

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS À *APIS MELLIFERA* E BIOPROSPECÇÃO DE  
COMPONENTES DA IMUNIDADE DA ABELHA**

Denise de Oliveira Scoaris

Belo Horizonte

2014

Denise de Oliveira Scoaris

**MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS À APIS MELLIFERA E BIOPROSPECÇÃO DE  
COMPONENTES DA IMUNIDADE DA ABELHA**

**Versão final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa  
(ICB/UFMG)

Co-orientadora: Prof. Dra. Márcia Helena Borges  
(FUNED/MG)

Co-orientador: Dr. Jay Daniel Evans (Bee  
Research Lab/USDA)

Belo Horizonte

2014

043 Scoaris, Denise de Oliveira.  
Micro-organismos associados à *Apis mellifera* e bioprospecção de componentes da imunidade da abelha [manuscrito] / Denise de Oliveira Scoaris. - 2014.

124 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa. Coorientadores: Prof. Dra. Márcia Helena Borges, Dr. Jay Daniel Evans.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Abelhas. 3. Leveduras. 4. Bactérias. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Borges, Márcia Helena. III. Evans, Jay Daniel. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE DENISE DE OLIVEIRA SCOARIS

Nº REGISTRO: 2010700664

Relatora e Suplente: Dra. Susana Johann

Suplente externo: Profa. Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Às 14:00 horas do dia 30 de setembro de 2014, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelo Ary Correa Junior (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), pela Dra. Jandora Severo Poli (Pos. doc. Dep. Microbiologia ICB/UFMG), pela Dra. Anete Pedro Lourenço (UFVJM/MG), pela Dra. Mariana de Lourdes Almeida Vieira (CEFET/MG) e pelo Prof. Carlos Augusto Rosa - Orientador, para julgar o trabalho final "Micro-organismos associados à *Apis mellifera* e bioprospecção de componentes da imunidade da abelha", da aluna **Denise de Oliveira Scoaris**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de setembro de 2014.

Prof. Ary Correa Junior 

Dra. Jandora Severo Poli 

Dra. Anete Pedro Lourenço 

Dra. Mariana de Lourdes Almeida Vieira 

Prof. Carlos Augusto Rosa (Orientador) 

  
Prof. Cláudio Antônio Bonjardim  
Coordenador

À minha mãe, Raquel Scoaris, minha luz: dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Carlos Augusto Rosa, por ter me acolhido no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, por toda a orientação, ensinamentos e compreensão durante estes quatro longos anos.

Ao Dr. Jay Daniel Evans e sua equipe, pelo carinho e importância que sempre deram a mim e ao meu trabalho, intenso auxílio nos experimentos e pela valiosa oportunidade de trabalhar ao lado de um grupo de pesquisa tão renomado.

À Dra. Márcia Helena Borges, por todo carinho e respeito que sempre dedicou a mim e ao meu trabalho e pelos ensinamentos valiosos sobre proteínas.

À Dra. Esther Bastos, por ter permitido a utilização do apiário experimental e pelas liberações para cursar o Doutorado.

À Fundação Ezequiel Dias, pelas liberações para participar do curso de Doutorado e Doutorado Sanduíche e pelo incentivo que este curso representa na minha carreira como pesquisadora.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo auxílio financeiro durante o curso e estágio no exterior.

À equipe do Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos da FUNED, em especial Ana Carolina Moreira, Rânia Santana, Milton Silveira e Pedro Mesquita, pelo auxílio intenso em experimentos de campo e laboratório. Obrigada também à Débora Zanetti e novamente a Ana Carolina por todo o auxílio nas atividades do SRVO nos momentos em que estive ausente pelo Doutorado. Vocês foram imprescindíveis.

Àos amigos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos: Camila Gontijo, Camila Rodrigues, Fernanda Piló, Mariana Rocha, Mariana Vieira, Mariana “Zé”, Fran, Raquel, Bárbara, Gabriela Bredder, Alice, Iara, Monaliza, Natália, Vivian, Ana Raquel, Laura, Larissa, Luciana, Valéria, Carla Pataro, Letícia e Renata, pelos momentos divertidos, agradáveis e leves de convivência no laboratório. Agradeço especialmente à Camila Gontijo e Fernanda Piló por todos os ensinamentos (e paciência!) sobre biologia molecular de leveduras e bactérias.

À Luciana Brandão pelo auxílio na identificação de leveduras.

À Alice e Frederic Hughes pelo imenso auxílio nas análises estatísticas.

Ao meu marido William, pelo amor, carinho e respeito. Por acreditar na minha capacidade, muitas vezes mais do que eu mesma, e pela presença constante em todos os momentos, rindo comigo e me dando forças quando eu acreditava que estas não mais existiam.

A minha família amada, que mesmo de longe acompanhou cada um de meus passos e construiu, com amor incondicional, o alicerce em que hoje me sustento, em especial aos meus pais Raquel e Sebastião, irmãos Eduardo e Rafael e às minhas tias Mi, Agda e Márcia.

As amigas Tatiana Silva, Rânia Santana, Angélica Pereira, Cláudia Gontijo, Vera Almeida, Carolina Yamamura, Luciana Macedo e Josy Marins pelo carinho, respeito e força, cada uma a sua maneira.

E finalmente agradeço a Deus, pela força e serenidade que me Concedeu, em meio a tantas adversidades, para que eu fosse capaz de completar esse curso e estar vivendo este momento.

Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes.” (Isaac Newton).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Marthin Luther King)

