apicultura brasileira (GONÇALVES, 2006).

Os primeiros relatos de problemas de sanidade apícola no país foram registrados na década de 20, com o “mal de outono” no Rio Grande do Sul, e na década de 30, com o aparecimento da nosemose em São Paulo e do parasita *Melaloncha ronnai* no Rio de Janeiro (PIRES et al., 2016). Por volta de 1950, 80% dos enxames se extinguíram devido a problemas de sanidade, o que ocasionou uma grande redução na produção de mel nacional (CAMARGO, 2002).

Para tentar melhorar a produtividade apícola, em 1956 o professor Warwick Estevan Kerr, através de apoio governamental, foi para a África com o objetivo de pesquisar as abelhas africanas, consideradas mais produtivas e resistentes a doenças (PEREIRA & VILELA, 2003). Em 1957, rainhas africanas foram trazidas para Rio Claro – São Paulo e, em função de um acidente, essas abelhas escaparam e disseminaram no Brasil (KERR, 1994). As abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*) cruzaram com as abelhas europeias locais e deram origem as abelhas africanizadas (*Africanized honeybee* – AHB), que atualmente ocupam todo o território brasileiro, exceto a ilha de Fernando de Noronha (GOLÇALVES, 2006). O resultado dessa hibridização é uma abelha com características predominantes das africanas, que apresenta facilidade para enxamear, maior produtividade e resistência a doenças (DE ALMEIDA et al., 2013).

### **3.2 Distúrbio do Colapso das Colônias (CCD)**

As populações de abelhas têm sofrido mundialmente uma grande redução que foi denominada como “Síndrome do desaparecimento das abelhas” ou “Distúrbio do colapso das colônias” (*Colony Collapse Disorder*, CCD). Esse fenômeno é caracterizado pela morte em massa de populações de abelhas, sendo repentino e de origem ainda desconhecida (WILLIAMS et al., 2010).

Associados a este processo, são observados sintomas físicos, tais como abdomens retraídos, ressecados e de coloração amarelada, e também sintomas comportamentais, tais como fraqueza, tremores, diminuição das taxas de polinização e produção (PIRES et al., 2016). Na dinâmica das colônias, pode ser observado: diminuição do número de abelhas operárias, devido à morte precoce das mesmas; maior número de crias em comparação ao número de abelhas adultas; corpos de abelhas adultas mortas dentro e fora da colmeia; aparente ausência de invasão imediata da colmeia por pragas, tais como traças (VANENGELSDORP et al., 2009).

Entre os fatores associados como possíveis causas desta síndrome destacam-se a intoxicação por agrotóxicos, estado nutricional e manejo das colônias, mudanças climáticas, além de patógenos e parasitas (PIRES et al., 2016). Os avanços científicos disponíveis, em especial na área molecular, apontam para a impossibilidade de atribuir tais colapsos a um único fator, com exceção aos advindos de mortalidade aguda comprovadamente ocasionada por agrotóxicos.

### 3.2.1 CCD no mundo

Não há um registro exato do primeiro relato de CCD no mundo, mas as informações pioneiras foram descritas na Europa e nos Estados Unidos, assim como os principais estudos estão concentrados nestas regiões (PIRES et al., 2016). Em 2007 foi realizada uma conferência nos EUA, com objetivo de discutir as possíveis causas da rápida mortalidade das colônias de abelhas que estavam sendo observadas. Foram identificados um conjunto de sintomas observados e a partir disto foi criado o conceito de “*Colony Collapse Disorder*” (CCD). Criou-se também um comitê de investigação e gestão da CCD, encarregado de elaborar planos de ações e obter relatos do fenômeno.

Desde a criação do comitê de investigação do CCD, inúmeras causas para o fenômeno têm sido propostas e, até o momento, está claro que nenhum fator sozinho é responsável pela síndrome. Embora as causas da CCD não tenham sido totalmente esclarecidas, diversas pesquisas estão sendo conduzidas por equipes multidisciplinares para tentar solucionar este problema (PETTIS & DELAPLANE, 2010).

A maior parte dos estudos americanos voltados ao CCD está destinada a patógenos (principalmente *N. ceranae*, *V. destructor* e alguns vírus), intoxicação por agrotóxicos, efeitos nutricionais e de manejo. Em geral, os estudos sustentam a hipótese de que a CCD é um fenômeno relacionado à sobrecarga de estresse, causada por diferentes fatores que atuam de maneira sinérgica (CORNMAN et al., 2012). Na Europa, as avaliações oficiais de perdas de colônias possuem registros mais recentes do que os do EUA. Os dados não estão disponíveis na mesma periodicidade do continente americano, pois este ponto envolve a adesão de países da União Europeia, assim como a participação de órgãos para a padronização de metodologias para a realização das avaliações. Na Europa, os patógenos *V.*

*destructor* e *N. ceranae*, juntamente com a exposição a agrotóxicos, têm sido relatados como os principais causadores da CCD (GENERSCH et al., 2010). Na América Latina, apesar da grande relevância econômica da atividade apícola, a sanidade das abelhas e o fenômeno CCD não estão bem documentados (VANDAME & PALACIO, 2010), sendo ausentes os registros sobre as mortes em massa das colônias.

### 3.2.2 CCD no Brasil

No Brasil, não existem registros acerca da mortalidade de abelhas melíferas livres e cultivadas relacionados à presença de patógenos, exposição de agrotóxicos ou qualquer outro fator associado ao fenômeno CCD (PIRES et al., 2016). Essa ausência de registros pode ser associada à inexistência de um sistema de monitoramento das colônias nos apiários e também na natureza. No país, de modo geral, não existem cadastros efetivos dos apicultores, com exceção de alguns estados que possuem cadastros ainda incompletos. Ainda, a ausência de programas governamentais devidamente regulamentados, que visem avaliar a situação real da sanidade apícola, constitui um fato que contribui para tal situação.

Até os anos 2000, não havia registros sobre a perda de colônias de *A. mellifera* no Brasil, com exceção das perdas ocorridas devido a indisponibilidade de recursos naturais, manejo inadequado ou em razão de pólenes tóxicos (CARVALHO & MESSAGE, 2004; CASTAGNINO et al., 2011). Após o estabelecimento do fenômeno CCD nos Estados Unidos, foram introduzidos termos como “declínio” e “colapso” no país e buscou-se estabelecer relações com tal fenômeno. Na última década, foram relatados diversos casos de morte de populações de abelhas no país, com possíveis envolvimento com CCD. No entanto, os casos que foram devidamente estudados não foram considerados associados ao fenômeno e, a grande maioria dos relatos não foi investigada.

Tendo em vista a situação dos apiários do Brasil, onde não há um cadastro e acompanhamento efetivo dos mesmos, não é possível mensurar as perdas das colônias, nem mesmo se existem ou não casos de CCD. É necessária a adesão de pelo menos um laboratório especializado por estado brasileiro, para que possa se iniciar um cadastramento e acompanhamento efetivo da situação dos apiários do

país, assim como instituições capacitadas para um levantamento epidemiológico correto.

### 3.3 Nosemoses

A nosebose é considerada uma das doenças mais importantes entre as abelhas, sendo ocasionada por microsporídios do gênero *Nosema* (Microsporidia:Nosematidae) (VOSSBRINCK & DEBRUNNER-VOSSBRINCK, 2005). O filo Microsporidia foi descoberto no século 19, sendo composto de fungos parasitas unicelulares capazes de formar esporos (WITTNER, 1999). Inicialmente, estes parasitas eram incluídos entre os protozoários no filo Apicomplexa, mas atualmente estão inseridos no reino Fungi (ADL et al., 2005).

A maioria dos microsporídios entomopatogênicos faz parte do gênero *Nosema*, sendo descritas mais de 150 espécies, que são encontradas em 12 ordens de insetos (ANDREADIS, 1980). Dentre as ordens de insetos mais afetadas pelos microsporídios, destacam-se Lepidoptera, Diptera Coleoptera, Orthoptera e Hymenoptera, sendo esta última respectiva às abelhas (SIMÕES, 2012). Nas abelhas, doença possui duas espécies envolvidas na etiopatogenia, a *Nosema apis*, que foi identificada inicialmente nas abelhas europeias *Apis mellifera* (ZANDER, 1909), e a *Nosema ceranae*, proveniente das abelhas asiáticas *Apis cerana* (FRIES et al., 1996) (Figura 02). Entretanto, ambas as espécies são encontradas parasitando *A. mellifera*, tanto em infecções individuais como em co-infecções (FRIES, 2006).

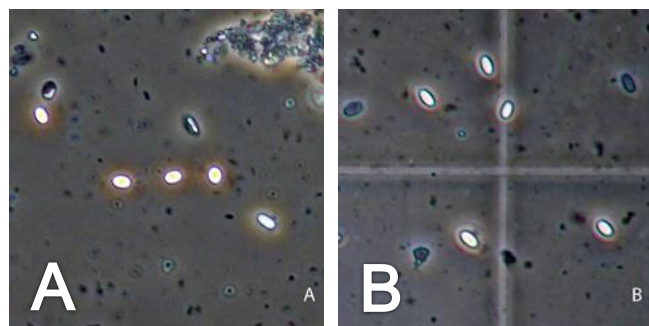


Figura 02: Microscopia ótica de esporos maduros de *Nosema apis* (A) e *Nosema ceranae* (B) presentes em *A. mellifera*. Fonte: Huang, W. F. (2012).

O ciclo de vida de *Nosema* se inicia com a contaminação das abelhas via ingestão de esporos junto ao alimento ou pela limpeza de fezes contaminadas na colônia, seguido pela adesão do parasita às células da mucosa intestinal do hospedeiro, afetando as taxas de digestão e assimilação dos nutrientes (FORSGREN & FRIES, 2010). A presença do patógeno ocasiona inflamações no intestino, gerando diarreia e liberação de novos esporos nas fezes. O desenvolvimento de *N. ceranae* no ventrículo das células da mucosa intestinal é semelhante ao da *N. apis*, no entanto, *N. ceranae* completa o seu ciclo de vida três dias antes a *N. apis* (FRIES, 2010). Os esporos gerados possuem uma alta durabilidade nas fezes, solo e em produtos derivados, tais como o mel (PUKER, 2011).

Os parasitas são caracterizados por competirem com os seus hospedeiros por nutrientes, gerando um estresse energético (KLEE et al., 2007). Esse estresse energético pode ser demonstrado diretamente, pela assimilação dos nutrientes pelo parasita, ou através da resposta do hospedeiro, na busca por mais recursos nutricionais e intensificação do sistema imunológico no combate ao patógeno (SCHMID-HEMPEL, 2005).

As infecções por *Nosema* spp. são caracterizadas por ocasionar em abelhas desordens digestivas, fraqueza, incapacidade de voo, aumento das taxas de forrageamento e trofalaxia, diminuição da longevidade dos indivíduos, da população da colmeia e conseqüentemente redução da produção de mel e da capacidade de polinização (CHEN et al., 2008; WILLIAMS, 2000) (Figura 03-A). O intestino de abelhas sadias possui uma coloração marrom-esverdeada e estruturas anelares visíveis, enquanto o intestino de abelhas contaminadas por *Nosema* apresentam uma coloração branca e sem estruturas visíveis (HUANG, 2011) (Figura 03-B).

A introdução de um parasita exótico, o *N. ceranae*, em um novo hospedeiro, a *A. mellifera*, é um fato que desperta preocupação na comunidade científica. A introdução de uma espécie exótica em um ecossistema está associada como um dos principais fatores de perda de biodiversidade, podendo até levar a erradicação do novo hospedeiro (DEREDEC & COURCHAMP, 2003). No entanto, na prática, observa-se que as abelhas *A. mellifera* a cada ano parecem se adaptar a este parasita (PAXTON et al., 2007). O principal efeito da infecção pelo patógeno que tem sido observado é a diminuição da capacidade de absorção dos nutrientes, mas não mais uma morte imediata. O patógeno possui como sua principal finalidade



transformar a abelha em uma máquina de produção de esporos, e não mata-la rapidamente, o que torna a nosemose uma doença tão insidiosa (FORSGREN & FRIES, 2010).

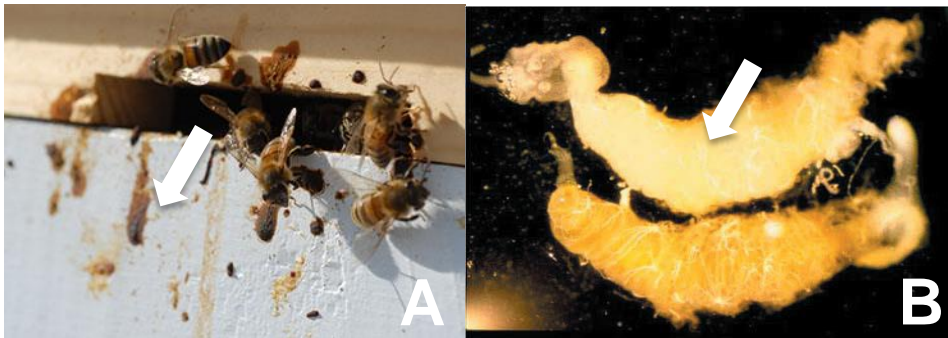


Figura 03: A- Sintoma de diarreia causado por *Nosema* na entrada da colmeia de *A. mellifera*. B- Tecido do intestino (ventrículo) de abelhas *A. mellifera*; acima tecido infectado (branco leitoso) e abaixo tecido sadio (amarelado). Fonte: Broberg, D.; Huang, Z. (2011).

O grau de virulência observado em uma abelha não corresponde necessariamente ao de toda a colônia (FRIES & CAMAZINE, 2001). O parasita pode estar presente nas abelhas por períodos prolongados sem causar sintomas em nível de indivíduo e até mesmo de colônia (INVERNIZZI et al., 2009; PAXTON, 2010; FERNÁNDEZ et al., 2012). As infecções por microsporídios são consideradas comuns em abelhas, entretanto, apenas sob condições adversas, como a coexistência com outros patógenos (tais como ácaros, bactérias e vírus), resíduos de agrotóxicos e deficiências no manejo (como escassez de recursos nutricionais e falta de sombreamento nas colônias), é que a relação parasita-hospedeiro costuma resultar em surto da doença e danos à colônia (PUERTA et al., 2001; FRIES, 2010).

Outro aspecto a ser considerado em casos de ausência de sintomas em colmeias infectadas são os processos de co-evolução entre patógeno e hospedeiro, que resulta em adaptações recíprocas, permitindo que os patógenos consigam explorar ao máximo os recursos disponíveis e minimizem os custos da infecção, tais como o estresse nutricional e energético ao hospedeiro (SCHMID-HEMPEL, 2008).

Além disso, acredita-se que as espécies de abelhas apresentam diferenças nas respostas a patógenos, incluindo uma maior resistência. No caso das abelhas africanizadas, que são amplamente distribuídas no Brasil, estudos apontam que elas possuem uma maior resistência a patógenos quando comparada à abelha europeia

(CALDERON et al. 2010; VANDAME & PALACIO, 2010), inclusive para a nosemose (MENDOZA et al., 2013). Mudanças no grau de virulência do parasita ao longo do tempo, especialmente referentes ao *N. ceranae*, ainda são consideradas enigmáticas (PAXTON et al., 2007).

