

PCR multiplex para detecção de espécies de *Nosema* em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)

Vivian Marina Gomes Barbosa Lage¹; Camila Dias Santana²; Maria Luiza Bertani de Araujo³; Rejane Peixoto Noronha⁴; Suzana Telles da Cunha Lima⁵; Cristiane de Jesus Barbosa⁶

¹Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal da Bahia, vivianmarina@hotmail.com; ²Estudante de Farmácia da Estácio, camila.diassant@gmail.com; ³Estudante de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, bertanimalu@gmail.com; ⁴Agência de Defesa Agropecuária da Bahia, rejane.noronha@adab.ba.gov.br; ⁵Universidade Federal da Bahia, stcunhalima@ufba.br; ⁶Embrapa Mandioca e Fruticultura, cristiane.barbosa@embrapa.br

A noselose é considerada uma das doenças mais danosas entre as abelhas, sendo ocasionada pela infecção de microsporídeos do gênero *Nosema spp.* Os microsporídeos são caracterizados por alojarem-se nas células da mucosa intestinal de abelhas adultas, gerando diarreia, aumento do apetite, diminuição da produtividade e conseqüente morte precoce. A noselose é citada como um dos fatores relacionados ao distúrbio do colapso das colônias (*Colony Collapse Disorder, CCD*), sendo este a dizimação em massa de populações de abelhas, que está ocorrendo em todo o mundo. A doença pode ser ocasionada por *N. apis* ou por *N. ceranae*, sendo a última mais frequente no Brasil. Entretanto, pouco se sabe sobre a ocorrência e distribuição da noselose no estado da Bahia. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e otimizar a técnica de PCR multiplex junto ao Laboratório de Biologia Molecular do Campo Avançado da Embrapa Mandioca e Fruticultura em Salvador, para respaldar as ações de diagnóstico e manejo da doença pela Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB). Para tanto, foram coletadas amostras de abelhas advindas de apiários de Ribeira do Pombal. Cada amostra coletada foi constituída de 15 abelhas por colmeia, capturadas no alvado e armazenadas em tubo Falcon contendo álcool a 70%. Foi obtido o DNA total a partir do tecido do abdômen das abelhas de todas as amostras coletadas, em tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,2 M, Tris HCl 100 mM, EDTA 30 mM, Mercaptoetanol 0,2%, Proteinase K 0,3 mg/μl, ddH₂O), seguido de incubação em banho-maria à 65 °C, homogeneização em clorofórmio: álcool isoamílico, precipitação final em álcool isopropílico e ressuspensão em tampão TE (Tris-HCl 1M e EDTA 0,5M). A Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex (PCR multiplex) utilizou os *primers* Mnceranae-F, Mnapis-F e Muniv-R, segundo o protocolo da *World Organisation for Animal Health – OIE*. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% a 110V por 2 horas e revelados com brometo de etídio. Como controles positivos para o teste foi utilizado DNA de *N. apis*, fornecido pelo Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo, Espanha. Para *N. ceranae* foram utilizadas amostras de DNA total de abelhas coletadas no estado da Bahia, que foram diagnosticadas, previamente, como positivas para o patógeno em PCR convencional. Foram obtidos fragmentos de 143 pb e 224 pb para *N. ceranae* e *N. apis*, respectivamente, que estão de acordo com o esperado para os pares de *primers* utilizados.

Significado e impacto do trabalho: A noselose é uma das mais importantes doenças das abelhas, estando relacionada com a diminuição da população destes insetos em todo mundo. O estabelecimento de um método de diagnóstico eficiente é importante para avaliar a sua ocorrência e distribuição da doença nos apiários do estado da Bahia, bem como elaborar um manejo sustentável para mesma.