## RESUMO

As abelhas constituem o grupo mais abundante da ordem Hymenoptera. Dentre o gênero *Apis*, a espécie *A. mellifera* é o principal representante. A defesa em *Apis* compreende mecanismos sociais e individuais. Dentre os mecanismos de imunidade social, destaque se dá à própolis, componente estrutural com reconhecida atividade antimicrobiana. A microbiota associada ao inseto também pode ser considerada um mecanismo de imunidade, visto que pode auxiliar o hospedeiro contra patógenos. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar o papel da própolis na resposta imune em abelhas *A. mellifera*, pela expressão relativa de genes relacionados à imunidade e o estudo da diversidade de bactérias e leveduras associada a diferentes substratos de *A. mellifera* no Brasil e nos Estados Unidos. Abelhas *A. mellifera* foram desafiadas com suspensões de micro-organismos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*) e solução salina, e incubadas na presença ou ausência de própolis. Nos Estados Unidos, o efeito sazonal entre inverno e verão foi também avaliado. A bioprospecção de componentes da imunidade de *A. mellifera* foi acessada por meio da expressão dos genes codificadores para peptídeos antimicrobianos-AMPs (Hymenopatecina, Abaecina, Apidaecina e Defensina 1), proteína de reconhecimento celular (AmEater) e proteína de estocagem (Vitelogenina). Para o estudo da microbiota associada a *A. mellifera* foram avaliados os seguintes substratos: pólen corbicular, pão de abelhas, superfície de abelhas nutrizas, superfície de abelhas forrageiras, resíduos das colmeias e conteúdo intestinal. As abelhas desafiadas com suspensões de micro-organismos não apresentaram maior expressão de AMPs do que aquelas inoculadas com salina, indicando resposta imune significativa, porém não específica. A própolis verde parece ter um papel modulador da resposta imune, evidente em abelhas americanas não desafiadas: na condição inverno, a exposição de abelhas controle à resina foi capaz de reduzir a expressão de *Hym* em todas as colmeias, de *Aba* em três das quatro colmeias e de *Api* e *Def1* em metade das colmeias, em relação aos grupos controle não expostos à própolis. Os substratos com maior riqueza de espécies, tanto de bactérias quanto leveduras, foi o resíduo das colmeias no Brasil e superfície de abelhas forrageiras nos Estados Unidos. Foram obtidos 214 isolados de leveduras, 131 no Brasil e 84 nos Estados Unidos, correspondendo a 45 táxons. A espécie de levedura mais prevalente foi *Aureobasidium pullulans*, seguida de espécies dos gêneros *Candida* e *Rhodotorula*. Do total de espécies isoladas, apenas seis foram comuns aos dois ambientes. Para as bactérias, 283 isolados foram obtidos, 125 no Brasil e 158 nos Estados Unidos, correspondendo a 61 táxons. Um total de 71 (25%) isolados correspondeu às bactérias do ácido láctico (BAL). A maior parte dos isolados foi pertencente ao Filo Firmicutes, gênero *Bacillus*, e dentre as láticas, as espécies do gênero *Lactobacillus* foram as prevalentes. Apenas 12 do total de espécies bacterianas foram comuns aos dois ambientes. Duas espécies novas, uma levedura e uma bactéria, foram encontradas. Estes resultados sugerem que abelhas da mesma espécie apresentam sua microbiota composta em grande parte por espécies microbianas presentes no ambiente no qual estão inseridas, refletindo comunidades de leveduras e bactérias distintas entre os dois ambientes.

Palavras-chave: *Apis mellifera*; AMPs, AmEater, Vitelogenina, leveduras, bactérias, BAL.

## ABSTRACT

The bees are the most abundant group of Hymenoptera. In the *Apis* genus, *A. mellifera* is the most representative species. The immune system in *Apis* comprises both individual and social mechanisms. Among the social immunity, propolis is recognized as an important component, given its antimicrobial activity. The microbiota associated with this insect can also be considered a mechanism of immunity, since it can help the host against pathogens. The aims of this study were to evaluate the role of propolis on the immune response in *A. mellifera*, by the evaluation of immune gene expression; and the survey of the microbial diversity in *A. mellifera* substrates, both in Brazil and in the United States. *A. mellifera* were challenged with representative microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*) and saline, and were incubated in the presence or absence of propolis. In the United States, the seasonal effect between winter and summer was also evaluated. Bioprospection of *A. mellifera* immune components was accessed through the expression of antimicrobial peptides genes (Hymenopatecina, Abaecina, Apidaecina and Defensin 1), cell recognition protein (AmEater) and storage protein (Vitellogenin). To evaluate the microbiota associated with *A. mellifera*, the following substrates were surveyed: corbicular pollen, bee bread, nurse and foragers bees surface, hive debris and intestinal contents. It was observed that bees challenged with microorganisms suspensions did not have a higher AMP expression than those inoculated with saline, indicating a significant but not specific immune response. The propolis appears to modulate the immune response, clearly in unchallenged American bees: in the winter, the exposure of control bees to the propolis was able to decrease the expression of *Hym* in all hives, *Aba* in three hives and *Api* and *Defl* in two hives, compared to control groups not exposed to propolis. The substrates with higher species richness were the hive debris in Brazil and surface of foragers bees in the United States. A total of 214 yeasts isolates were retrieved, 84 from Brazil and 131 from the United States, comprising 45 taxa. The most prevalent yeast species was *Aureobasidium pullulans*, followed by *Candida* and *Rhodotorula* species. Only 6 yeast species were common to both environments. For bacteria, 283 isolates were retrieved, 125 from Brazil and 158 from the United States, accounting for 61 taxa. A total of 71 isolates (25%) was identified as acid lactic bacteria. Most bacterial isolates belonged to *Bacillus* genus, from Firmicutes Phylum. Among the lactic acid bacteria, the genus *Lactobacillus* were the prevalent. Only 12 out of 61 bacterial species were common in both environments. Two new species, one yeast and one bacterium were observed in association with *A. mellifera*. These results suggest that bees of the same species have their microbiota composed largely of microbial species present in the foraging environment, which reflects the distinct yeasts and bacteria communities between the two environments.

Keywords: *Apis mellifera*; AMPs, AmEater, Vitellogenin, yeasts, bacteria, LAB.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Abelha da espécie *Apis mellifera* (Fonte: David Cappaert - [InsectImages.org](http://InsectImages.org)). ..... 3
- Figura 2: Vias de sinalização preferenciais na síntese de peptídeos antimicrobianos em *Drosophila melanogaster*, Toll (a) e Imd (b). Ilustração modificada de Hultmark (2003). ..... 9
- Figura 3: Estrutura primária dos peptídeos Apidaecinas Ia, Ib e II. As áreas circundadas referem-se aos aminoácidos diferentes entre as três moléculas (Fonte: Casteels et al., 1989). ..... 12
- Figura 4: Estrutura primária do peptídeo Abaecina (Fonte: Casteels et al., 1990). ..... 12
- Figura 5: Estrutura primária do peptídeo Hymenoptaecina (Fonte: Casteels et al., 1993). ..... 13
- Figura 6. Composição da microbiota bacteriana intestinal de *A. mellifera*. Ilustração modificada de Cox-Foster e colaboradores (2007). .....19
- Figura 7. Localização geográfica das cidades de (a) Carmo da Mata (Minas Gerais, Brasil) e (b) Beltsville (Maryland, Estados Unidos), onde os apiários experimentais foram instalados..... 24
- Figura 8. (a) Inoculação das suspensões microbianas nas abelhas nos Estados Unidos, utilizando o equipamento UltraMicroPump com SYS-Micro4™ Controller, World Precise Instruments,

acoplado ao macroscópio Wild 420, Leica Microsystems. Em (b) detalhe do equipamento e em (c) demonstrando a exata posição da inoculação nas abelhas. .... 27

Figura 9: Retirada da gaveta do coletor de pólen, instalado no alvado da colmeia, para coleta de pólen. .... 32

Figura 10: (a) quadros de alimento; (b) retirada de material do quadro de alimento. .... 32

Figura 11: (a) Abertura da colmeia para (b) coleta dos resíduos na base da mesma. .... 33

Figura 12: Coleta de abelhas nutrízes (a) e forrageiras (b). .... 33

Figura 13: Expressão relativa do peptídeo antimicrobiano Hymenoptaecina. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colméia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro: + - desvio padrão. .... 46 e 47

Figura 14. Expressão relativa do peptídeo antimicrobiano Abaecina. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro: + - desvio padrão. .... 50 e 51

Figura 15. Expressão relativa do peptídeo antimicrobiano Apidaecina. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro: + - desvio padrão. .... 54 e 55