A nosemose tem sido amplamente relacionada ao fenômeno da CCD, juntamente com outros patógenos de grande relevância entre as abelhas, tais como o ácaro *Varroa destructor* (COX-FOSTER et al., 2007). Experimentos realizados indicam que estes patógenos não podem ser direcionados como a única causa da CCD, mas podem estar envolvidos neste fenômeno, por meio de fatores que atuam de modo sinérgico (CORNMAN et al., 2012). Ainda são necessários novos estudos, para que possa se obter uma melhor compreensão acerca destes patógenos, seus efeitos e o processo de co-evolução com as abelhas.

### **3.3.1 Métodos de identificação de *Nosema* spp.**

Existem diferentes métodos biotecnológicos registrados para o diagnóstico dos patógenos *Nosema* spp. em abelhas e produtos derivados (FRIES et al., 2013). Previamente ao diagnóstico em laboratório, o pesquisador pode realizar a avaliação da colônia em campo, através da análise dos aspectos clínicos da doença. Os aspectos clínicos observados na colônia foram descritos separadamente para *N. apis* (FRIES et al., 1993) e *N. ceranae* (HIGES et al., 2008).

Em laboratório, o diagnóstico pode ser feito através da contagem de esporos via microscopia óptica ou eletrônica. As técnicas mais utilizadas para o diagnóstico de nosemoses são a microscopia ótica, utilizando Corante de Giemsa ou Azul de Toluidina, e a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Um microscópio ótico comum com ampliação de 400 vezes é suficiente para observar esporos *Nosema* spp. em amostras de abelhas maceradas. Embora as diferenças no tamanho dos esporos de *N. ceranae* e *N. apis* não sejam imediatamente evidentes no microscópio de luz, existe uma diferença consistente. Os esporos de *N. ceranae* são menores comparados aos esporos de *N. apis*. Esporos de *N. apis* medem aproximadamente 6 x 3 µm (ZANDER & BOTTCHEER, 1984) e os de *N. ceranae* medem aproximadamente 4,7 x 2,7 µm (FRIES et al., 1996). Embora a diferença no tamanho dos esporos entre essas espécies seja clara, ainda pode ser difícil detectar a diferença no diagnóstico de rotina de abelhas

infectadas usando microscopia óptica. O diagnóstico pode dificultar ainda mais em casos de infecções mistas com ambas as espécies (CHEN et al., 2009).

A metodologia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) tem sido utilizada com sucesso para o diagnóstico de *N. apis* (FRIES et al., 1993) e *N. ceranae* (FRIES et al., 1996). Essa técnica produz imagens de alta resolução e permite ampliar o alvo analisado em até um milhão de vezes, gerando um resultado rico em detalhes. A técnica de microscopia eletrônica é mais sensível e permite um diagnóstico mais preciso que a microscopia ótica.

Além das técnicas microscópicas, existem diversos métodos de diagnóstico molecular descritos para nosemose. Os métodos moleculares são considerados mais eficientes para a identificação destes patógenos, por serem mais sensíveis e capazes de detectar quantidades mínimas de *Nosema* nas abelhas e produtos derivados, mesmo em casos de pouco ou nenhum impacto no hospedeiro (FRIES et al., 2013). Uma vantagem adicional dos métodos moleculares, é que a extrema sensibilidade da detecção pode fornecer informações acerca das formas de transmissão até então desconhecidas.

Previamente a realização do diagnóstico molecular, é necessária a realização de um método para a extração do DNA total. Para análises de mel e produtos derivados, as amostras são previamente diluídas em a água destilada visando reduzir a viscosidade e permitir uma maior homogeneização (SCHUCH et al., 2001). Para análises diretas nas abelhas, os métodos de extração utilizam apenas os abdomens, visto que o patógeno está localizado no intestino das mesmas (CARRECK et al., 2013). Foram descritos diferentes métodos para a extração do DNA em abelhas, incluindo maceração em água com posterior germinação de esporos (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007), maceração em nitrogênio (FRIES et al., 2013) e diferentes kits comerciais.

O diagnóstico molecular de *Nosema* é realizado usualmente através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por meio convencional, multiplex ou em tempo real (qPCR ou PCR quantitativa) (EVANS et al., 2013). Além disso, o diagnóstico pode ser realizado via técnicas de sequenciamento.

Diferentes espécies de *Nosema* foram descritas e podem ocorrer de maneira muito abundante em uma amostra (LI et al., 2012), para detectar estas espécies é recomendado o uso de *primers* específicos na metodologia empregada. Diferentes *primers* já foram descritos na literatura e podem ser empregados em conjunto ou

separadamente (Tabela 01). O uso de diferentes métodos moleculares pode levar a inconsistências, por isso, recomenda-se que os protocolos de triagem sejam feitos com Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sejam ajustados para as condições de cada laboratório.

Tabela 01: Lista de *primers* utilizados para a detecção molecular de *Nosema* spp. por PCR – Adaptado de Fries et al., 2013.

Nome	Espécie	Fonte		Sequência do primer (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
218MITOC	<i>N. ceranae</i>	Martín-Hernández et al., 2007	fwd ver	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA CCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG	218 pb
321APIS	<i>N. apis</i>	Martín-Hernández et al., 2007	fwd rev	GGGGGCATGCTTTGACGTA GGGGGCGTTTTAAATGTGAAACAACTATG	321 pb
Mnapis-F	<i>N. apis</i>	Fries et al., 2013	fwd	GCATGTCTTTGACGTA	143 pb
Mnceranae-F	<i>N. ceranae</i>	Fries et al., 2013	fwd	CGTTAAAGTAGATAAGATGTT	224 pb
Muniv-R	<i>N. apis</i> e <i>N. ceranae</i>	Fries et al., 2013	Ver	GACTTAGTAGCCGTCTCTC	143 pb ( <i>N. apis</i> ) e 224 pb ( <i>N. ceranae</i> )
N. ceranae	<i>N. ceranae</i>	Chen et al., 2008	fwd ver	CGGATAAAAGAGTCCGTTACC TGAGCAGGTTCTAGGGAT	250 pb
N. apis	<i>N. apis</i>	Chen et al., 2008	fwd ver	CCATTGCCGATAAGAGAGT CACGCATTGCTGCATCATTGAC	401 pb
Nosema	<i>N. apis</i> e <i>N. ceranae</i>	Chen et al., 2008	fwd ver	GGCAGTTATGGGAAGTAACA GGTCGTACATTTCTCTCT	208 pb ( <i>N. apis</i> ) e 212 pb ( <i>N. ceranae</i> )

### 3.3.2 Tratamento

O tratamento de colmeias infectadas é realizado utilizando o antibiótico fumagilina, testado com eficácia para *N. apis* e *N. ceranae* (HIGES et al., 2011). Embora não elimine todas as estirpes de esporos, reduz drasticamente a taxa de esporos e infecção da colônia. No entanto, a utilização deste fungicida foi proibida na União Europeia devido a presença excessiva de resíduos no mel (GAJGER et al., 2010) e efeitos genotóxicos (STANIMIROVIC et al., 2007). Recentemente, foi lançado um produto natural denominado *Vitafeed Gold* a base de *Beta vulgaris*, mas seus efeitos ainda estão em fase de teste. Existe uma carência no que diz respeito a produtos naturais para o controle da Nosemose, sendo necessárias novas opções disponíveis no mercado.

### 3.3.3 Nosemose no mundo

A noseemose foi relatada pela primeira vez em 1909 (ZANDER, 1909), com a espécie *N. apis* infectando abelhas *A. mellifera* na Europa. Em 1996 foi descoberta uma nova espécie, a *N. ceranae*, infectando abelhas *A. cerane* na Ásia (FRIES et al., 1996). Atualmente, sabe-se que ambas as espécies são encontradas parasitando *A. mellifera*, tanto em infecções individuais como em co-infecções (FRIES, 2006). Além disto, os parasitas já foram detectados em outras espécies de abelhas, como as do gênero *Bombus* (PLISCHUCK et al., 2009) e *Melipona* (PORRINI et al., 2017). A doença é relatada mundialmente e possui registros em todos os continentes, América do Norte (EMSEN et al., 2016), América do Sul (KLEE et al., 2007), Europa (HIGES et al., 2006), África (HIGES et al., 2009), Ásia (CHEN et al., 2009) e Oceania (FRAZER et al., 2016) (Figura 04).

Na América do Sul, se estima que *N. apis* esteja presente há pelo menos 90 anos (MAGGI et al., 2016) e o parasita *N. ceranae* possui o seu primeiro relato em 1979 (TEIXEIRA et al., 2013). No continente, o microsporídio já foi detectado no Brasil (KLEE et al., 2007), Argentina (MEDICI et al., 2012), Chile (MARTÍNEZ et al., 2012), Uruguai (INVERNIZZI et al., 2009), Venezuela (PORRINI et al., 2017), Colômbia (GAMBOA et al., 2015) e Equador (ESPINOSA, 2015).

Altos níveis de *N. ceranae* são relatados mundialmente. Emsen e colaboradores (2016) avaliaram apiários no Canadá e detectaram um intervalo de prevalência de 41-91% para *N. ceranae* e de apenas 4-34% para *N. apis*. No estudo de Gajger e colaboradores (2010) na Croácia, 21 distritos foram avaliados quando a presença de *Nosema*, sendo que *N. ceranae* estava presente em todas as regiões avaliadas com elevados índices e *N. apis* não foi relatado. Chen e colaboradores (2009) avaliaram amostras de abelhas advindas do Japão, China e Taiwan e detectaram *N. ceranae* em 71% das amostras e *N. apis* em 31%.

Na América do Sul, Martínez e colaboradores (2012) avaliaram a ocorrência e distribuição de *Nosema* em apiários do Chile, sendo que 49% das amostras analisadas foram positivas para *N. ceranae* e *N. apis* não foi detectado. Invernizzi e colaboradores (2009) avaliaram amostras de abelhas avindas de diferentes regiões do Uruguai e apenas a espécie *N. ceranae* foi detectada. Na Argentina, Medici e colaboradores (2012) avaliaram amostras de abelhas advindas de 38 municípios do país, sendo que *N. ceranae* estava presente em todos os esporos avaliados e apenas 2,6% eram referentes à *N. apis*.

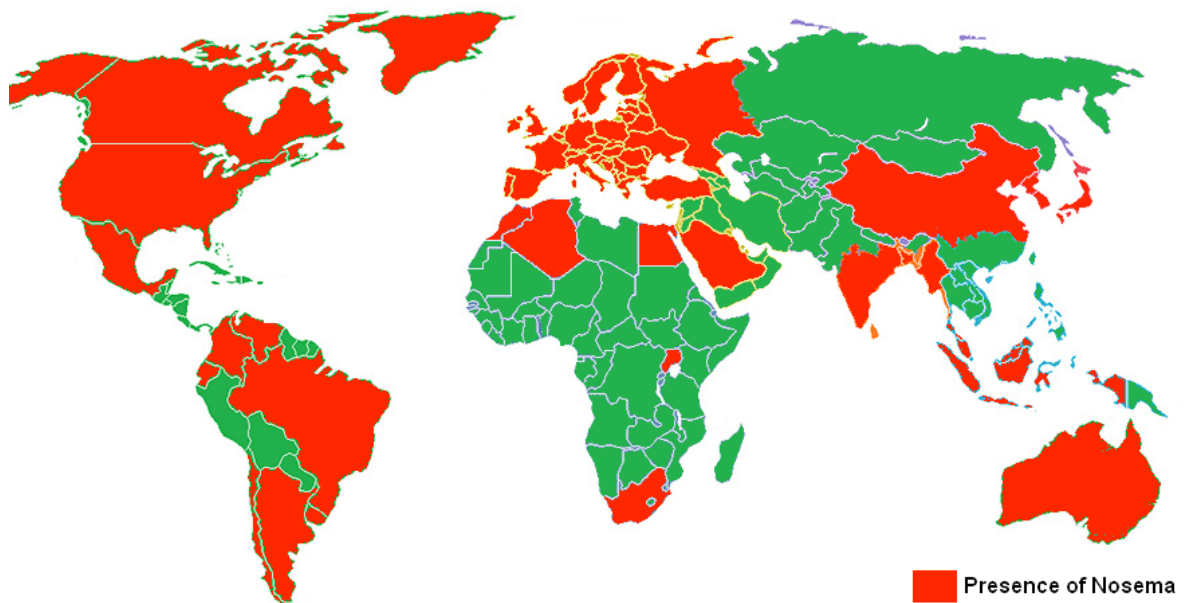


Figura 04: Presença e distribuição de *Nosema* no mundo. Adaptado de Goulson et al. (2015).

Um possível envolvimento do microsporídio *N. ceranae* foi reportado em colapsos de colônias nos Estados Unidos e Europa (COX-FOSTER et al., 2007; PAXTON, 2010), mas sabe-se que o mesmo está presente em todo o mundo. Na

América do Sul, os colapsos ainda não estão sistematicamente documentados, mas há registros da incidência do microsporídio em diversos países, como Argentina (PLISCHUCK et al., 2009), Uruguai (INVERNISI et al., 2009), Chile (MARTINEZ et al., 2012) e Brasil (KLEE et al., 2007).

### 3.3.4 Nosemose no Brasil

Embora o primeiro registro de *Nosema* no Brasil tenha sido feito somente em 2007 (KLEE et al., 2007), recentemente foram realizadas análises moleculares de amostras de abelhas coletadas em 1979 que indicam a presença do microsporídio há pelo menos três décadas (TEIXEIRA et al., 2013). Pesquisas nos estados de São Paulo (KLEE et al., 2007; SANTOS et al., 2014; GUIMARÃES-CESTARO et al., 2016), Paraná (KRUGER, 2015), Mato Grosso (NASCIMENTO, 2016), Rio Grande do Sul (BIZZOTO et al., 2018), Rio Grande do Norte (LIMA et al., 2015), Paraíba (OLINTO, 2014), Piauí (NASCIMENTO & MELQUIADES, 2017) e também no conjunto de 10 estados (São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Maranhão, Ceará, Mato Grosso do Sul, Bahia, Minas Gerais e Goiás) (TEIXEIRA et al., 2013) registraram a presença do microsporídio no país.

A região Nordeste do Brasil possui uma predominância do clima semiárido, este, por sua vez, contém algumas particularidades, tais como a escassez de água e elevadas temperaturas ao longo do ano, sem o sombreamento devido das colmeias (VIDAL, 2017). Existem poucos trabalhos publicados acerca da noseemose na região nordeste (TEIXEIRA et al., 2013; OLINTO, 2014; LIMA et al., 2015; NASCIMENTO & MELQUIADES, 2017), sendo que, nenhum destes contempla unicamente o estado da Bahia. A Bahia é um dos estados mais extensos do país e ocupa a primeira posição na produção de mel da região nordeste (IBGE, 2017), no entanto, apesar da intensa atividade apícola, possui poucas informações acerca da sanidade das abelhas locais, especificamente, acerca da noseemose.

A ampla prevalência da espécie *N. ceranae* em relação a *N. apis* foi também relatada. No Brasil, o estudo de Santos et al. (2014) avaliou a presença de *Nosema* spp em colmeias do Vale do Paraíba, no estado de São Paulo. Foram analisadas 1.668 amostras, sendo que 85.2% estavam infectadas por *N. ceranae*. Também no estado de São Paulo, na região do Vale do Ribeira, foram avaliados os patógenos *V. destructor*, *Nosema* spp e *P. larvae* via diagnóstico molecular (GUIMARÃES-

CESTARO et al., 2016) e o parasita *N. ceranae* foi encontrado em 80% das amostras avaliadas. Kruger (2015) avaliou apiários no Paraná e detectou que todos os esporos identificados eram de *N. ceranae*, sendo apenas 8,6% casos de co-infecção com *N. apis*. Em Mato Grosso, *N. ceranae* foi detectada em 96% das 100 amostras avaliadas e *N. apis* não foi detectado (NASCIMENTO, 2016). Lima et al. (2015) avaliou a presença de *Nosema* spp em amostras de abelhas e pólen advindas do estado do Rio Grande do Norte, neste estudo *N. ceranae* foi encontrado em 60% das amostras de abelhas e 43% do pólen. O estudo realizado por Teixeira et al. (2013) demonstrou alto percentual de *N. ceranae* em todo o Brasil, sendo que, de 637 amostras analisadas, entre 2009 e 2012, oriundas de 47 municípios em 10 estados brasileiros (São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Maranhão, Ceará, Mato Grosso do Sul, Bahia, Minas Gerais e Goiás), 79,9% estavam infectadas, das quais 98,82% eram por *N. ceranae*.

Embora *Nosema* esteja amplamente presente no Brasil, não parece haver um padrão na sua incidência. Não existe uma intensidade da infecção deste microsporídio ao longo do ano definida, assim como uma relação direta com colapsos (PIRES et al., 2016). A falta de registros padronizados e instituições cadastradas para realizar a avaliação da sanidade das abelhas no país dificultam o conhecimento acerca da situação real da nosemose no Brasil.

### **3.3.5 Prevalência de *N. ceranae***

A prevalência de *N. ceranae* em relação a *N. apis* em diferentes países tem sido discutida dentro da perspectiva de uma maior taxa de virulência e fatores evolutivos (NATSOPOULOU et al., 2016). Tendo em vista que o parasita *N. apis* possui uma história de co-evolução mais antiga com seu hospedeiro do que *N. ceranae* (GÓMEZ-MORACHO et al., 2015), busca-se compreender os motivos por trás desta maior prevalência (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2012).

Diferentes estudos foram realizados investigando comparativamente a taxa de virulência de *N. apis* e *N. ceranae* e, dentre os fatores utilizados como parâmetros para avaliação, destacam-se os custos de adaptação para o hospedeiro, taxa de mortalidade, estresse nutricional, imunossupressão e envolvimento na perda de colônias (MAYACK & NAUG, 2009; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2012; DUSSAUBAT et al., 2012; BOTÍAS et al., 2013). Experimentos realizados



demonstram resultados conflitantes com relação à taxa de virulência dos parasitas, existindo resultados de maior virulência registrados para *N. ceranae* (PAXTON et al., 2007; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2012), assim como taxas semelhantes para as duas espécies (MILBRATH et al., 2015; NATSOPOULOU et al., 2016). Estas diferenças podem ser atribuídas aos métodos laboratoriais empregados (MILBRATH et al., 2013), mas ainda são necessários mais estudos para uma melhor compreensão.

Acredita-se que o parasita *N. ceranae* isolado hoje mundialmente, difere do isolado inicialmente na China em 1994, com um possível aumento na sua taxa de virulência (PAXTON et al., 2007). Estudos comparativos de virulência podem auxiliar a explicar porque o parasita *N. ceranae* se tornou dominante em relação a *N. apis* em diversas regiões no mundo e se a variação na taxa de virulência pode ser considerada um reflexo da co-adaptação geográfica entre o hospedeiro e o microsporídeo (NATSOPOULOU et al., 2016).

A prevalência de *N. ceranae* pode ser atribuída também a fatores intrínsecos no processo de co-evolução com o seu hospedeiro, sendo resultado de possíveis adaptações para explorar ao máximo os recursos disponíveis e minimizar os custos da infecção, tais como o estresse nutricional e energético (SCHMID-HEMPEL, 2008). Tendo em vista que a relação entre parasitas e hospedeiros é inerentemente dinâmica, o hospedeiro, por sua vez, pode coevoluir gerando novos genes de resistência para o patógeno (BOURGEOIS et al., 2012).

A hipótese da Rainha Vermelha prevê que as populações hospedeiras e parasitárias tendem a coevoluir mantendo sua aptidão relativa. Uma característica importante desta hipótese é que as pressões de seleção mediadas por parasitas resultam na variabilidade genética da população hospedeira, conferindo resistência ao patógeno (EBERT & HAMILTON, 1996). O estudo de Bourgeois e colaboradores (2012) forneceu a primeira evidência de que abelhas *A. mellifera* de uma linhagem russa desenvolveram uma variação genética de resistência ao parasita *N. ceranae*. Aparentemente, as 150 gerações desta linhagem foram suficientes para que *A. mellifera* pudesse responder a seleção natural e desenvolver a variabilidade genética de resistência ao patógeno. Novos trabalhos, com outras linhagens de abelhas, são necessários para melhor explicar a maior prevalência deste parasita.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Amostragem

O grupo amostral foi composto por abelhas *A. mellifera* coletadas em vinte apiários de seis municípios produtores de mel no estado da Bahia. Os municípios delimitados no estado foram Ribeira do Pombal, Brotas de Macaúbas, Inhambupe, Canavieiras, Ibotirama e Teixeira de Freitas (Figura 05). As amostras foram compostas por cerca de 30 abelhas adultas coletadas no alvado da colmeia e depositadas em recipientes com álcool a 70%. No total, foram coletadas 154 amostras (Tabela 02). As coletas foram realizadas com o apoio dos técnicos da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), sendo uma das atividades do Programa Nacional de Sanidade Apícola (PNSAp) (Figura 06).

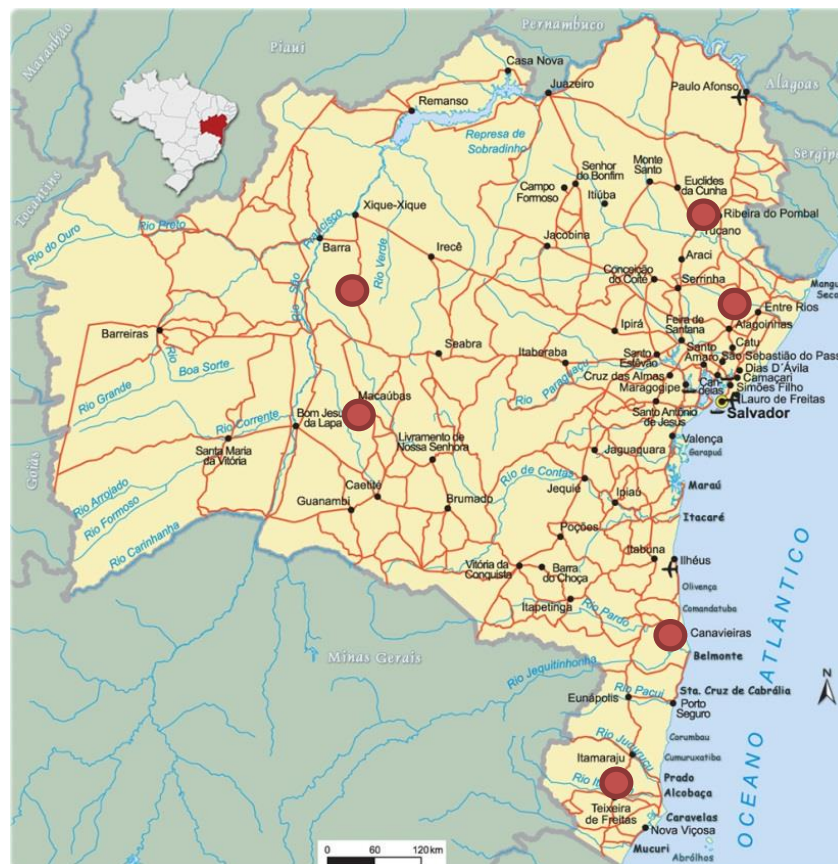


Figura 05: Mapa do estado da Bahia com os seis municípios sinalizados, em vermelho, referentes à coleta das amostras de abelhas *A. mellifera* para os testes moleculares. Fonte: *Google maps*.

Tabela 02: Municípios avaliados no estado da Bahia, número de apiários e amostras coletadas.

Município	Nº de apiários	Nº de amostras coletadas
Brotas de Macaúbas	4	18
Canavieiras	3	18
Ibotirama	4	16
Inhambupe	2	33
Ribeira do Pombal	5	59
Teixeira de Freitas	2	10
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>154</b>

Figura 06: Coleta de amostras de abelhas *A. mellifera* no município de Inhambupe realizada com apoio da equipe técnica da ADAB na Bahia.

## 4.2 Avaliação das colmeias

Os vinte apiários delimitados foram avaliados no período de dois anos e meio (dezembro de 2015 a julho de 2018), com auxílio de fiscais agropecuários da ADAB. As colmeias foram avaliadas quanto aos seguintes sintomas e sinais da nosemose: presença de fezes depositadas na entrada das colônias, mudanças no comportamento alimentar e abelhas mortas pela colmeia (Figura 07).



Figura 07: Monitoramento dos sintomas da nosemose em colmeias do município de Inhambupe.

## 4.3 Análise molecular

Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Campo Avançado da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no Centro Tecnológico de Agropecuária da Bahia (CETAB) em Salvador, Bahia, Brasil.

### 4.3.1 Testes para extração do DNA total

Para a extração do DNA total, foram testadas e comparadas duas metodologias. Os protocolos testados foram o do Manual da *World Organisation for Animal Health* - OIE (2013), referente a extração do DNA total de *Nosema* em abelhas, e o Doyle & Doyle (1987), referente à extração de DNA total de plantas, que foi modificado e adaptado para as amostras de abelhas (Figura 08).

No protocolo descrito pelo Manual da *World Organisation for Animal Health* - OIE (2013) a extração foi realizada a partir de 10-20 abdomens de abelhas adultas, em duplicata. As amostras foram maceradas em 10 ml de água destilada, com o sobrenadante centrifugado a 800 g por 6 minutos e, em seguida, o material obtido foi

submetido a um processo de germinação, induzido por 200 µl de tampão de germinação fresco (0.5 M cloreto de sódio, 0.5 M hidrogenocarbonato de sódio, pH 6.0) e incubado a 37°C por 15 minutos. Após a germinação, é proposto que as demais etapas da extração sejam realizadas com o kit de extração da *Roche Diagnostic* nº 1796828 ou com procedimentos de extração padronizados pelo laboratório, no qual foi escolhido o procedimento padrão do laboratório (extração com CTAB 2%). Foram realizadas modificações no volume de água destilada empregado na maceração (5ml) e no tempo de germinação (30min) para obtenção de melhores resultados.

No protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987), a extração foi realizada a partir do abdômen de 15 abelhas adultas, em duplicata. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, sendo este material submetido a um tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,2 M, Tris HCl 100 mM, EDTA 30mM, Mercaptoetanol 0,2%, Proteinase K 0,3 mg/µl, ddH<sub>2</sub>O), seguido de incubação em banho-maria à 65°C por 1 hora (vórtex a cada 15 minutos), homogeneização em clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm, coleta do sobrenadante, precipitação final em álcool isopropílico, centrifugação por 15 minutos a 14.000 rpm e ressuspensão em tampão TE (Tris-HCl 1M e EDTA 0,5M) com adição de RNase (10mg/ml). Foram realizadas modificações no processo de maceração, na concentração da solução de extração, no tempo e temperaturas de incubação, processo de limpeza e precipitação do DNA e incremento de proteinase K.

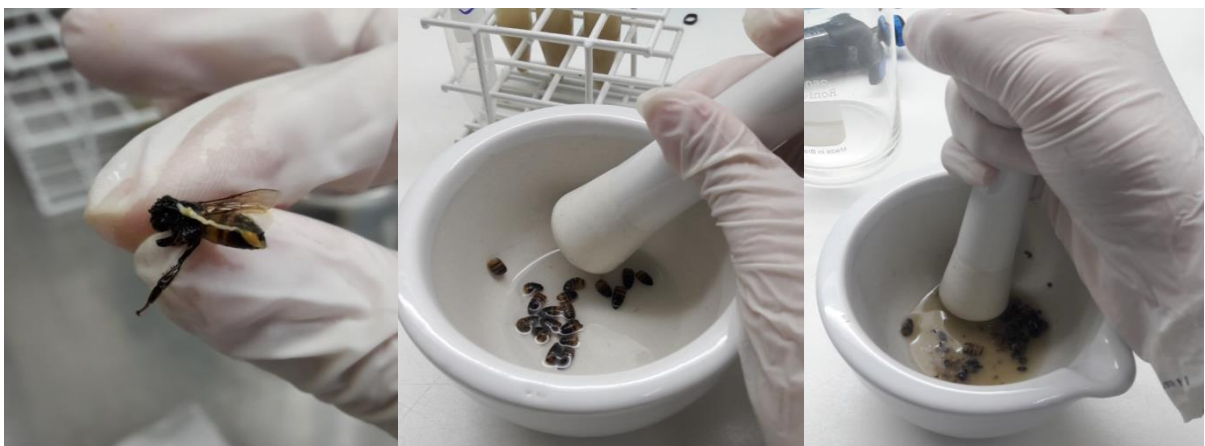


Figura 08: Processo de extração pelo método Doyle & Doyle (1987) modificado.

Todas as amostras de DNA obtidas foram quantificadas com auxílio de um espectrofotômetro, modelo L-Quant® da Loccus Biotecnologia, sendo estimada a contaminação por proteínas pela análise da relação de ácidos nucleicos ( $\lambda = 260\text{nm}$ ) e proteínas ( $\lambda = 280\text{ nm}$ ).

Foi realizada uma PCR a partir do protocolo descrito por Martín-Hernández e colaboradores (2007) para avaliação e comparação entre as técnicas de extração avaliadas (Figura 09). Foi observado que o método de extração Doyle & Doyle (1987) gerou um padrão de bandas mais nítidas do que o Manual OIE (2013). Isso pode ser confirmado com a observação das canaletas 23 a 28 da figura 07, onde os fragmentos positivos para o patógeno *N. ceranae* (218pb) do método Doyle & Doyle (1987) possuem um padrão de bandas mais fortes. Após a comparação, o método de Doyle & Doyle (1987) adaptado foi escolhido para realizar os diagnósticos moleculares do grupo amostral deste estudo.