Figura 16. Expressão relativa do peptídeo antimicrobiano Defensina 1. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro: + - desvio padrão. .... 57 e 58

Figura 17. Expressão relativa da proteína de reconhecimento celular AmEater. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro: + - desvio padrão. .... 60 e 61

Figura 18. Expressão relativa da proteína de estocagem Vitelogenina. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro: + - desvio padrão. .... 63 e 64

Figura 19. Árvore filogenética dos oito isolados de táxon ainda não descrito, baseada nas sequências da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, gerada pelo método de *Neighbour-joining*, mostrando a identidade entre eles, a relação destes com a espécie filogeneticamente mais próxima e espécie tipo do gênero. Os valores percentuais de *bootstrap* (1000 repetições) estão mostrados. .... 77

Figura 20. Curvas de acumulação de espécies de leveduras (linhas vermelhas) no (a) Brasil e (b) nos Estados Unidos, com intervalos de confiança de 95% (linhas azuis), baseada em 1.000 repetições de *bootstrap*. .... 81

Figura 21. Árvore filogenética de 58 isolados de táxon sem resolução, designado de *Bacillus* sp.1, gerada pelo método de *Neighbour-joining*. Os valores percentuais de *bootstrap* (1000 repetições) estão mostrados. .... 86

Figura 22. Árvore filogenética de 18 isolados de táxon sem resolução, designado de *Bacillus* sp.2, gerada pelo método de *Neighbour-joining*. Os valores percentuais de *bootstrap* (1000 repetições) estão mostrados. .... 87

Figura 23. Árvore filogenética de dois isolados de táxon ainda não descrito, baseada nas sequências da região 16S do gene do rRNA, gerada pelo método de *Neighbour-joining*, mostrando a relação destes com a espécie filogeneticamente mais próxima *Saccharibacter floricola*. Os valores percentuais de *bootstrap* (1000 repetições) estão mostrados. .... 94

Figura 24. Curvas de acumulação de espécies de bactérias (linha central) no Brasil (a) e nos Estados Unidos (b), com intervalos de confiança de 95% (linhas externas), baseada em 1.000 repetições de *bootstrap*. .... 103

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Iniciadores, categoria dos mesmos, número para acesso no GenBank e referências... 29
- Tabela 2: Ação da própolis sobre os níveis de expressão de transcritos em relação aos pares de tratamentos não expostos à própolis. .... 68
- Tabela 3: Riqueza de espécies de leveduras nos diferentes substratos de isolamento associados à *Apis mellifera*. .... 70
- Tabela 4: Riqueza e abundância de espécies de leveduras em diferentes substratos associados a *Apis mellifera* nos Estados Unidos e Brasil. .... 75
- Tabela 5. Valores observados e valores esperados de espécies de leveduras, baseados no estimador de riqueza *Chao 2*, para todos os substratos associados a *A. mellifera* no Brasil e Estados Unidos. .... 82
- Tabela 6: Riqueza de espécies de bactérias não-láticas nos diferentes substratos de isolamento associados à *Apis mellifera*. .... 84
- Tabela 7: Riqueza e abundância de espécies de bactérias não-láticas em diferentes substratos associados a *Apis mellifera* nos Estados Unidos e Brasil. .... 90

Tabela 8. Riqueza de espécies de bactérias lácticas nos substratos de isolamento associados à *Apis mellifera*. ..... 98

Tabela 9. Riqueza e abundância de espécies de bactérias lácticas em diferentes substratos associados a *Apis mellifera* nos Estados Unidos e Brasil. .... 100

Tabela 10. Valores observados e valores esperados de bactérias (lácticas e não lácticas), baseados no estimador de riqueza *Chao 2*, para todos os substratos associados a *A. mellifera* no Brasil e Estados Unidos. .... 104

## SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	1
1.1	Abelhas .....	1
1.2	O Gênero <i>Apis</i> .....	1
1.3	Mecanismos de defesa em <i>Apis mellifera</i> .....	3
1.3.1	Mecanismos Comportamentais: Imunidade social em <i>Apis mellifera</i> .....	3
1.3.1.1	Própolis .....	4
1.3.2	Resposta imune de insetos frente a micro-organismos .....	6
1.3.3	Resposta imune celular .....	7
1.3.4	Resposta imune humoral .....	7
1.3.5	Resposta imune em <i>Apis mellifera</i> .....	10
1.3.6	Peptídeos antimicrobianos (AMPs) já caracterizados em <i>Apis mellifera</i> .....	11
1.3.7	Outros genes relacionados à imunidade .....	13
1.3.7.1	AmEater .....	13
1.3.7.2	Vitelogenina .....	14
1.4	Micro-organismos e abelhas .....	15
1.4.1	Leveduras .....	16
1.4.2	Bactérias .....	17
2	JUSTIFICATIVA .....	21

3	OBJETIVOS .....	22
3.1	Geral .....	22
3.2	Específicos .....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1	Abelhas e apiários .....	23
4.2	Avaliação da resposta imune de <i>A. mellifera</i> frente a micro-organismos representativos .....	24
4.2.1	Micro-organismos .....	25
4.2.2	Experimento de desafio da resposta imune: Brasil .....	25
4.2.3	Experimento de desafio da resposta imune: Estados Unidos .....	26
4.2.4	Extração de RNA e Dosagem .....	27
4.2.5	Síntese de cDNA .....	28
4.2.6	Avaliação da abundância de transcritos para genes de interesse através de qPCR .....	28
4.2.7	Análise dos dados de qPCR .....	30
4.2.8	Análise estatística da expressão gênica .....	30
4.3	Diversidade microbiana associada a Abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	31
4.3.1	Coleta de material para análise microbiológica .....	31
4.3.2	Processamento .....	34
4.3.3	Isolamento e preservação dos micro-organismos .....	35
4.4	Identificação de leveduras .....	35

4.4.1	Extração de DNA de leveduras .....	36
4.4.2	Agrupamento molecular por PCR <i>fingerprinting</i> .....	36
4.4.3	PCR para amplificação dos domínios D1/D2 ou região ITS da subunidade maior do gene do rRNA .....	37
4.4.4	Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento .....	38
4.5	Identificação de bactérias .....	38
4.5.1	Extração de DNA bacteriano .....	38
4.5.2	PCR para amplificação do gene da subunidade maior (16S) do rDNA .....	39
4.5.3	Agrupamento por perfil de digestão do DNA .....	40
4.6	Sequenciamento .....	40
4.6.1	Análise das sequências .....	41
4.6.2	Análises Filogenéticas .....	41
4.7	Análise de diversidade microbiana .....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5.1	Avaliação da resposta imune de <i>A. mellifera</i> frente a micro-organismos .....	43
5.1.1	Hymenoptaecina .....	43
5.1.2	Abaecina .....	48
5.1.3	Apidaecina .....	52
5.1.4	Defensina 1 .....	56
5.1.5	AmEater .....	59
5.1.6	Vitelogenina .....	62

5.2 Micro-organismos associados à <i>Apis mellifera</i> .....	69
5.2.1 Leveduras .....	69
5.2.1.1 Análise de diversidade de leveduras associadas a <i>A. mellifera</i> .....	81
5.2.2 Bactérias .....	83
5.2.2.1. Bactérias lácticas .....	98
5.2.2.2 Análise de diversidade de bactérias associadas a <i>A. mellifera</i> .....	103
6 CONCLUSÕES .....	105
7 REFERÊNCIAS .....	107

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Abelhas

As abelhas constituem o grupo mais abundante dentro da ordem Hymenoptera. São os principais visitantes florais em diversos ecossistemas, apresentando um papel de extrema relevância na polinização de plantas (Saksinchai et al., 2012). Contrariando o padrão biogeográfico da maioria dos animais e plantas, no qual a riqueza em espécies diminui à medida que se aproxima dos polos, as abelhas são mais abundantes em algumas regiões temperadas do que em regiões equatoriais e tropicais (Michener, 2000). A estimativa é de que exista cerca de 30.000 espécies de abelhas e aproximadamente 1580 foram descritas em território brasileiro (Silveira et al., 2002).

## 1.2 O Gênero *Apis*

O gênero *Apis* (Hymenoptera: Família Apidae) é o principal representante dentre as abelhas. Baseado em análises filogenéticas, que suportam dados morfométricos e comportamentais, existem atualmente 10 espécies reconhecidas de abelhas deste gênero, distribuídas em três grupos: abelhas gigantes (*Apis dorsata*, *A. binghami* e *A. laboriosa*), abelhas anãs (*A. andreniformis* e *A. florea*) e abelhas que constroem cavidades (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nuluensis* e *A. nigrocincta*) (Raffiudin & Crozier, 2007; Saksinchai et al., 2012).

A espécie *Apis mellifera* (Figura 1) é a principal representante do gênero. Encontra-se amplamente distribuída nos quatro continentes, com notável concentração nos trópicos, região sub-ártica e temperada (Free, 1980). Altamente sociais, as abelhas *A. mellifera* apresentam

colônias compostas por milhares de indivíduos, divididos em classes que exercem papéis distintos nesta sociedade: os zangões, a rainha e as operárias. Os zangões, machos que se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, tem a função reprodutiva de se acasalar com a rainha. As duas castas de fêmeas desenvolvem-se a partir de ovos fertilizados. A rainha, única fêmea fértil, mantém a organização social da colônia por meio da liberação de feromônios, substâncias atrativas que informam aos demais membros que existe uma rainha presente e em atividade, inibem a produção de outras rainhas e auxiliam no reconhecimento da colmeia e na orientação das operárias. Já as operárias, fêmeas estéreis, são responsáveis por todas as demais atividades da colônia e a divisão de trabalho entre elas está intimamente relacionada com as diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais, típicas de idades específicas (Winston, 1987 apud Lourenço, 2007).

Sob condições normais, operárias jovens até a segunda ou terceira semana de vida realizam atividades no interior da colônia, como limpeza de células, cuidado das crias e estocagem de alimentos. Nesta fase, a atividade das glândulas hipofaríngeas, secretoras de geleia real, atinge seu grau máximo e as abelhas são capazes de alimentar as crias, sendo denominadas de nutrizas. Em seus últimos dias exercendo tarefas de ninho, as operárias recebem néctar (fonte de carboidratos) e acomodam cargas de pólen (fonte de proteínas) provenientes das forrageiras (Free, 1980; Gilliam, 1997).

Entre o 10º e 30º dia de vida, as abelhas podem iniciar sua fase de campeiras, ou forrageiras. As glândulas hipofaríngeas se degeneram e as abelhas tornam-se responsáveis pela coleta de néctar, pólen e água (os quais ela armazena na vesícula nectarífera) para a colmeia. É importante ressaltar que, embora exista um padrão bem estabelecido, a necessidade da colmeia pode fazer com que as operárias reativem glândulas atrofiadas para realização de determinada atividade, alterando a idade em que as tarefas são desempenhadas (Free, 1980).



Figura 1. Abelha da espécie *Apis mellifera* (Fonte: David Cappaert - [InsectImages.org](http://InsectImages.org))

### **1.3 Mecanismos de defesa em *Apis mellifera***

A defesa de *A. mellifera* é realizada pela relação intrínseca entre mecanismos comportamentais e a resposta imune individual. Estes mecanismos serão descritos a seguir.

#### **1.3.1 Mecanismos Comportamentais: Imunidade social em *Apis mellifera***

Devido à alta densidade populacional e baixa variabilidade genética, os membros de uma colônia de *Apis* são alvos de vários agentes infecciosos. No entanto, as estratégias de grupo resultantes da cooperação individual dos membros em combater o risco de dispersão de doenças são importantes características para a imunidade social (Cremer et al., 2007; Evans & Spivak, 2010).

A primeira estratégia de grupo descrita foi o comportamento higiênico, no qual as operárias identificam e removem larvas infectadas ou doentes dentre a cria sadia (Spivak &

Reuter, 2001). Este comportamento foi originalmente descrito como a habilidade em detectar e remover larvas infectadas apenas por *P. larvae* (Rothenbuhler 1964), sendo mais tarde identificado frente a outros patógenos (Gilliam et al., 1988) e está relacionado à capacidade olfativa das abelhas em detectar crias parasitadas ou doentes (Spivak et al., 2003;Cotter & Kilner, 2010).

Na atividade de *grooming*, ou limpeza, as abelhas se movimentam rápida e repetidamente, na tentativa de remover partículas estranhas ou parasitas de seus corpos, e podem realizar este procedimento umas nas outras (Boecking & Spivak, 1999; Wilson-Rich et al., 2009). A temperatura dentro da colmeia pode ser elevada de 34°C para 45°C, quando as abelhas se agrupam em torno da rainha ou predador, no intuito de defender a colmeia do ataque de patógenos. Este comportamento é chamado de febre da colmeia (Starks et al., 2000; Wilson-Rich et al., 2009).

A manutenção de barreiras na entrada do ninho diminui o acesso de indivíduos contaminados na colônia. Quando estes adentram a colmeia, esta deve estar preparada para conter a dispersão dos possíveis patógenos invasores. Isto é alcançado por meio dos comportamentos descritos acima e pela natureza antimicrobiana dos constituintes da colmeia, como a própolis (Cremer et al., 2007; Evans & Spivak, 2010).

### **1.3.1.1.Própolis**

A própolis é um produto natural resinoso, produzido pelas abelhas a partir da coleta e modificação enzimática de diversas partes de plantas. É depositado nas colmeias, onde é utilizado para manter a temperatura estável e vedar frestas, criando um ambiente higiênico contra a invasão e proliferação de micro-organismos, devido às suas propriedades antimicrobianas (Ghisalberti, 1979).