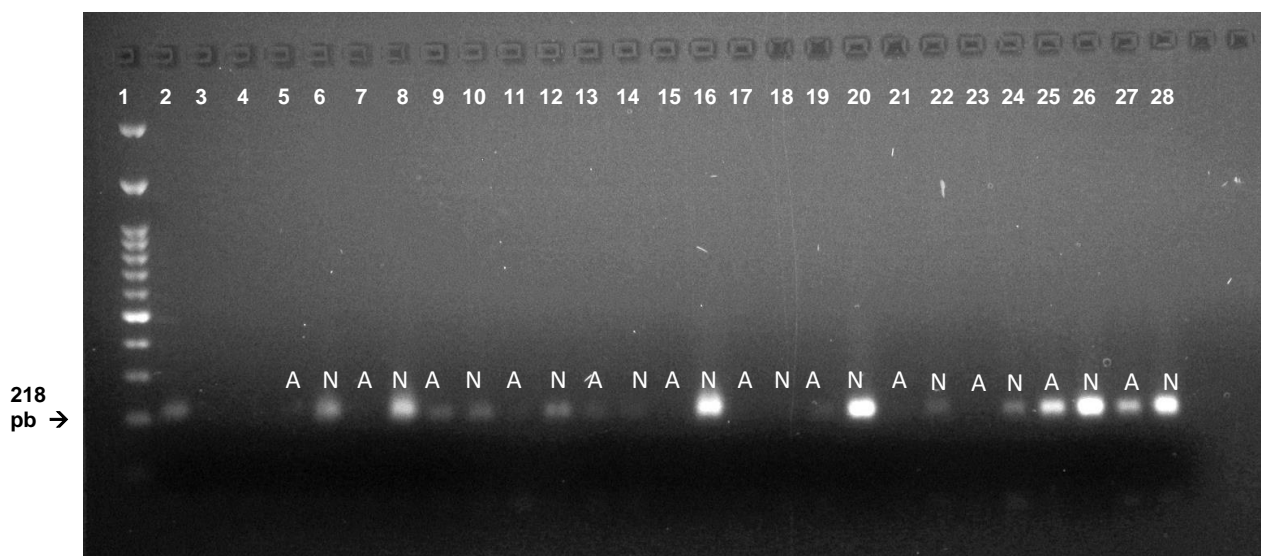


Figura 09: Gel de agarose 2% com os produtos de amplificação do DNA total utilizando os *primers* 218MITOC-F e 218MITOC-R para comparação entre os métodos de extração do Manual da OIE (2013) e Doyle & Doyle (1987). Canaletas A: Produtos do método OIE; Canaletas N: Produtos do método Doyle e Doyle. 1: Marcador de peso molecular (100 a 1200 pb); 2: Controle positivo; 3 e 4: Controles negativos; 5 a 28: Produtos da PCR (positivos com 218 pb).

#### 4.3.2 Testes para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi o método empregado para o diagnóstico molecular dos patógenos estudados (*N. apis* e *N. ceranae*). Foram

testados dois protocolos, sendo eles a PCR convencional adaptada de Martín-Hernández et al. (2007) e a PCR multiplex adaptada de Fries et al. (2013).

A PCR convencional descrita por Martín-Hernández et al. (2007) foi utilizada apenas para a detecção da espécie *N. ceranae*. Foram empregados os *primers* 218MITOC-F e 218MITOC-R, com fragmentos positivos respectivos a 218pb (Figura 10). As concentrações dos reagentes empregadas no protocolo foram modificadas (dNTPs 0.2 mM, Tris/KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM, Taq 1U, *primers* 0.5 mM e DNA a 5 ng). No ciclo de reação foram realizadas modificações nas temperaturas de desnaturação e anelamento (95°C 2 min x1; 95°C 30s, 55°C 30s e 72°C 60s x35; 72°C 5 min x1).

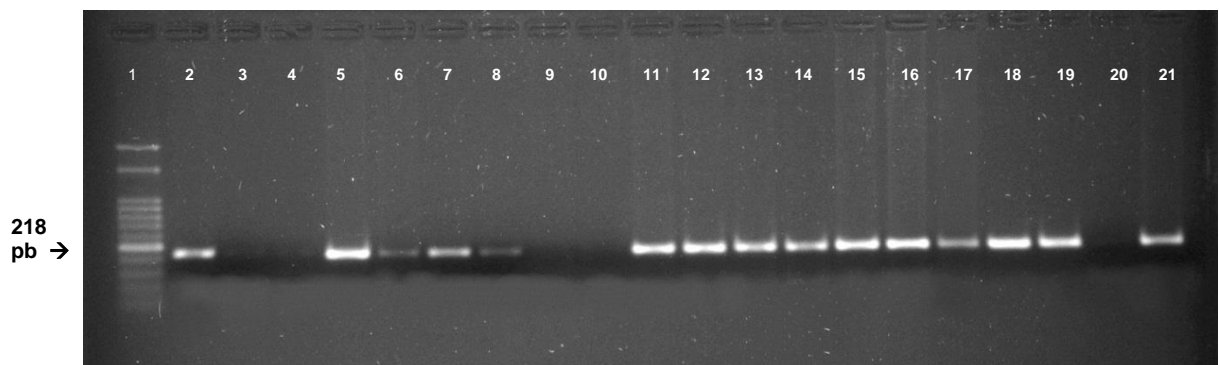


Figura 10: Gel de agarose 2% com os produtos de amplificação do DNA total obtidos de amostras de abelhas (*A. mellifera*) utilizando os *primers* 218MITOC-F e 218MITOC-R. 1: Marcador de peso molecular (50 a 1000 pb); 2: Controle positivo; 3 e 4: Controles negativos; 5 a 21: Produtos da PCR (positivos com 218 pb).

No método de PCR multiplex proposto por Fries et al. (2013), foi realizada a detecção conjunta das espécies *N. apis* e *N. ceranae*. Foram empregados os *primers* Mnapis-F, Mnceranae-F e Muniv-R. Sendo o *primer* Mnapis-F referente ao parasita *N. apis*, com fragmento positivo de 224pb e o *primer* Mnceranae-F referente ao parasita *N. ceranae*, com fragmento positivo de 143pb (Figura 11). As concentrações dos reagentes empregados foram modificadas (dNTPs 0.2 mM, 1x Tris/KCl, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM, Taq 1U, 0.4 mM de *primers*-F, 0.5 mM de *primer*-R e 5 ng de DNA). O ciclo de reação foi semelhante ao descrito, com uma modificação na temperatura de anelamento (95°C 2 min x1; 95°C 30s, 57°C 30s e 72°C 60s x35; 72°C 5 min x1).

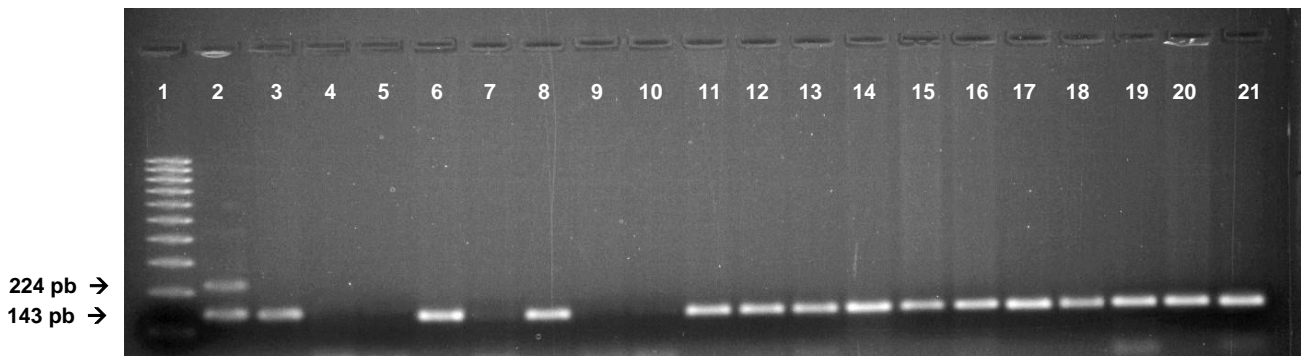


Figura 11: Gel de agarose 2% com os produtos de amplificação do DNA total obtidos de amostras de abelhas (*A. mellifera*) utilizando os *primers* Mnceranae-F, Mnapis-F e Muniv-R. 1: Marcador de peso molecular (100 a 1000 pb); 2: Controle positivo para *N. apis* e *N. ceranae*; 3: Controle positivo para *N. ceranae*; 4 e 5: Controles negativos; 6 a 21: Produtos da PCR (224 pb *N. apis* e 143 pb *N. ceranae*).

Todas as análises foram realizadas em triplicatas, incluindo controles negativo (amostra não infectada) e positivo (amostra infectada). Os produtos de PCR foram corados com brometo de etídio e submetidos à corrida eletroforética em tampão TBE 1X em gel de agarose a 2% por 2 horas a 110 volts. A análise dos padrões de bandas obtidos foi feita por meio da revelação em luz ultravioleta, utilizando o fotodocumentador modelo LTB 20x20 HE da Loccus Biotecnologia.

O controle positivo de *N. ceranae* pertence ao banco de DNA do laboratório de Biologia Molecular do CETAB e o controle positivo de *N. apis* foi fornecido pelo *Centro de Investigación Apícola y Agroambiental* de Marchamalo, na Espanha. O protocolo de PCR multiplex adaptado de Fries e colaboradores (2013) foi escolhido para realizar os diagnósticos moleculares do grupo amostral deste estudo.

### 4.3.3 Sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR de dois isolados utilizando os *primers* 218MITOC-F e 218MITOC-R foram enviados para sequenciamento na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em Salvador, para confirmação da espécie identificada.

Os resultados do sequenciamento foram inicialmente submetidos ao programa *Chromas* (versão 2.6) para visualizar as sequências obtidas no editor de cromatogramas. Em seguida, as sequências geradas foram inseridas no programa online *Clustal Omega*, para realizar o alinhamento das múltiplas sequências. Por fim, as sequências foram inseridas no banco de dados online BLAST (*Basic Local*



*Alignment Search Tool*) para realizar a análise de cobertura. No programa BLAST, após o cálculo de significância estatística, a amostra sequenciada foi considerada com 100% de identidade com sequências nucleotídicas do gene da subunidade menor ribossomal de *N. ceranae* (Figura 12).

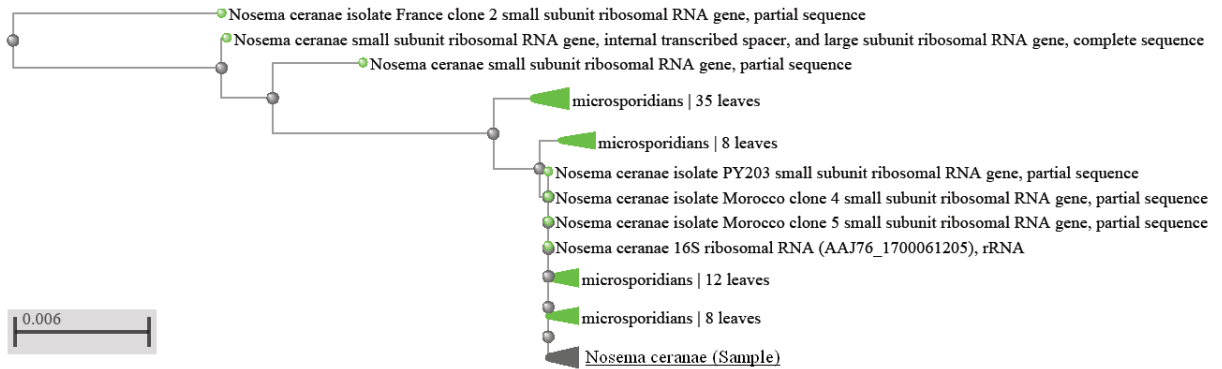


Figura 12: Cladograma da amostra sequenciada de *N. ceranae* gerado pelo programa BLAST.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O artigo intitulado “Asymptomatic presence of *Nosema ceranae* from apiaries of Bahia State, Brazil” foi submetido à revista *Journal of Invertebrate Pathology* para publicação.

### **Asymptomatic presence of *Nosema ceranae* from apiaries of Bahia State, Brazil**

Vivian Marina Gomes Barbosa Lage<sup>a</sup>; Camila Dias Santana<sup>b</sup>; Epaminondas do Patrocínio<sup>c</sup>; Rejane Peixoto Noronha<sup>d</sup>; Ricardo Lopes de Melo<sup>e</sup>; Cristiane de Jesus Barbosa<sup>c</sup>; Suzana Telles da Cunha Lima<sup>f\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Brasil.

<sup>b</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Centro Tecnológico de Agropecuária da Bahia – CETAB, Brasil.

<sup>c</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Mandioca e Fruticultura, Brasil.

<sup>d</sup>Programa de Sanidade Apícola, Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB, Brasil.

<sup>e</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia – IFBA, Brasil.

<sup>f</sup> Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia - LABBIOTEC, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia - UFBA, Brasil.

\*Corresponding author. Email: stcunhalima@ufba.br

#### **Abstract**

*Nosema* is considered one of the most important diseases among bees, caused by microsporidia fungi of the genus *Nosema spp.* The disease is cited as one of the factors related to Colony Collapse Disorder (DCC), characterized by the early death of bee populations. *Nosema* disease may be caused by *Nosema apis* or *N. ceranae*, the latter being reported as the most prevalent in the world and in Brazil. However, little is known about occurrence and distribution in the State of Bahia. The aim of this study was to identify the occurrence and distribution of parasites *N. apis* and *N. ceranae* in *Apis mellifera L.* bees collected in apiaries of Bahia, Brazil. Bee samples were collected in 20 apiaries of six bee regions of the State were analyzed. The hives were followed regarding the symptoms and signs of the disease, from December 2015 to July 2018, however no apparent symptom was found. The molecular diagnosis was carried out via polymerase chain reaction (PCR). From 154 samples analyzed, 96 were infected by *N. ceranae* and *N. apis* species was not detected. *N. ceranae* pathogen was found in samples from all six regions evaluated. This result is consistent with others already published, in which *N. ceranae* has been found in high frequency and *N. apis* is almost not reported. The samples were sequenced to confirm the species identified and were considered with 100% identity with the nucleotide sequences of the smaller subunit of ribosomal gene from *N. ceranae*. The absence of symptoms regardless the high level of infection is discussed in this article.

**Keywords:** bees, beekeeping, Nosema, parasite, collapse of colonies.

## 1. Introduction

Bee populations have suffered a sudden reduction worldwide known as Colony Collapse Disorder (DCC). Among the factors associated as possible causes of this syndrome, the fungi Nosema (PAXTON, 2010) is one of them. Nosema is an important disease among bees, caused by parasites of the genus Nosema, currently classified as Microsporidia fungi (ADL et al., 2005). They are obligatory intracellular parasites that grow in the intestinal mucosa cells of the host, transmitted horizontally through fecal-oral way (GISDER et al., 2011). Among other symptoms, it includes digestive disorders, changes in feeding behavior and early death of bees (RITTER, 2001).

The disease has only two species involved in the ethiopathogeny, *Nosema apis*, that was initially identified in *Apis mellifera* (ZANDER, 1909), and *Nosema ceranae*, from the Asian bee *Apis cerana* (FRIES et al., 1996). However, both species are found parasitizing *A. mellifera*, individually or as co-infections (FRIES, 2006).

Nosema disease has worldwide distribution, but its occurrence is still poorly known in Brazil (PIRES et al., 2016). Although the first record of the pathogen in the country was in 2007 (KLEE et al., 2007), recently molecular analyses were performed from bee samples collected in 1979 that indicate the presence of the microsporidian for at least three decades (TEIXEIRA et al., 2013). The published works about the occurrence of Nosema in Brazil suggests that the disease is widespread in the country (KLEE et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2014; KRUGER, 2015; LIMA et al., 2015; GUIMARÃES-CESTARO et al., 2016; NASCIMENTO, 2016).

The Brazilian Northeast, due to climatic and floristic characteristics, has great competitiveness in the beekeeping market (VIDAL, 2017). The State of Bahia occupies the first position in the production of honey in the Northeast region and sixth national placement, with 3,590 tons produced last year (IBGE, 2017). Despite the intense beekeeping activity, there is little information about the sanity of local bees.

The study of Teixeira et al. (2013), investigated the occurrence and distribution of Nosema in samples coming from 10 Brazilian States, including Bahia, and detected the presence of *N. ceranae*. There are no other published works about Nosema in the State.

In view of the large size of Bahia State, intense beekeeping activity and shortage of jobs, there is a high demand for information about Nosema disease. The objective of this study was to evaluate the occurrence and distribution of *N. ceranae* and *N. apis* in apiaries from different regions of Bahia State.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Sampling**

The sample group was composed of *A. mellifera* bees collected in twenty apiaries from six producers counties in the State of Bahia: Ribeira do Pombal, Brotas Macaúbas Inhambuê, Canavieiras, Ibotirama and Teixeira de Freitas. The samples were composed by adult bees collected in the hive entrance and deposited in flasks with 70% alcohol. In total, 154 samples were collected, and each one was composed of about 30 bees. The collections were made with the support of the technicians from the State Agency of Agriculture Defense of Bahia (ADAB), being one of the activities of the National Apiculture Health Program (PNSAp).

### **2.2 Evaluation of hives**

The twenty apiaries were evaluated in the delimited period of two and a half years (December 2015 to July 2018), with the help of agricultural supervisors from ADAB. The hives were evaluated regarding symptoms and signs of Nosema, and the factors observed were the presence of feces deposited at the entrance of the colonies, changes in feeding behavior and dead bees by the hive.

### **2.3 Molecular analyses**

The molecular tests were performed in the Laboratory of Molecular Biology of the Advanced Field of EMBRAPA Cassava and Fruit culture, located in the Agricultural Technology Center of Bahia (CETAB) in Salvador, Bahia, Brazil.

#### **2.3.1 DNA extraction**

For DNA extraction of bees, the Protocol described by Doyle & Doyle (1987) was employed, which refers to total DNA extraction of plants, modified and adapted for bee samples. The extraction was performed from the abdomen of 15 adult bees, in duplicate. The samples were macerated in liquid nitrogen and subjected to an extraction buffer (CTAB 2%, NaCl 1,2 M, Tris HCl 100 mM, EDTA 30mM, Mercaptoetanol 0,2%, Proteinase K 0,3 mg/μl,

ddH<sub>2</sub>O), followed by incubation in water bath at 65° C for 1 hour (vortexed every 15 minutes), homogenization in chloroform: isoamyl alcohol (24:1), centrifugation for 10 minutes at 10,000 rpm, supernatant collection, final precipitation in isopropyl alcohol, centrifugation for 15 minutes at 14,000 rpm and resuspension in TE buffer (1 M Tris-HCl and EDTA 0, 5M) with addition of RNase (10 mg/ml). Modifications were carried out in the process of maceration, concentration of the extraction solution, time and temperature of incubation, cleaning process, DNA precipitation and proteinase K increment.

All DNA samples obtained were quantified with a spectrophotometer, model L-Quant® of Loccus Biotechnology, with estimated protein contamination by analysis of the relation between nucleic acid ( $\lambda = 260\text{nm}$ ) and proteins ( $\lambda = 280\text{ nm}$ ) absorbance.

### 2.3.2 Amplification of DNA

The polymerase chain reaction (PCR) was the method employed for the molecular diagnosis of pathogens evaluated (*N. apis* and *N. ceranae*). Two protocols were tested with the conventional PCR adapted of Martín-Hernández et al. (2007) and multiplex PCR adapted of Fries et al. (2013). The conventional PCR described by Martín-Hernández et al. (2007) has been tested only for the detection of the species *N. ceranae*. The primers 218MITOC and 218MITOC-R, were used, with their positive fragments of 218pb. The concentrations of the reagents employed in the Protocol were modified (0.2 mM dNTPs, MgCl<sub>2</sub> Tris/1 x, 2.0 mM KCl, 1U Taq, 0.5 mM primers and 5 ng DNA). In the cycle of reaction modifications to the denaturation and annealing temperature were carried out (95° C 2 min x 1; 95° C 30s, 55° C 72° C 30s and 60s x 35; 72° C 5 min x 1).

In multiplex PCR method proposed by Fries et al. (2013), the joint detection of the species *N. apis* and *N. ceranae* was performed. The primers Mnapis-F, Mnceranae-F and Muniv-R were used, being the Mnapis primer-F for *N. apis*, with 224pb positive fragment and the primer Mnceranae-F, referring for *N. ceranae* parasite, with 143pb positive fragment. The concentrations of the reagents employed were modified (0.2 mM dNTPs, 1 x Tris/KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Taq, 0.4 mM to 0.5 mM, primers of primer-R and 5 ng of DNA). The cycle of reaction was similar to that described, with a modification in the annealing temperature (95° C 2 min x 1; 95° C 30s, 57° C 72° C 30s and 60s x 35; 72° C 5 min x 1).

All samples were carried out in triplicates, including negative (not infected) and positive (infected) controls. PCR products were stained with ethidium bromide and subjected to electrophoresis in 1X TBE buffer and 2% agarose gel for 2 hours at 110 volts. The analysis of band patterns was performed in UV light, using the photodocumentador LTB 20x20 HE from

Mehmedovic Biotechnology and a molecular weight marker 50 to 1000 pb of Thermo Fisher Scientific.

The positive control of *N. ceranae* belongs to the DNA database of the Molecular Biology Laboratory of the CETAB and the positive control of *N. apis* provided by Centro de Investigación Agro-environmental Apícola of Marchamalo, in Spain. The multiplex PCR Protocol adapted from Fries and collaborators (2013) was chosen to perform molecular diagnostics from samples of this study group.

### 2.3.3 DNA sequencing

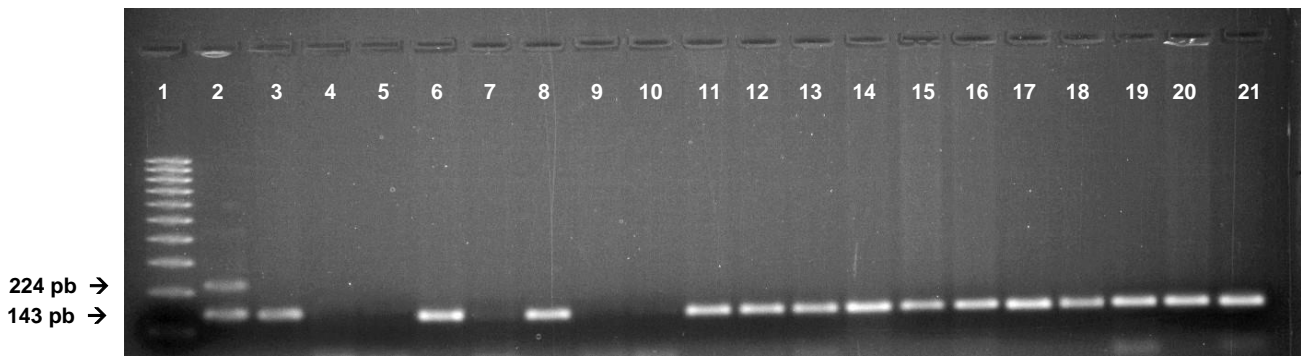
The PCR products of two isolates using the primers 218MITOC-F and 218MITOC-R were sent for sequencing at the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in Salvador, for confirmation of the species identified.

The sequencing results were initially submitted to Chromas program (version 2.6) to view the sequences obtained in the chromatograms. Then the generated sequences have been inserted in the online program *Clustal Omega* to perform the alignment of multiple sequences. Finally, the sequences were inserted into the BLAST database online (Basic Local Alignment Search Tool) to perform the analysis of coverage. In the BLAST program, after the calculation of statistical significance, the sequenced sample was considered to have 100% identity with nucleotide sequences of the smaller subunit ribosomal gene of *N. ceranae*.

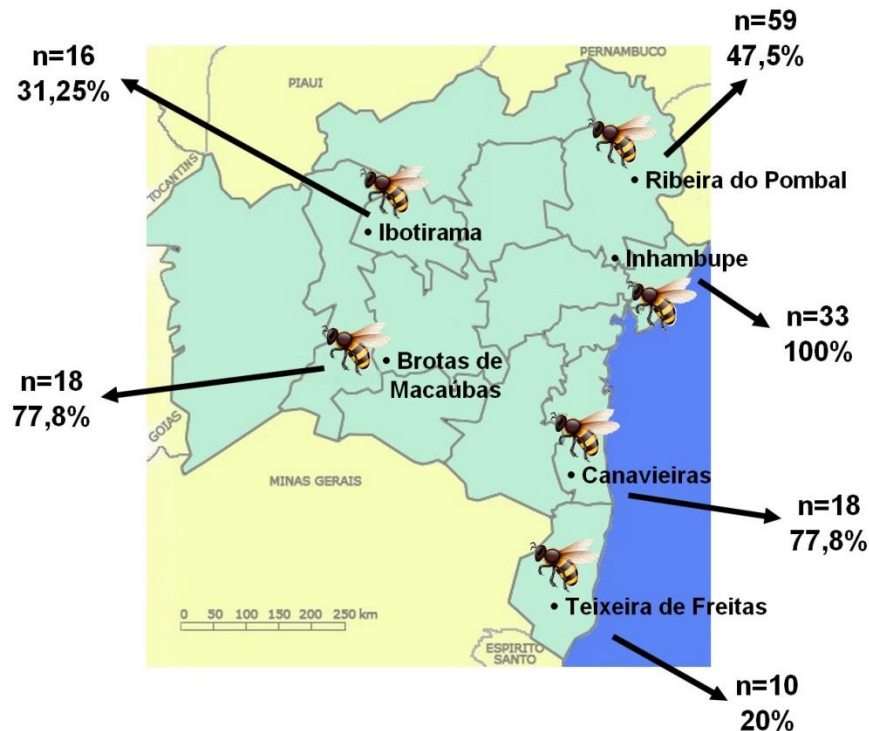
## 3. Results and discussion

The beehives evaluated did not show the presence of feces deposited at the entrance of the colonies, changes in feeding behavior and dead bees by the hive, signs and symptoms described as characteristic of the Nosema (FRIES et al. 1996; HIGES et al. 2007; HUANG & SOLTER, 2013).

154 samples were analyzed from six counties delimited by multiplex PCR, 96 of which were infected by *N. ceranae* (Figure 1), with a total of 62.3%. No sample was infected by *N. apis*. The counties with higher and lower occurrence of *N. ceranae* were, respectively, Inhambupe (100%) and Teixeira de Freitas (20%). The pathogen *N. ceranae* was found in samples coming from all regions evaluated (Figure 2).



**Figure 1.** Agarose gel (2%) with amplification products of total DNA obtained from bees samples (*A. mellifera*) using the primers: Mnceranae-F, Mnapis-F and Muniv-R. 1: Molecular weight marker (100 to 1000 pb); 2: Positive control for *N. apis* and *N. ceranae*; 3: Positive control for *N. ceranae*; 4 and 5: Negative controls; 6 to 21: PCR products (224 pb *N. apis* and 143 pb *N. ceranae*).



**Figure 2.** Distribution of *N. ceranae* in apiaries from Bahia State (n = 154).

The absence of symptoms and signs of infection observed in the beehives evaluated, even with the confirmed presence of *N. ceranae* parasite via molecular diagnosis, has also been reported in other studies, which suggest that this parasite may be present in the bees for prolonged periods without causing symptoms at individual or colony level (INVERNIZZI et al., 2009; PAXTON, 2010; FERNÁNDEZ et al., 2012). Microsporidia infections are considered common in bees, however, only under adverse conditions, such as coexistence

with other pathogens (such as dust mites, bacteria and viruses), residues of pesticides and deficiencies in management (such as shortage of nutritional resources and lack of shading in the colonies), is that the parasite-host relationship usually results in outbreak of disease and damage to the colony (PUERTA et al., 2001; FRIES, 2010).

Another aspect to be considered in the absence of symptoms and signs in infected hives are the processes of co-evolution between pathogen and host, resulting in reciprocal adaptations allowing pathogens manage to exploit to the fullest the capabilities available and minimize the costs of infection, such as nutritional and energetic stress to the host (SCHMID-HEMPEL, 2008). Energy stress of *Nosema* infected bees has been evaluated in several studies, and noted that many of them remain as healthy bees, asymptomatic, without harming the efficiency and productivity of the colony (SHORT et al., 2016). A greater tolerance of the host to the parasite, due to lower cost nutritional energy becomes a viable evolutionary strategy for parasitic species.

In addition, in Brazil most of the bees are Africanized, result of mates between European (*A. mellifera mellifera*) and African (*A. mellifera scutellata*) species, which took place about 50 years ago (JONG, 1996). It is believed that the species of bees differ in responses to pathogens, including greater resistance. In the case of the Africanized bees, studies indicate that they have a higher resistance to pathogens when compared to European bee (CALDERON et al. 2010; MOATAZ & PALACIO, 2010), including for *Nosema* (MENDOZA et al., 2013). Mendoza et al. (2013) compared populations of African and European bees and verified that Africanized bees showed a lower rate of infection by *N. ceranae*, as well as increased population and rate of honey production.

The fact that *N. ceranae* have been detected in samples coming from all regions evaluated in this study reinforces the information found in the literature about the wide distribution of this pathogen. *Nosema* disease was first reported in 1909 (ZANDER, 1909), with the species *N. apis* infecting *A. mellifera* bees in Europe. In 1996 it was discovered a new species, *N. ceranae*, infecting the bee *A. ceranae* in Asia (FRIES et al., 1996). Currently, it is known that both species are found parasitizing *A. mellifera*, individually or as co-infections (FRIES, 2006). In addition, the parasites have been found in other species of bees, as those of the genus *Bombus* (PLISCHUCK et al., 2009) and *Melipona* (PORRINI et al., 2017). The disease is reported worldwide and has records on all continents, North America (EMSEN et al., 2016), South America (KLEE et al., 2007), Europe (HIGES et al., 2006), Africa (HIGES et al., 2009), Asia (CHEN et al., 2009) and Oceania (FRAZER et al. , 2016).



In South America, it is estimated that *N. apis* is present for at least 90 years (MAGGI et al., 2016) and *N. ceranae* parasite had the first report in 1979 (TEIXEIRA et al., 2013). On the mainland, the microsporidian has already been detected in Brazil (KLEE et al., 2007), Argentina (MANNAN et al., 2012), Chile (MARTÍNEZ et al., 2012), Uruguay (INVERNIZZI et al., 2009), Venezuela (PORRINI et al., 2017), Colombia (GAMBOA et al., 2015) and Ecuador (ESPINOSA, 2015).