Abelhas *Apis mellifera* reconhecidamente produzem e utilizam a própolis, tanto em colmeias selvagens quanto experimentais. No entanto, a domesticação desta espécie nos Estados Unidos resultou na seleção de raças com produtividade de própolis reduzida, provavelmente porque sua presença nas colmeias dificultava o manejo das abelhas em campo (Fearnley, 2001). Segundo Hoyt (1965) “a própolis é a amargura da existência do apicultor”, exemplificando que a seleção por linhagens que produzem menor quantidade de própolis não é surpreendente naquele país.

No Brasil, *A. mellifera* é produtora do tipo mais reconhecido deste produto, a própolis verde. Tendo sua origem botânica na espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* (Bastos et al., 2011), a própolis verde é largamente estudada, devido às suas propriedades biológicas únicas, incluindo a ação frente a patógenos apícolas (Bastos et al., 2008; Evans & Spivak, 2010).

A coleta de resina para a produção de própolis ocorre durante a atividade de forrageamento. Este tipo especial de coleta é realizado por um pequeno número de indivíduos, em torno de 10% do total de abelhas que forrageiam em busca de pólen e néctar (Nakamura & Seeley, 2006) e representa alta demanda energética. A energia empregada na coleta de resina para a produção de própolis torna-se mínima, quando comparada à energia despendida por vários indivíduos da colmeia em manter níveis elevados de expressão de genes relacionados à imunidade (Simone et al., 2009).

O custo energético da ativação do sistema imune foi avaliado em abelhas da espécie *Bombus terrestris*. Em experimentos de sobrevivência sobre condições de estresse nutricional, foi demonstrado que as abelhas têm o tempo de sobrevivência diminuído quando desafiadas, pois direcionam seus recursos energéticos na ativação da resposta imune, o que acomete as demais funções orgânicas em decorrência da necessidade iminente de defesa do organismo (Moret & Schmid-Hempel, 2000).

De fato, além de componente estrutural, a própolis parece participar dos mecanismos de imunidade e balanço energético deste inseto. Simone e colaboradores (2009) avaliaram a ação de extratos de própolis em colmeias experimentais de *A. mellifera ligustica*. Foi observado que a presença da própolis diminui a concentração de bactérias e, conseqüentemente, regula

negativamente a expressão dos genes codificadores de Hymenoptaecina (peptídeo antimicrobiano) e AmEater (proteína transmembrana de reconhecimento celular). Estes resultados indicam que a própolis, por diminuir a exposição das abelhas a patógenos, acarreta menor investimento do sistema de defesa do animal, atuando como um modulador da resposta imune e participando ativamente na dinâmica energética das abelhas (Evans & Pettis, 2005).

Além das estratégias adotadas na imunidade social, os membros de uma colônia também possuem defesas individuais, representadas pela resposta imune frente a patógenos (Evans et al., 2006).

### **1.3.2 Resposta imune de insetos frente a micro-organismos**

O primeiro meio de defesa frente à introdução de micro-organismos no corpo do inseto é representado pelas barreiras tegumentares externas e epitélio intestinal (Gillespie et al., 1997). Quando os micro-organismos conseguem transpor as barreiras físicas à entrada, deparam-se com um sistema imune perfeitamente harmônico e preparado para a defesa. A presença de um sistema imune em insetos, associada à imunidade social é, em parte, responsável pela ocupação de diversos nichos destes animais (Lourenço, 2007), constantemente expostos a micro-organismos. O sistema imune em insetos, denominado inato, não é dotado de memória imunológica e é muito semelhante ao sistema imune inato de vertebrados (Imler, 2014).

A resposta imune é iniciada pelo reconhecimento de componentes não próprios. Quando estes componentes são moléculas presentes na superfície celular microbiana, como peptídeoglicanos (PGLC), lipopolissacarídeos (LPS) e  $\beta$ -1,3-glicanos, coletivamente denominados de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs – *pathogen associated molecular patterns*), o reconhecimento se dá pela interação entre PAMPs e receptores de reconhecimento padrão (PRRs – *pattern recognition receptors*) presentes nas células do hospedeiro (Klunner et al., 1994).

A resposta imune em *A. mellifera* é realizada por meio das defesas celulares e humorais, ambas iniciadas após o reconhecimento de PAMPs por receptores de reconhecimento do hospedeiro.

### **1.3.3 Resposta imune celular**

As células de defesa em *A. mellifera* dividem-se em cinco classes: pró-hemócito, plasmatócitos, células granulares, oenocitóides e coagulócitos. As primeiras são as precursoras das demais. Os plasmatócitos são encontrados em maior número, correspondendo a mais de 90% do total de células circulantes e tem a função de fagocitose e encapsulamento. As células granulares auxiliam os plasmatócitos no reconhecimento de corpos estranhos. Os oenócitos assemelham-se às células granulares e os coagulócitos são os responsáveis pela coagulação em *A. mellifera* (Graaf et al., 2002).

Abelhas também apresentam a capacidade de melaninizar corpos estranhos que adentrem a hemocele, por meio da ativação da resposta via fenoloxidase. O gene para a forma precursora da enzima, proPO, já foi caracterizado em *Apis mellifera* (Lourenço, 2007).

### **1.3.4 Resposta imune humoral**

O díptero *Drosophila melanogaster* é considerado o modelo para o estudo dos princípios moleculares responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e indução gênica da resposta imune (Imler, 2014). Por este motivo, os mecanismos de resposta imune humoral serão descritos neste inseto e comparados à *A. mellifera*.

Várias moléculas são expressas em resposta a um estímulo patogênico. Eventualmente, o estímulo é capaz de elicitar fatores de transcrição que irão induzir à expressão de genes

codificadores de peptídeos com atividade antimicrobiana (AMPs – *antimicrobial peptides*). Em insetos holometábolos, os AMPs são produzidos predominantemente no corpo gorduroso, podendo ocorrer também nos hemócitos, células epiteliais do trato respiratório, intestinal e genital (Herbiniere et al., 2005).

A síntese de AMPs é induzida após infecção e estes peptídeos são liberados na hemolinfa, onde em poucas horas atingem concentrações letais aos micro-organismos (Herbiniere et al., 2005). O principal mecanismo de ação dos AMPs é a desestruturação da membrana plasmática, causando a morte dos patógenos pelo extravasamento de conteúdos citoplasmáticos (Lehrer & Ganz, 1999).

As principais vias de ativação da resposta imune que podem culminar com a síntese de AMPs são as vias Toll e Imd (Figura 2), originalmente descritas pelos mutantes dos genes *Toll* e *Imd* em *Drosophila*. Ambas empregam fatores de transcrição proteicos, do tipo Rel/NF- $\kappa$ B. Estas vias consistem em proteínas de reconhecimento de sinais dos agentes invasores, proteínas de modulação e amplificação destes sinais e a produção de moléculas proteicas ou metabólitos diretamente envolvidos na inibição do patógeno (Lemaitre & Hoffman, 2007).

A primeira via recebe o nome do receptor proteico transmembrana Toll. A porção externa de Toll transduz o sinal de reconhecimento para a porção citoplasmática, iniciando uma cascata de sinalização que ativa dois fatores de transcrição do tipo Rel/NF- $\kappa$ B, Dif e Dorsal. Dif é relevante para a imunidade, enquanto Dorsal age primariamente na polarização dorso-ventral no embrião. Em estado de repouso, Dif e Dorsal formam um complexo com o inibidor transcricional Cactus, um tipo de I $\kappa$ B. A sinalização via Toll ocasiona a degradação de Cactus e conseqüentemente, a translocação de Dif (e Dorsal) para o núcleo, onde participam da ativação transcricional de genes alvo, incluindo aqueles responsáveis pela síntese de peptídeos antimicrobianos. O principal peptídeo sintetizado por meio desta via em *Drosophila* é a drosomicina, induzido tanto pela infecção por *Beauveria bassiana* quanto *Micrococcus luteus*, sugerindo que esta via desencadeia resposta imune humoral preferencial frente a fungos e também bactérias Gram-positivas (Hultmark, 2003; Lemaitre & Hoffmann, 2007; Imler, 2014).

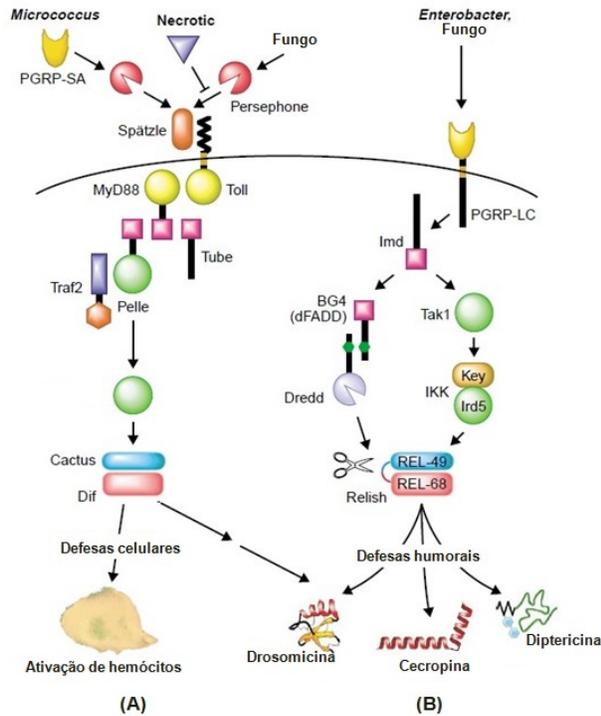


Figura 2. Vias de sinalização preferenciais na síntese de peptídeos antimicrobianos em *Drosophila melanogaster*, Toll (a) e Imd (b). Ilustração modificada de Hultmark (2003).

Estudos com mutantes para componentes da via Toll que não apresentavam redução na produção de AMPs sugeriram que outras vias eram também responsáveis pela síntese destes peptídeos, como a via Imd (*immune deficiency*). Esta via emprega outro tipo de receptor, o PGRP-LC (*peptideoglycan recognition proteins*). Segundos após o reconhecimento do PAMP pelo receptor, o fator transcricional do tipo Rel/NF- $\kappa$ B, denominado Relish é clivado em duas partes, o fragmento amino-terminal REL-68, que contém o domínio Relish e o fragmento N-terminal REL-49, que contém a região I $\kappa$ B. Na clivagem de Relish, a porção REL-68 é translocada até o núcleo, onde se liga à elementos potenciadores na região promotora dos genes codificadores de AMPs. Um dos peptídeos sintetizados por *Drosophila* preferencialmente por esta via é a cecropina, um potente AMP com ação antifúngica. Além de fungos, esta via parece ser estimulada por bactérias Gram-negativas (Hultmark, 2003; Imler, 2014).

Embora tenha sido demonstrada certa especificidade na expressão destas duas vias, a resposta imune gerada por elas não deve ser generalizada frente aos grupos microbianos. Mutantes para componentes da via Toll são resistentes a infecções por gram-negativos, enquanto mutantes para componentes da via Imd são sensíveis a esta infecção. No entanto, mutantes para componentes de ambas as vias são mais susceptíveis do que apenas para a via Imd, sugerindo que a via Toll também desencadeia uma resposta relevante frente a bactérias Gram-negativas. Os mesmos mutantes duplos são mais sensíveis à infecção por Gram-positivos do que mutantes apenas para a via Toll, sugerindo que a via Toll é mais importante no combate frente a Gram-positivos, mas a via Imd também desempenha um importante papel na indução de resposta humoral desencadeada por Relish (Gregorio et al., 2002).

Além das vias Toll e Imd, outras vias parecem também ativar, embora com menor expressão, a síntese de peptídeos antimicrobianos, como a Jak/STAT e JNK (Imler, 2014).

### **1.3.5 Resposta imune em *Apis mellifera***

Enquanto o esqueleto de cada uma das vias (Toll e Imd) parece permanecer intacto em *Apis mellifera*, o número de componentes das vias é menor em relação a outros insetos (Evans et al., 2006). Este fenômeno pode ser reflexo de: em abelhas as sequências imunes são mais diversas e desta maneira componentes próprios das abelhas podem não ter sido pesquisados; as abelhas podem ter evoluído com vias ímpares de indução da resposta imune ou abelhas podem apresentar um espectro de patógenos mais estreito do que os demais insetos (Evans e Spivak, 2010). Evans e colaboradores (2006) sugeriram ainda que as abelhas reduziram os mecanismos de imunidade individuais em prol da gama de defesas sociais, o que explicaria a reduzida maquinaria imune observada pelo sequenciamento do genoma completo de *A. mellifera* (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006).

### 1.3.6 Peptídeos antimicrobianos (AMPs) já caracterizados em *Apis mellifera*

Muitos são os peptídeos constitutivamente expressos em *A. mellifera*. Recentemente, Resende e colaboradores (2013) realizaram uma avaliação proteômica da apitoxina, identificando proteínas, dentre as quais peptídeos antimicrobianos, comuns a três raças de abelhas: *A. mellifera* africanizada, *A. mellifera ligustica* e *A. mellifera carnica*, incluindo formas precursoras de Melitina e Jeleína I.

O peptídeo Melitina apresenta 26 resíduos de aminoácidos, com estrutura em  $\alpha$ -hélice e é o principal componente da apitoxina, constituindo cerca de 50% do peso seco do veneno de *Apis*. Apresenta ação antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Bazzo et al., 1988; Resende et al., 2013).

As Jeleínas constituem uma família de 4 peptídeos secretados na geléia real, com 8 a 9 resíduos de aminoácidos e carga total positiva. As Jeleínas I-III apresentam amplo espectro de ação frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, enquanto Jeleína IV não apresenta atividade antimicrobiana (Fontana et al., 2004; Fujita et al., 2013). A Royalisina, um peptídeo de 51 resíduos de aminoácidos, é secretado na geléia real, onde auxilia na defesa do epitélio intestinal frente a bactérias e na preservação da própria geléia real, com ação seletiva frente a bactérias Gram-positivas (Fugiwara et al., 1990).