Although the first record of *Nosema* in Brazil was only in 2007 (KLEE et al., 2007), recently molecular analyses were performed in bee samples collected in 1979 that indicate the presence of the microsporidian for at least three decades (TEIXEIRA et al., 2013).

Researches in the States of São Paulo (KLEE et al., 2007; SANTOS et al., 2014; GUIMARÃES-CESTARO et al., 2016), Paraná (KRUGER, 2015), Mato Grosso (BIRTH, 2016), Rio Grande do Sul (BIZZOTO et al., 2018), Rio Grande do Norte (LIMA et al., 2015), Paraíba (OLYNTHUS, 2014), Piauí (born & MELQUIADES, 2017) and also in a set of 10 States (São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Maranhão, Ceará, Mato Grosso do Sul, Bahia, Minas Gerais and Goiás) (TEIXEIRA et al., 2013) recorded the presence of the microsporidian in the country.

The results of molecular analyses showed the prevalence of *N. ceranae* in this study, which is congruent with reports in other countries (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007; CHEN et al., 2009; GAJGER et al., 2010; EMSSEN et al., 2016), as well as in Brazil (TEIXEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2014; BIRTH, 2016).

High levels of *N. ceranae* are reported worldwide. Emsen and collaborators (2016) evaluated apiaries in Canada and have detected a range of prevalence of 41-91% for *N. ceranae* and only 4-34% to *N. apis*. In the study of Gajger et al. (2010) in Croatia, 21 districts were evaluated about the presence of *Nosema*, and *N. ceranae* was present in all the regions assessed with high rates, while *N. apis* has not been reported. Chen et al. (2009) evaluated bees samples coming from Japan, China and Taiwan and have detected *N. ceranae* in 71% while *N. apis* was present in 31%. In South America, Martínez et al. (2012) evaluated the occurrence and distribution of *Nosema* in apiaries of Chile, with 49% of the samples examined positive for *N. ceranae* while *N. apis* was not detected. Invernizzi et al. (2009) evaluated samples of bees coming from different regions of Uruguay and just the species *N. ceranae* was detected. In Argentina, Medici and collaborators (2012) evaluated samples of bees coming from 38 municipalities in the country, with *N. ceranae* present in all spores analyzed and only 2.6% related to *N. apis*.

In Brazil, the study of Santos et al. (2014) evaluated the presence of *Nosema* spp. in hives of Vale do Paraíba, in the State of São Paulo. 1,668 samples were analyzed, with 85.2% infected with *N. ceranae*. Also in the State of São Paulo, in the region of Vale do Ribeira, the pathogens *V. destructor*, *Nosema* spp and *P. larvae* were evaluated via molecular diagnosis (GUIMARÃES-CESTARO et al., 2016) and *N. ceranae* parasite was found in 80% of the samples studied. Kruger (2015) evaluated apiaries in Paraná and has detected that all spores identified were from *N. ceranae*, only 8.6% being cases of co-infection with *N. apis*. In Mato Grosso, *N. ceranae* was detected in 96% of 100 samples evaluated and *N. apis* not detected at all (BIRTH, 2016). Lima et al. (2015) evaluated the presence of *Nosema* spp. in samples of bees and pollen from the State of Rio Grande do Norte, in this study the parasite *Nosema ceranae* was found in 60% of the bees and 43% of pollen samples. The study carried out by Teixeira et al. (2013) demonstrated high percentage of *N. ceranae* in all Brazil, 637 samples were analysed, between 2009 and 2012, from 47 counties in 10 Brazilian States (São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Maranhão, Ceará, Mato Grosso do Sul, Bahia, Minas Gerais and Goiás) and 79.9% showed to be infected, from which 98.82% were by *N. ceranae*.

The prevalence of *N. ceranae* in relation to *N. apis* in different countries has been discussed within the perspective of a higher rate of virulence and evolutionary factors (NATSOPOULOU et al., 2016). Since the parasite *N. apis* has a history of earliest co-evolution with its host that *N. ceranae* (GÓMEZ-MORACHO et al., 2015), researchers seek to understand the reasons behind this higher prevalence (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2012).

Different studies have been conducted investigating comparatively the rate of virulence of *N. apis* and *N. ceranae* and, among the factors used as parameters for evaluation, it includes the costs of adaptation to the host, mortality rate, nutritional stress, immune suppression and involvement in the loss of colonies (MAYACK & NAUG, 2009; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2012; DUSSAUBAT et al., 2012; BOTÍAS et al., 2013). Experiments have shown conflicting results regarding the virulence rate of the parasite, with greater virulence results registered for *N. ceranae* (PAXTON et al., 2007; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2012), as well as similar rates for both species (MARULE et al., 2015; NATSOPOULOU et al., 2016). These differences can be attributed to protocols employed (MARULE et al., 2013), but further studies are still needed for a better understanding.

It is believed that the parasite *N. ceranae* isolated today worldwide, differ from the initially isolated in China in 1994, with a possible increase in virulence rate (PAXTON et al., 2007). Comparative studies of virulence may help explain why the parasite *N. ceranae*

became dominant in relation to *N. apis* in various regions of the world, and if the variation in virulence rate can be considered a reflection of geographical co-adaptation between the host and the microsporidian (NATSOPOULOU et al., 2016).

The prevalence of *N. ceranae* can be attributed also to intrinsic factors in the process of co-evolution with the host, being a result of possible adaptations to exploit to the maximum the available resources and minimize the costs of infection, such as the nutritional and energetic stress (SCHMID-HEMPEL, 2008). Considering that the relationship between parasites and hosts is inherently dynamic, the host, in the other hand, can co-evolve, generating new resistance genes to the pathogen (BOURGEOIS et al., 2012).

The Red Queen hypothesis predicts that host populations and parasitic diseases tend to co-evolve keeping its relative fitness. An important feature of this hypothesis is that the parasite-mediated selection induces genetic variability of the host population, conferring resistance to the pathogen (EBERT & HAMILTON, 1996). The study of Bourgeois and collaborators (2012) provided the first evidence that *A. mellifera* bees from a Russian lineage have developed a genetic variation of resistance to *N. ceranae* parasite. Apparently, 150 generations of this lineage were enough for *A. mellifera* to answer to natural selection and develop genetic variability for acquiring resistance to the pathogen. New works, with other strains of bees are needed to better explain the higher prevalence of this parasite.

The northeast region of Brazil has a predominance of semi-arid climate, which contains some peculiarities, such as water shortage and high temperatures throughout the year, without the appropriate shading of hives (VIDAL, 2017). 2013; OLINTO, 2014; LIMA et al., 2015; NASCIMENTO & MELQUIADES, 2017. Bahia is one of the largest States in the country and occupies the first position in the production of honey in the Northeast region (IBGE, 2017), however, despite the intense beekeeping activity, it has little information about the sanity of local bees, and especially about the *Nosema* disease.

The results obtained in this study indicate that the microsporidian *N. ceranae* is well diffused in the apiaries of Bahia State and *N. apis* is absent, this data confirms other studies conducted in Brazil, in which the pathogen *N. ceranae* has been detected at high indexes and *N. apis* is poorly reported (KLEE et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2014; KRUGER, 2015; LIMA et al., 2015; GUIMARÃES-CESTARO et al., 2016; BIRTH, 2016). However, the evaluation of signs and symptoms of hives showed a standard symptom-free pattern of the disease in the State of Bahia.

Since the development of *Nosema* disease symptoms can be related to CCD, these results reveal the risk that it represents for beekeeping in Bahia, considering the current

scenario of increasing environmental imbalance, which can act synergistically and boost the appearance of symptoms.

Changes as temperatures rise due to global warming, unavailability of natural resources due to prolonged droughts, appearance of other pathogens, parasites and exogenous predators, beyond the most aggravating problem which is the abusive use of pesticides, can lead to an epidemic of the disease in our terms (PAXTON, 2010; PIRES et al., 2016), having the death of bee populations as a final consequence. On the other hand, there are still little apiculture health information in Brazil due to the lack of research and monitoring officers in the States, in addition to resources for implementation of routines in qualified laboratories. In view of this scenario, this work reveals itself as an important contribution to the knowledge of the Brazilian bee health, which can contribute to future development of a strategy for management of the disease.

### **Acknowledgments**

To *Centro de Investigación Apícola y Agroambiental* de Marchamalo, in Spain, for the positive control of *N. apis*. To *Agência Estadual de Defesa Agropecuária -ADAB*, for providing the resources and funding for the project. To *Embrapa Mandioca e Fruticultura* for technical support in the establishment and optimization of the molecular diagnosis. To *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES*, for financing the scholarship.

### **References**

- ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 399-451, 2005.
- BIZZOTO, L. A.; SANTOS, R. S. S.; BOFF, M. I. C. Parasitism by *Varroa* and *Nosema* sp in beehives used for apple tree pollination. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 3, p. 773-778, 2018.
- BOTIAS, C. MARTÍN-HERNANDEZ, R.; BARRIOS, L.; MEANA, A.; HIGES, M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. **Veterinary Research**, v. 44, n. 25, 2013.

BOURGEOIS, A. L.; RINDERER, T. E.; SYLVESTER, H. A.; HOLLOWAY, B.; OLDROYD, B. P. Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects. **Apidology**, v. 43, p. 539-548, 2012.

CALDERON, R. A.; VAN VEEN, J. W.; SOMMEIJER, M. J.; SANCHEZ, L. A. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, p. 281–297, 2010.

CHEN, Y.; EVANS, J. D.; ZHOU, L.; BONCRISTIANI, H.; KIMURA, K.; XIAO, T.; LITKOWSKI, A. M.; PETTIS, J. S. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 204-209, 2009.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11 – 15, 1987.

DUSSAUBAT, C.; BRUNET, J. C.; HIGES, M.; COLBOURNE, J. K.; LOPEZ, J.; CHOI, J. H.; MARTÍN-HERNANDÉZ, R.; BOTIAS, C.; COUSIN, M.; MCDONNELL, C.; BONNET, M.; BELZUNCES, L. P.; MORITZ, R. F. A.; CONTE, Y. L.; ALAUX, C. Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.

EBERT, D.; HAMILTON, W. D. Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 2, p. 79-82, 1996.

EMSEN, B.; GUZMAN-NOVOA, E.; HAMIDUZZAMAN, M. M.; ECCLES, L.; LACEY, B.; RUIZ-PÉREZ, R. A.; NASR, M. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. **Parasitology research**, v. 115, p. 175-181, 2016.

ESPINOSA, J. L. V. **Prevalencia de *Nosema* (*Nosema spp*) em colmenares de la región norte y centro norte del Ecuador**. Ecuador, 2015. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador.

FERNÁNDEZ, J. M.; PUERTA, F.; COUSINOU, M.; DIOS-PALOMARES, R.; CAMPANO, F.; REDONDO, L. Asymptomatic presence of *Nosema spp* in Spanish commercial apiaries. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, p. 106-110, 2012.

FRAZER, J. L.; THAM, K. M.; REID, M.; ANDEL, M. V.; MCFADDEN, A. M. J.; FORSGREN, E.; PETTIS, J. S.; PHARO, H. First detection of *Nosema ceranae* in New Zealand honey bees. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 4, 2016.

FRIES, I.; FENG, F.; SILVA, A.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, v. 32, p. 356 – 365, 1996.

FRIES, I.; MARTÍN, R.; MEANA, A.; GARCÍA-PALENCIA, P.; HIGES, M. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. **Journal of Apicultural Research**, v. 45, n.3, p. 230-233, 2006.

- FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 73-79, 2010.
- GAJGER, I. T.; VUGREK, O.; GRILEC, D.; PETRINEC, Z. Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 9, p. 457-462, 2010.
- GAMBOA, V.; RAVOET, J.; BRUNAIN, M.; SMAGGHE, G.; MEEUS, I.; FIGUEROA, J.; RIAÑO, D.; GRAAF, D. C. Bee pathogens found in *Bombus atractus* from Colombia: A case study. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 129, p. 36-39, 2015.
- GISDER, S.; MOCKEL, N.; LINDE, A.; GENERSCH, E. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee pathogenic microsporidia. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 404-413, 2011.
- GÓMEZ-MORACHO, T.; BARTOLOMÉ, C.; BELLO, X.; MARTÍN-HERNANDÉZ, R.; HIGES, M. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, p. 87-94, 2015.
- GUIMARÃES-CESTARO, L.; SERRÃO, J. E.; ALVES, M. L. T. M. F.; MESSAGE, D.; TEIXEIRA, E. W. A scientific note on occurrence of pathogens in colonies of honey bee *Apis mellifera* in Vale do Ribeira, Brazil. **Apidologie**, 2016.
- HIGES, M.; MARTÍN-HERNANDÉZ, R.; MEANA, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, p. 93-95, 2006.
- HIGES, M.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, p. 211-217, 2007.
- HIGES, M.; MARTÍN-HERNANDÉZ, R.; GARRIDO-BAILÓN, E.; BOTIAS, C.; MEANA, A. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 48, n. 3, p. 217-219, 2009.
- HUANG, W. F.; SOLTER, L. F. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, n. 1, p. 35-41, 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da pecuária municipal. IBGE (2017). Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2016\\_v44\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf)>. Acesso em: 31/05/2018.
- INVERNIZZI, C.; ABUD, C.; TOMASCO, I. H.; HARRIET, J.; RAMALLO, G.; CAMPÁ, J.; KATZ, H.; GARDIOL, G.; MENDOZA, Y. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 150-153, 2009.
- JONG, D. D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, n. 2, p. 67-70, 1996.

KLEE, J.; BESANA, A. M.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; NANETTI, A.; TAM, D. Q.; CHINH, T. X.; PUERTA, F.; RUZ, J. M.; KRYGER, P.; MESSAGE, D.; HATJINA, F.; KORPELA, S.; FRIES, I.; PAXTON, R. J. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 96, p. 1-10, 2007.

KRUGER, E. **Ocorrência de *Nosema ceranae*, *Nosema apis* e de *Varroa destructor* em abelhas africanizadas: Características de tolerância e produtividade das colônias**. Paraná, Brasil, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, Coordenadoria de Pós-Graduação, Universidade Católica do Paraná.

KURZE, C.; MAYACK, C.; HIRCHE, F.; STANGL, G. I.; CONTE, Y. L.; KRYGER, P.; MORITZ, R. F. A. *Nosema* spp infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. **Parasitology research**, v. 115, n. 6, p. 2381-2388, 2016.

LIMA, T. S.; MENEZES, M. C.; BRITO, P. D.; SOUZA, F. A.; FREITAS, C. I. A.; MESSAGE, D. Meios de dispersão de *Nosema ceranae* em *Apis mellifera* Africanizada no município de Mossoró - RN. **Ciência veterinária nos trópicos**, v. 18, n 2, p. 193-196, 2015.

MAGGI, M.; ANTÚNEZ, K.; INVERNIZZI, C.; ALDEA, P.; VARGAS, M.; NEGRI, P.; BRASESCO, C.; JONG, D. D.; MESSAGE, D.; TEIXEIRA, E. W.; PRINCIPAL, J.; BARRIOS, C.; RUFFINENGO, S.; SILVA, R. R.; EGUARAS, M. Honey health in South America. **Apidologie**, v. 47, p. 835-854, 2016.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A.; PRIETO, L.; SALVADOR, A. M.; BAILON, E. G.; HIGES, M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6331-6338, 2007.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; BOTIAS, C.; BAILON, E. G.; SALVADOR, A. M.; PRIETO, L.; MEANA, A.; HIGES, M. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 2127-2138, 2012.

MARTÍNEZ, J.; LEAL, G.; CONGET, P. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. **Parasitology Research**, v. 111, p. 601-607, 2012.

MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 3, p. 185-188, 2009.

MEDICI, S. K.; SARLO, E. G.; PORRINI, M. P.; BRAUNSTEIN, M.; EGUARAS, M. J. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. **Parasitology research**, v. 110, p. 859-864, 2012.

MENDOZA, Y.; ANTÚNEZ, K.; BRANCHICCELA, B.; ANIDO, M.; SANTOS, E.; INVERNIZZI, C. *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 224-234, 2013.

MILBRATH, M. O.; XIE, X.; HUANG, Z. Y. *Nosema ceranae* induced mortality in honey bees (*Apis mellifera*) depends on infection methods. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 42-44, 2013.

MILBRATH, M. O.; TRAN, T. V.; HUANG, W. F.; SOLTER, L. F.; TARPY, D. R.; LAWRENCE, F.; HUANG, Z. Y. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 9-15, 2015.

NASCIMENTO, E. G. M. **Caracterização da apicultura e prevalência de *Nosema ceranae* na Mesorregião Norte Mato-Grossense**. Mato Grosso, 2016. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Coordenadoria de Pós Graduação, Universidade Federal de Mato Grosso.

NASCIMENTO, J. J. S.; MELQUIADES, C. C. V. **Sanidade de enxames de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) durante o período seco do semiárido Piauiense**. Pesquisas e ações do grupo de estudos sobre abelhas do semiárido piauiense, Universidade Federal do Piauí, 2017.

NATSOPOULOU, M. E.; DOUBLET, V.; PAXTON, R. J. European isolates of the Microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees. **Apidologie**, v. 47, n. 57-65, 2016.

OLINTO, F. A. **Comportamento higiênico e identificação de patógenos em colmeias de *Apis mellifera* L. africanizadas no sertão paraibano**. Paraíba, 2014. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais). Coordenadoria de Pós Graduação, Universidade Federal de Campina Grande.

PAXTON, R. J.; KLEE, J.; KORPELA, S.; FRIES, I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. **Apidologie**, v. 38, p. 1–9, 2007.

PAXTON, R. J. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 80-84, 2010.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: Há casos de CCD? **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

PLISCHUCK, S.; MARTÍN-HERNANDEZ, R.; PRIETO, L.; LUCIA, M.; BOTIAS, C.; MEANA, A.; ABRAHAMOVICH, A. H.; LANGE, C.; HIGES, M. South American native bumblebees (Hymenoptera:Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 2, p. 131-135, 2009.

PORRINI, L. P.; PORRINI, M. P.; GARRIDO, P. M.; PRINCIPAL, J.; SUAREZ, C. J. B.; BIANCHI, B.; IRIARTE, P. J. F.; EGUARAS, M. J. First identification of *Nosema ceranae* (Microsporidia) infecting *Apis mellifera* in Venezuela. **Journal of Apicultural Science**, v. 61, n. 1, p. 149-152, 2017.

PORRINI, M. P.; PORRINI, L. P.; GARRIDO, P. M.; NETO, C. M. S.; PORRINI, D. P.; MULLER, F.; NUNEZ, L. A.; ALVAREZ, L.; IRIARTE, P. F.; EGUARAS, M. J. *Nosema ceranae* in South American Native Stingless Bees and Social Wasp. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 4, p.761-764, 2017.



PUERTA, F.; FLORES, J. M.; RUÍZ, J. A.; RUZ, J. M.; CAMPANO, F. **Enfermedades de las abejas: Prevención, diagnóstico y tratamiento.** Unión de Agricultores y Ganaderos de Andalucía (Ed), 186 p., 2001.

RITTER, W. **Enfermedades de las abejas.** Acribia S. A. (Ed.), 154 p. Spain, 2001.

SANTOS, L. G.; ALVES, M. L. T. M. F.; MESSAGE, D.; PINTO, F. A.; SILVA, M. V. G. B.; TEIXEIRA, E. W. Honey Bee Health in Apiaries in the Vale do Paraíba, São Paulo State, Southeastern Brazil. **Sociobiology**, v. 61, n. 3, p. 307-312, 2014.

SCHMID-HEMPEL, P. Parasite immune evasion: a momentous molecular war. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 6, p. 318-326, 2008.

TEIXEIRA, E. W.; SANTOS, L. G.; SATTLER, A.; MESSAGE, D.; ALVES, M. L. T. M. F.; MARTINS, M. F.; GRASSI-SELLA, M. L.; FRANCOY, T. M. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 250 - 254, 2013.

VANDAME, R.; PALACIO, M. A. Preserved honey bee health in Latin America: A fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 243–255, 2010.

VIDAL, M. F. Desempenho da apicultura nordestina em anos de estiagem. **Caderno Setorial – ETENE**, v. 2, n. 11, p. 2-10, 2017.

ZANDER, E. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. **München Bienenztg**, v. 31, p. 196-204, 1909.

## 6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

### Conclusões

- O microsporídio *N. ceranae* foi detectado em 96 das 154 amostras avaliadas, totalizando 62,3% e *N. apis* não foi detectado.
- Os municípios com maior e menor ocorrência de *N. ceranae* foram, respectivamente, Inhambupe (100%) e Teixeira de Freitas (20%).
- O patógeno *N. ceranae* foi encontrado em amostras advindas de todas as seis regiões avaliadas.
- A avaliação dos sintomas e sinais das colmeias revelou que as mesmas apresentam um padrão assintomático da doença no estado da Bahia.
- Foram estabelecidas e otimizadas metodologias para o diagnóstico molecular da nosemose em abelhas *A. Mellifera* no estado da Bahia.

### Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o microsporídio *N. ceranae* está bem difundido nos apiários do estado da Bahia e *N. apis* ausente, dados que confirmam outros estudos já realizados no Brasil e no mundo. Apesar de ter sido registrado um padrão assintomático da doença, é necessária atenção para possíveis cenários futuros, onde fatores sinérgicos (como a elevação das temperaturas devido ao aquecimento global, a indisponibilidade de recursos naturais devido às secas prolongadas, o aparecimento de outros patógenos, parasitas e predadores exógenos, além do problema mais agravante, que é o uso abusivo de agrotóxicos) podem contribuir para o aparecimento de sintomas da nosemose e consequentemente possíveis ligações com a CCD, podendo levar a uma epidemia da doença em nossas condições.

Dada a importância das abelhas para a economia nacional e conservação da biodiversidade, o trabalho revela-se como uma contribuição importante para o conhecimento da sanidade apícola brasileira, que pode contribuir para elaboração futura de uma estratégia de manejo de doenças.

## 7. REFERÊNCIAS

ABEMEL. Associação Brasileira de Exportadores de Mel. **Apicultura Sustentável**. 2015. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/camaras\\_setoriais/Meleprodutos\\_apicolas/36RO/ICA\\_36RO.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Meleprodutos_apicolas/36RO/ICA_36RO.pdf)> Acessado em: 30 de agosto de 2018.

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 399-451, 2005.

ALEXANDER, B. A.; MICHENER, C. D. Phylogenetic studies of the families of short-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin**, v. 55, p. 377-424, 1995.

ALVES, L. H. S.; CASSINO, P. C. R.; PREZOTO, F. Effects of abiotic factors on the foraging activity of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 in inflorescences of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 4, p. 405-409, 2015.

AMARAL, A. D. **Arranjo produtivo local e apicultura como estratégia para o desenvolvimento do sudoeste de Mato Grosso**. São Carlos, 2010. Dissertação (Doutorado em Ecologia e Recursos Vegetais). Coordenadoria de Pós Graduação, Universidade Federal de São Carlos.

ANDREADIS, T. G. *Nosema pyrauta* infection in *Macrocentrus grandii*, a braconid parasite of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 35, p. 229-223, 1980.

BIZZOTO, L. A.; SANTOS, R. S. S.; BOFF, M. I. C. Parasitism by *Varroa* and *Nosema* sp in beehives used for apple tree pollination. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 3, p. 773-778, 2018.

BORLACHENCO, N. G. C.; CEREDA, M. P.; ARAÚJO, G. M.; PADIAL, N. P. M. Aspectos legais da recuperação de áreas degradadas em áreas de preservação com apicultura de *Apis mellifera*. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v. 6, n. 2, p. 56-78, 2017.

BOTIAS, C. MARTÍN-HERNANDEZ, R.; BARRIOS, L.; MEANA, A.; HIGES, M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. **Veterinary Research**, v. 44, n. 25, 2013.

BOURGEOIS, A. L.; RINDERER, T. E.; SYLVESTER, H. A.; HOLLOWAY, B.; OLDROYD, B. P. Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects. **Apidology**, v. 43, p. 539-548, 2012.

BROTHERS, D. J.; CARPENTER, J. M. Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea (Hymenoptera). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 2, p. 227-304, 1993.

CALDERON, R. A.; VAN VEEN, J. W.; SOMMEIJER, M. J.; SANCHEZ, L. A. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, p. 281–297, 2010.

CAMARGO, J. M. F. **Manual de Apicultura**. São Paulo: Ed. Ceres, 251p, 1972.

CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R. **Sistema de Produção de Mel**. Teresina: EMBRAPA Meio Norte, 2002.

CARRECK, N. L.; ANDREE, M.; BRENT, C. S.; COX-FOSTER, D.; DADE, H. A.; ELLIS, J. D.; HATJINA, F.; VANENGLESDORP, D. Standard methods for *Apis*

*mellifera* anatomy and dissection. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, 2013.

CARVALHO, A. C. P. de; MESSAGE, D. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoideae) with causes sacbrood-like symptoms. **Apidologie**, v. 35, p. 89-90, 2004.

CASTAGNINO, G. L. B.; MESSAGE, D.; JUNIOR, P. M. Fornecimento de substituto de pólen na redução da mortalidade de *Apis mellifera* L. causada pela cria ensacada brasileira. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1838-1843, 2011.

CHEN, Y.; EVANS, J. D.; SMITH, I. B.; PETTIS, J. S. *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**, v. 97, p. 186 - 188, 2008.

CHEN, Y.; EVANS, J. D.; ZHOU, L.; BONCRISTIANI, H.; KIMURA, K.; XIAO, T.; LITKOWSKI, A. M.; PETTIS, J. S. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 204-209, 2009.

CORNMAN, R. S.; TARPY, D. R.; CHEN, Y.; JEFFREYS, L.; LOPEZ, D.; PETTIS, J. S.; VANGELSDORP, D.; EVANS, J. D. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. **Plos One**, v. 7, 2012.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E.C.; PALACIOS, G.; EVANS, J.D.; MORAN, N.A.; QUAN, P.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D.M.; MARTINSON, V.; vanENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A.L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S.K.; SIMONS, J.F.; EGHOLM, M.; PETTIS, J.S.; LIPKIN, W.I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, p. 283-287, 2007.

CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS, CPT. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/cursos-criacaodeabelhas/artigos/abelhas-com-ferrao-origem-da-apis-mellifera-e-mecanismo-de-defesa>. Acessado em: 12 de setembro de 2017.

DANTAS, C. G.; NUNES, T. L. G. M.; NUNES, T. L. G. M.; GOMES, M. Z.; GRAMACHO, K. P. Apitoxina: Coleta, composição química, propriedades biológicas e atividades terapêuticas. **Revista IberoAmericana de Ciências Ambientais**, v. 4, n. 2, p. 127-150, 2013.

D'ÁVILA, M.; MARCHINI, L. C. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. **Boletim de indústria animal**, v. 62, n. 1, p. 79-90, 2005.

DE ALMEIDA, C. T.; LORENZON, M. C. A.; TASSINARI, S. Identificação de fatores associados à ocorrência de doenças de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em 67 apiários do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 35, n.1, p. 33–40, 2013.

DEDEJ, S.; DELAPLANE, K. S.; SCHERM, H. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent *Bacillus subtilis* to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. **Biological Control**, v. 31, p. 422-427, 2004.

DEREDEC, A.; COURCHAMP, F. Extinction thresholds in host - parasite dynamics. **Annales Zoologici Fennici**, v. 40, n. 2, p. 115-130, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11 – 15, 1987.

DUSSAUBAT, C.; BRUNET, J. C.; HIGES, M.; COLBOURNE, J. K.; LOPEZ, J.; CHOI, J. H.; MARTÍN-HERNANDÉZ, R.; BOTIAS, C.; COUSIN, M.; MCDONNELL, C.; BONNET, M.; BELZUNCES, L. P.; MORITZ, R. F. A.; CONTE, Y. L.; ALAUX, C. Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. **Plos One**, v. 7, n. 5, 2012.

EBERT, D.; HAMILTON, W. D. Sex against virulence: the coevolution of parasitic diseases. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 2, p. 79-82, 1996.

EMSEN, B.; GUZMAN-NOVOA, E.; HAMIDUZZAMAN, M. M.; ECCLES, L.; LACEY, B.; RUIZ-PÉREZ, R. A.; NASR, M. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. **Parasitology research**, v. 115, p. 175-181, 2016.

ESPINOSA, J. L. V. **Prevalencia de *Nosema* (*Nosema* spp) em colmenares de la región norte y centro norte del Ecuador**. Ecuador, 2015. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador.

EVANS, J. D.; SCHWARZ, R. S.; CHEN, Y. P.; BUDGE, G.; CORNMAN, R. S.; DE LA RUA, P.; MIRANDA, J. R.; FORET, S.; FOSTER, L.; GAUTHIER, L.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; JAROSCH, A.; KUCHARSKI, R.; LOPEZ, D.; LUN, C. M.; MORITZ, R. F. A.; MALESZKA, R.; MUÑOZ, I.; PINTO, M. A. Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, 2013.

FERNÁNDEZ, J. M.; PUERTA, F.; COUSINOU, M.; DIOS-PALOMARES, R.; CAMPANO, F.; REDONDO, L. Asymptomatic presence of *Nosema* spp in Spanish commercial apiaries. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, p. 106-110, 2012.

FORSGREN, E.; FRIES, I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. **Veterinary Parasitology**, n. 170, p. 212-217, 2010.

FRAZER, J. L.; THAM, K. M.; REID, M.; ANDEL, M. V.; MCFADDEN, A. M. J.; FORSGREN, E.; PETTIS, J. S.; PHARO, H. First detection of *Nosema ceranae* in New Zealand honey bees. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 4, 2016.

FRIES, I. *Nosema apis* - A parasite in the honey bee colony. **Bee World**, v. 74, n. 1, p. 5-19, 1993.

FRIES, I.; FENG, F.; SILVA, A.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, v. 32, p. 356 – 365, 1996.

FRIES, I., CAMAZINE, S. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. **Apidologie**, v. 32, p. 199–214, 2001.