Apesar de *A. mellifera* sintetizar constitutivamente vários peptídeos antimicrobianos como os descritos acima, importantes componentes do sistema de defesa deste inseto, os principais efetores da resposta imune humoral são aqueles que têm a síntese induzida após um estímulo microbiano. Trabalhos pioneiros de Casteels e colaboradores (1989; 1990; 1993; 1994) descreveram a indução e caracterização de vários peptídeos com atividade antimicrobiana em abelhas. O principal modo de ação é o aumento da permeabilidade da membrana plasmática (Da Silva, 2000).

O primeiro peptídeo indutível descrito em abelhas foi a Apidaecina (Figura 3). Presente em três isoformas (Ia, Ib e II), Apidaecinas são peptídeos curtos (18 aminoácidos) que diferem

em sua estrutura primária em apenas poucos resíduos. São ativos frente a bactérias Gram-negativas e os maiores componentes humorais na hemolinfa após uma infecção bacteriana (Casteels et al., 1989).

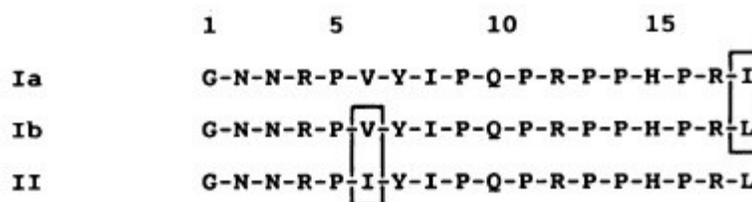


Figura 3. Estrutura primária dos peptídeos Apidaecinas Ia, Ib e II. As áreas circundadas referem-se aos aminoácidos diferentes entre as três moléculas (Fonte: Casteels et al., 1989).

O segundo peptídeo descrito em *Apis* foi Abaecina (Figura 4), com 34 resíduos de aminoácidos, ação moderada e retardada, se comparada às Apidaecinas, de amplo espectro frente a bactérias Gram-positivas e negativas (Casteels et al., 1990).

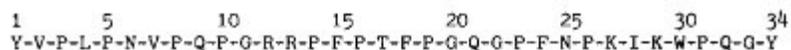


Figura 4. Estrutura primária do peptídeo Abaecina (Fonte: Casteels et al., 1990).

O maior peptídeo já descrito em *Apis* é a Hymenoptaecina (Figura 5), com 93 resíduos de aminoácidos. É ativo frente a bactérias Gram-positivas e principalmente Gram-negativas, provavelmente devido a interações iônicas existentes entre o peptídeo e a membrana plasmática bacteriana (Casteels et al., 1993).

<sup>1</sup> pE·E·R·G·S·I·V·I·Q·G·T·K·E·G·K·S·R·P·S·L·D·I·D·Y·K·Q·R·V·Y·D·K·<sup>31</sup>  
<sup>32</sup> N·G·M·T·G·D·A·Y·G·G·L·N·I·R·P·G·Q·P·S·R·Q·H·A·G·F·E·F·G·K·E·Y<sup>62</sup>  
<sup>63</sup> K·N·G·F·I·K·G·Q·S·E·V·Q·R·G·P·G·G·R·L·S·P·Y·F·G·I·N·G·G·F·R·F<sup>93</sup>

Figura 5. Estrutura primária do peptídeo Hymenoptaecina (Fonte: Casteels et al., 1993).

Duas Defensinas também foram caracterizadas em *Apis*, sendo codificadas por dois genes distintos. O gene polimórfico *defensina1* codifica tanto o peptídeo Defensina-1 quanto a Royalisina. Defensina 1 é um peptídeo com 51 resíduos de aminoácidos, que assim como outras defensinas animais, é rico em cisteína e apresenta carga total positiva, com ação frente a bactérias Gram-negativas. A segunda defensina caracterizada em *A. mellifera* é a Defensina 2, codificada pelo gene *defensina2*. É um peptídeo de 43 resíduos de aminoácidos, diferindo de outras defensinas de himenópteros pela estrutura primária (Klaudiny et al., 2005).

### 1.3.7 Outros genes relacionados à imunidade

#### 1.3.7.1 AmEater

Um interessante candidato à imunidade celular é a proteína AmEater (proteína Eater de *A. mellifera*). Esta é caracterizada por apresentar repetidos domínios EGF (*Epidermal growth factor*) em sua porção extracelular. Foi descrita como uma proteína transmembrana de reconhecimento, que age como receptor de superfície e parece ser a molécula predominante nos processos de fagocitose de bactérias mediada por macrófagos em *Drosophila*. Segundo Kocks e col (2005), AmEater participa nas etapas de reconhecimento celular e ligação ao patógeno

durante a fagocitose. Em *Drosophila knockout*, a não expressão de Eater resultou em perda significativa da ligação de bactérias à superfície de macrófagos. Simone e colaboradores (2009) já avaliaram este gene como candidato à imunidade celular em *A. mellifera*, obtendo resultados relevantes.

### 1.3.7.2 Vitelogenina

Vitelogenina (Vg) é uma proteína de estocagem, normalmente presente em fêmeas de animais ovíparos, com a função de reserva nutricional de ovócitos. Em abelhas *A. mellifera*, vitelogenina está presente também em larvas e adultos de ambos os sexos, como carregadora de lipídeos. Além da função metabólica descrita, Vg parece estar relacionada à imunidade e senescência em *Apis*: é a principal proteína carreadora de Zinco na hemolinfa de *A. mellifera*, componente estrutural e regulatório, responsável pela prevenção de estresse oxidativo e morte celular por apoptose (Amdam et al., 2004).

A expressão de Vg está intimamente relacionada aos níveis do Hormônio Juvenil (HJ), um hormônio gonotrófico. A concentração de hormônio juvenil é significativamente menor em abelhas nutrizas (ou aquelas que permaneceram viáveis durante todo o inverno em regiões temperadas) do que em forrageiras, sendo o contrário verdadeiro para os níveis de vitelogenina. A medida em que a abelha envelhece e assume outras funções dentro da colmeia, os níveis de hormônio juvenil aumentam e a concentração de vitelogenina diminui, caracterizando o início da atividade de forrageamento. A baixa na concentração de Vg é acompanhada pela queda de Zinco, que conseqüentemente diminui a concentração de hemócitos circulantes em *A. mellifera* (pela indução ao estresse oxidativo e conseqüente apoptose), diminuindo, portanto, a função imune deste animal (Munch & Amdam, 2010).

#### 1.4 Micro-organismos e abelhas

É sabido que as abelhas abrigam comunidades bacterianas (Gilliam, 1997; Cox-Foster et al., 2007; Olofsson & Vasquez, 2008; Martinson et al., 2011; Anderson et al., 2013; Corby-Harris et al., 2014) e de leveduras (Rosa et al., 2003, Teixeira et al., 2003, Garter, 2006) em seus corpos e ambiente circundante. Vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de explicar o papel dos micro-organismos em uma colônia apícola. Algumas hipóteses foram levantadas: contribuição bioquímica aos produtos apícolas, conversão metabólica, preservação do pólen e resistência a doenças (Gilliam, 1997; Evans & Spivak, 2010).