FRIES, I.; MARTÍN, R.; MEANA, A.; GARCÍA-PALENCIA, P.; HIGES, M. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. **Journal of Apicultural Research**, v. 45, n.3, p. 230-233, 2006.

FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 73-79, 2010.

FRIES, I.; CHAUZAT, M. P.; CHEN, Y. P.; DOUBLET, V.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; HIGES, M.; MCMAHON, D. P.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; NATSOPOULOU, M.; PAXTON, R. J.; TANNER, G.; WEBSTER, T. C.; WILLIAMS, G. R. Standard methods for *Nosema* research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, 2013.

GAJGER, I.; VUGREK, O.; GRILEC, D.; PETRINEC, Z. Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 9, p. 457-462, 2010.

GALLAI, N.; SALLES, J. M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, p. 810-821, 2009.

GAMBOA, V.; RAVOET, J.; BRUNAIN, M.; SMAGGHE, G.; MEEUS, I.; FIGUEROA, J.; RIAÑO, D.; GRAAF, D. C. Bee pathogens found in *Bombus atractus* from Colombia: A case study. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 129, p. 36-39, 2015.



GARIBALDI, L. A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; WINFREE, R.; AIZEN, M. A.; BOMMARCO, R.; SAUL, A. C. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, v. 339, p. 1608-1611, 2013.

GENERSCH, E.; VON DER OHE, W.; KAATZ, H.; SCHROEDER, A.; OTTEN, C.; BUCHLER, R.; BERG, S.; RITTER, W.; MUHLEN, W.; GISDER, S.; MEIXNER, M.; LIEBIG, G.; ROSENKRANZ, P. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honeybee colonies. **Apidologie**, v. 41, p. 332-352, 2010.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.108, p.1-9, 2015.

GISDER, S.; MOCKEL, N.; LINDE, A.; GENERSCH, E. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee pathogenic microsporidia. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 404-413, 2011.

GLOBO RURAL. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Cidades-Verdes/noticia/2015/10/6-formas-de-ter-mais-abelhas-polinizadoras-em-sua-horta-ou-jardim.html>>. Acessado em: 12 de setembro de 2017.

GÓMEZ-MORACHO, T.; BARTOLOMÉ, C.; BELLO, X.; MARTÍN-HERNANDÉZ, R.; HIGES, M. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, p. 87-94, 2015.

GONÇALVES, L. S. Meio século de apicultura com abelhas africanizadas no Brasil. 2006. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/87/artigo.htm>>. Acessado em: 30 de agosto de 2018.

GONÇALVES, L. S. **Consequências do Desaparecimento (CCD) das Abelhas no Agronegócio Internacional no Brasil**. Anais do X Encontro sobre Abelhas – Ribeirão Preto- SP, Brasil, 2012.

GUIMARÃES-CESTARO, L.; SERRÃO, J. E.; ALVES, M. L. T. M. F.; MESSAGE, D.; TEIXEIRA, E. W. A scientific note on occurrence of pathogens in colonies of honey bee *Apis mellifera* in Vale do Ribeira, Brazil. **Apidologie**, 2016.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNANDÉZ, R.; MEANA, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, p. 93-95, 2006.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; BOTÍAS, C.; BAILÓN, E. G.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; BARRIOS, L.; DEL NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; JIMÉNEZ, J. J.; PALENCIA, P. G.; MEANA, A.. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2659-2669, 2008.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNANDÉZ, R.; GARRIDO-BAILÓN, E.; BOTIAS, C.; MEANA, A. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 48, n. 3, p. 217-219, 2009.

HIGES, M.; NOZAL, M.; ALVARO, A.; BARRIOS, L.; MEANA, A.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; BERNAL, J. The stability and effectiveness of funagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) Infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. **Apidologie**, v. 42, p. 364-377, 2011.

HUANG, Z. Effects of *Nosema* on honey bee behavior and physiology. **American Bee Journal**, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da pecuária municipal. IBGE (2017). Disponível em:

[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2016\\_v44\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf).

Acesso em: 31/05/2018.

INVERNIZZI, C.; ABUD, C.; TOMASCO, I. H.; HARRIET, J.; RAMALLO, G.; CAMPÁ, J.; KATZ, H.; GARDIOL, G.; MENDOZA, Y. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 150-153, 2009.

KERR, W. E. Notas sobre as abelhas africanizadas. **Congresso Brasileiro de Apicultura**, Porto Alegre, 1994.

KLEE, J.; BESANA, A. M.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; NANETTI, A.; TAM, D. Q.; CHINH, T. X.; PUERTA, F.; RUZ, J. M.; KRYGER, P.; MESSAGE, D.; HATJINA, F.; KORPELA, S.; FRIES, I.; PAXTON, R. J. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 96, p. 1-10, 2007.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; DEWENTER, I. S.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEM, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B**, v. 274, n. 1608, 2007.

KRUGER, E. **Ocorrência de *Nosema ceranae*, *Nosema apis* e de *Varroa destructor* em abelhas africanizadas: Características de tolerância e produtividade das colônias**. Paraná, Brasil, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, Coordenadoria de Pós-Graduação, Universidade Católica do Paraná.

LENGLER, L. **Sustentabilidade, empreendedorismo e cooperação em associações de apicultores gaúchos: uma análise dos gestores – associados**. Dissertação (Mestrado em Agronegócios). Rio Grande do Sul, 2008. Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócio, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LI, J.; CHEN, W.; WU, J.; PENG, W.; AN, J.; SCHMID-HEMPEL, P.; SCHMID-HEMPEL, R. Diversity of *Nosema* associated with bumble bees (*Bombus* spp.) from China. **International Journal of Parasitology**, v. 42, n. 1, p. 49-61, 2012.

LIMA, T. S.; MENEZES, M. C.; BRITO, P. D.; SOUZA, F. A.; FREITAS, C. I. A.; MESSAGE, D. Meios de dispersão de *Nosema ceranae* em *Apis mellifera* Africanizada no município de Mossoró - RN. **Ciência veterinária nos trópicos**, v. 18, n 2, p. 193-196, 2015.

MAGGI, M.; ANTÚNEZ, K.; INVERNIZZI, C.; ALDEA, P.; VARGAS, M.; NEGRI, P.; BRASESCO, C.; JONG, D. D.; MESSAGE, D.; TEIXEIRA, E. W.; PRINCIPAL, J.; BARRIOS, C.; RUFFINENGO, S.; SILVA, R. R.; EGUARAS, M. Honey health in South America. **Apidologie**, v. 47, p. 835-854, 2016.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A.; PRIETO, L.; SALVADOR, A. M.; BAILON, E. G.; HIGES, M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6331-6338, 2007.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; BOTIAS, C.; BAILON, E. G.; SALVADOR, A. M.; PRIETO, L.; MEANA, A.; HIGES, M. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 2127-2138, 2012.

MARTÍNEZ, J.; LEAL, G.; CONGET, P. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. **Parasitology Research**, v. 111, p. 601-607, 2012.

MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 3, p. 185-188, 2009.

MEDICI, S. K.; SARLO, E. G.; PORRINI, M. P.; BRAUNSTEIN, M.; EGUARAS, M. J. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. **Parasitology research**, v. 110, p. 859-864, 2012.

MENDOZA, Y.; ANTÚNEZ, K.; BRANCHICCELA, B.; ANIDO, M.; SANTOS, E.; INVERNIZZI, C. *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 224-234, 2013.

MESSAGE, D.; TEIXEIRA, É. W.; DE JONG, D. Situação da sanidade das abelhas no Brasil. In: FONSECA, V. L. I.; CANHPS, D. A. L.; ALVES, D. de A.; SARAIVA, A.M. (Org.). **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: Edusp, 2012. p.237-256.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Editora Johns Hopkins Univ Press, ed. 2, 2007.

MILBRATH, M. O.; XIE, X.; HUANG, Z. Y. *Nosema ceranae* induced mortality in honey bees (*Apis mellifera*) depends on infection methods. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 42-44, 2013.

MILBRATH, M. O.; TRAN, T. V.; HUANG, W. F.; SOLTER, L. F.; TARPY, D. R.; LAWRENCE, F.; HUANG, Z. Y. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 9-15, 2015.

MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Culture**, v. 128, p. 1–15, 2000.

NASCIMENTO, E. G. M. **Caracterização da apicultura e prevalência de *Nosema ceranae* na Mesorregião Norte Mato-Grossense**. Mato Grosso, 2016. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Coordenadoria de Pós Graduação, Universidade Federal de Mato Grosso.

NASCIMENTO, J. J. S.; MELQUIADES, C. C. V. **Sanidade de enxames de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) durante o período seco do semiárido**

**Piauiense.** Pesquisas e ações do grupo de estudos sobre abelhas do semiárido piauiense, Universidade Federal do Piauí, 2017.

NATSOPOULOU, M. E.; DOUBLET, V.; PAXTON, R. J. European isolates of the Microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae* have similar virulence in laboratory tests on European worker honey bees. **Apidologie**, v. 47, n. 57-65, 2016.

OLINTO, F. A. **Comportamento higiênico e identificação de patógenos em colmeias de *Apis mellifera* L. africanizadas no sertão paraibano.** Paraíba, 2014. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais). Coordenadoria de Pós Graduação, Universidade Federal de Campina Grande.

PAXTON, R. J.; KLEE, J.; KORPELA, S.; FRIES, I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. **Apidologie**, v. 38, p. 1–9, 2007.

PAXTON, R. J. Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 80-84, 2010.

PEREIRA, F. M., VILELA, S. L. O. **Estudo da Cadeia Produtiva do Mel do Estado de Alagoas.** Maceió: SEBRAE-AL, 2003.

PETTIS, J. S.; DELAPLANE, K. Coordinated responses to honey bee decline in the USA. **Apidologie**, v. 41, p. 256-263, 2010.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: Há casos de CCD? **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

PLISCHUCK, S.; MARTÍN-HERNANDEZ, R.; PRIETO, L.; LUCIA, M.; BOTIAS, C.; MEANA, A.; ABRAHAMOVICH, A. H.; LANGE, C.; HIGES, M. South American native bumblebees (Hymenoptera:Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an

emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 2, p. 131-135, 2009.

PORRINI, L. P.; PORRINI, M. P.; GARRIDO, P. M.; PRINCIPAL, J.; SUAREZ, C. J. B.; BIANCHI, B.; IRIARTE, P. J. F.; EGUARAS, M. J. First identification of *Nosema ceranae* (Microsporidia) infecting *Apis mellifera* in Venezuela. **Journal of Apicultural Science**, v. 61, n. 1, p. 149-152, 2017.

PUERTA, F.; FLORES, J. M.; RUÍZ, J. A.; RUZ, J. M.; CAMPANO, F. **Enfermedades de las abejas: Prevención, diagnóstico y tratamiento**. Unión de Agricultores y Ganaderos de Andalucía (Ed), 186 p., 2001.

PUKER, A. **PCR multiplex para detecção de patógenos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) em mel**. Minas Gerais, 2011. Tese (Mestrado em Entomologia). Programa de Pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa.

RIBEIRO, M.; MATOS, A.; ALMEIDA, A.; FONSECA, A.; FERNANDES, B.; MOTA, C.; GONÇALVES, E.; GARCIA, E.; PEREIRA, E.; GARÇÃO, H.; GUEDES, H.; RODRIGUES, M.; NETO, M.; ABREU, R. Produtos alimentares tradicionais: Hábitos de compra e consumo do mel. **Revista de Ciências Agrárias**, p. 97-112, 2009.

SANTOS, C. S.; RIBEIRO, A. S. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2009.

SANTOS, L. G.; SANTOS, L. G.; ALVES, M. L. T. M. F.; MESSAGE, D.; PINTO, F. A.; SILVA, M. V. G. B.; TEIXEIRA, E. W. Honey Bee Health in Apiaries in the Vale do Paraíba, São Paulo State, Southeastern Brazil. **Sociobiology**, v. 61, n. 3, p. 307-312, 2014.

SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 529-551, 2005.

SCHMID-HEMPEL, P. Parasite immune evasion: a momentous molecular war. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 6, p. 318-326, 2008.

SCHUCH, D. M. T.; MADDEN, R. H.; SATTTLER, A. An improved method for the detection and presumptive identification de *Paenibacillus larvae* spores in honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 40, p. 59-64, 2001.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte: Editora IDM, 1 ed., 2002.

SIMÕES, R. A. **Alterações nos parâmetros biológicos de *Diatraea saccharralis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) causadas por *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae)**. Piracicaba, 2012. Tese (Doutorado em Entomologia). Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade de São Paulo.

STANIMIROVIC, Z.; STANIMIROVIC, J.; BAJIC, V.; RADOVIC, I. Evaluation of genotoxic effects of funagillin by cytogenetic tests in vivo. **Mutation Research**, v. 628, p. 1-10, 2007.

TEIXEIRA, E. W. SANTOS, L. G.; SATTTLER, A.; MESSAGE, D.; ALVES, M. L. T. M. F.; MARTINS, M. F.; GRASSI-SELLA, M. L.; FRANCOY, T. M. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 250 - 254, 2013.

TRINDADE, M. S. A. T.; SOUSA, A. H.; VASCONCELOS, W. E.; FREITAS, R. S.; SILVA, A. M. A.; PEREIRA, D. S.; MARACAJÁ, P. B. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, 2004.

VANDAME, R.; PALACIO, M. A. Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? **Apidologie**, v. 41, p. 243-255, 2010.



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. Colony Collapse Disorder: A descriptive study. **Plos one**, v. 4, n. 8, p. 1 -17, 2009.

VIDAL, M. F. Desempenho da apicultura nordestina em anos de estiagem. **Caderno Setorial – ETENE**, v. 2, n. 11, p. 2-10, 2017.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. **Concise Reviews and Hypotheses in Food Science**, v. 73, n. 9, p. 117-124, 2008.

VOSSBRINCK, C. R.; DEBRUNNER- VOSSBRINCK, B. A. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. **Folia parasitologica**, v. 52, p. 131-142, 2005.

WILLIAMS, D. L. Review: a veterinary approach to the european honey Bee (*Apis mellifera*). **The Veterinary Journal**, v.160, p. 61-73, 2000.

WILLIAMS, G. R.; TARPY, D. R.; VANENGELSDORP, D.; CHAUZAT, M. P.; COX-FOSTER, D. L.; DELAPLANE, K. S.; NEUMANN, P.; PETTIS, J. S.; ROGERS, R. E. L.; SHUTLER, D. Colony Collapse Disorder in context. **BioEssays**, v. 32, n. 10, p. 845-846, 2010.

WING, S. L.; BOUCHER, L. D. Ecological aspects of the Cretaceous flowering plant radiation. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 26, p. 379-421, 1998.

WITTNER, M. Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. **The Microsporidia and Microsporidiosis**, p. 1-6, 1999.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH – OIE. Nosemosis of Honey Bees. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, v.1, cap. 2.2.4, 2013.

ZANDER, E. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. **München Bienenztg**, v. 31, p. 196-204, 1909.

ZANDER, E.; BÖTTCHER, F. K. **Krankheiten der Biene**. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany, 7 ed., 408 p., 1984.