Para identificar o papel bioquímico dos micro-organismos, Gilliam e colaboradores (1988) administraram vários antibióticos na dieta das abelhas, para eliminação de grupos microbianos específicos. A análise intestinal dos insetos revelou que algumas enzimas relevantes no processo digestivo são produzidas apenas pelos grupos microbianos intestinais, principalmente membros da família Enterobacteriaceae e fungos.

As alterações sofridas pelo pólen corbicular para originar o pão de abelha parecem ser resultado da ação microbiana. Após coletar o pólen floral, as abelhas forrageiras o acomodam nas corbículas (pólen corbicular) e retornam à colmeia, onde o mesmo é transferido às abelhas nutrizas. Estas o compactam dentro das células dos favos de cria, cobrindo-o com uma pequena camada de mel para evitar a deterioração (Gilliam, 1979b). A conversão do pólen em pão de abelha é acompanhada por alterações bioquímicas, resultado de uma fermentação láctica, ocasionada por bactérias e leveduras adicionadas pelas abelhas, dos gêneros *Lactobacillus*, *Pseudomonas* e *Saccharomyces*. As espécies do gênero *Pseudomonas* contribuem para a anaerobiose requerida pelas espécies de *Lactobacillus*, além de degradarem as paredes dos grãos de pólen. Após a finalização da fermentação láctica, as leveduras aumentam em número e parecem ter um papel nutricional importante (Pain & Maugenet, 1966 apud Gilliam, 1979).

Um dos papéis mais relevantes da microbiota simbiote é a capacidade de aumentar a resistência a doenças em seus hospedeiros. Evans & Spivak (2010) citam que esta microbiota

deve influenciar positivamente a nutrição e produzir substâncias antagonistas para patógenos apícolas. Para estes autores, é possível que as abelhas tenham evoluído juntamente com microorganismos específicos capazes de provê-las destes benefícios, considerando essa microbiota como parte da imunidade social em *Apis*. Já foi demonstrado que bactérias isoladas de intestinos e larvas de *A. mellifera* são capazes de inibir *in vitro* patógenos apícolas como *Paenibacillus larvae* e *Ascosphaera apis* (Gilliam, 1997; Evans & Armstrong, 2005; Sabaté et al., 2009).

#### 1.4.1 Leveduras

As leveduras já foram isoladas de quase todos os substratos associados a abelhas, desde o pólen corbicular às fezes deste animal. Lachance et al. (2001) acreditam que a associação levedura-abelha não é uma ocorrência casual, mas indica uma relação funcional entre os dois grupos. Gilliam (1979a), em estudo microbiológico de pólen e pão de abelha, demonstrou que o número de espécies de leveduras decresce durante o processo fermentativo, aumentando após a fermentação e permanecendo no pão de abelha por mais tempo do que os demais microorganismos, provavelmente exercendo uma função nutricional relevante neste substrato.

Além dos substratos já citados, leveduras figuram na microbiota associada ao mel, à superfície corpórea e dejetos das abelhas. Leveduras osmofílicas (tolerantes a altas concentrações de açúcar) são capazes de crescer e fermentar o mel, convertendo os açúcares em dióxido de carbono e álcool e subsequentemente ácido acético, deteriorando o produto (Snowdon & Cliver, 1996). Há ainda leveduras associadas ao mel de abelhas sem ferrão que parecem aumentar a qualidade nutricional deste alimento (Teixeira et al., 2003).

Estudos de diversidade microbiana têm demonstrado que as abelhas abrigam comunidades específicas de leveduras e que estes insetos se caracterizam como uma rica fonte para a descoberta de espécies de leveduras ainda não descritas (Rosa et al., 2003). O clado *Starmerella*, cujo gênero de mesmo nome foi descrito para acomodar o estado sexual da espécie *Candida apicola* (Rosa & Lachance, 1998), contém mais de 40 espécies, que apresentam

em sua maioria afinidades por abelhas ou substratos que estes insetos visitam (Rosa et al., 2003; Daniel et al., 2013).

Alguns dos membros deste clado são: *Candida tilneyi* e *Candida powelli*, descritas em associação com a superfície corpórea de abelhas do gênero *Trigona* (Lachance et al., 2001a). *Candida batistae*, descrita em alimento, larvas e pupas das abelhas solitárias *Diastina distincta* e *Ptilotrix plumata* (Rosa et al., 1999). *Starmerella meliponinorum* e *Zygosacharomyces machadoi* foram descritas em diversos substratos associados à abelha *Tetragonisca angustula* (Teixeira, 2003; Rosa & Lachance, 2005). Pimentel e colaboradores (2005) descreveram mais duas espécies: *Candida riodocensis*, associada a alimento aprovocado, larvas e resíduos da espécie *Megachile* sp. e *Candida cellae*, associada a alimento da espécie *Centris tarsata*. *Starmerella neotropicalis* foi descrita em associação com corpo e alimento da abelha *Melipona quinquefasciata* (Daniel et al., 2013) e mais recentemente *S. aceti* foi descrita em ninhos da formiga *Acromyrmex balzani* (Melo et al., 2014).

#### 1.4.2 Bactérias

Bactérias têm sido vastamente identificadas em associação com diferentes espécies de abelhas, em especial *A. mellifera* (Gilliam, 1979b; Gilliam et al., 1985; Gilliam & Prest, 1987; Gilliam & Tabber, 1990; Gilliam, 1997; Kacaniona et al., 2004; Olofsson & Vásquez, 2008; Martinson et al., 2011; Vásquez et al., 2012, Anderson et al, 2013; Corby- Harris et al., 2014). Cano e colaboradores (1994) isolaram, amplificaram e sequenciaram fragmentos de DNA de bactérias do gênero *Bacillus* em tecido abdominal de abelhas já extintas, conservadas intactas por 25-40 milhões de anos em material âmbar, indicando a possível relação ancestral entre bactérias e abelhas.

Após os episódios de declínio acentuado de abelhas em 2006 no hemisfério Norte, denominado de *Colony Collapse Disorder* (CCD) e caracterizado pela perda de indivíduos adultos de uma colônia sem causa aparente (Cox-Foster et al., 2007), vários autores intensificaram a

busca por patógenos, provavelmente ainda não descritos, que poderiam estar afetando a sanidade das abelhas.

Segundo Evans & Spivak (2010), a compreensão de episódios de doença, como a CCD, é dificultada pela necessidade anterior de elucidar a interação entre os micro-organismos simbiossantes do próprio hospedeiro. Nesse sentido, além da pesquisa por patógenos, estudos foram conduzidos para caracterizar a microbiota bacteriana normal deste inseto.

Estudos pioneiros, baseados em cultivo, relataram o gênero *Bacillus*, pertencente ao filo Firmicutes, como o mais frequente associado a pólen e pão de abelhas (Gilliam, 1979b), intestinos (Gilliam e Tabber, 1990; Kacaniona et al., 2004) e material fecal larval de *A. mellifera* (Gilliam & Prest, 1987). Membros da família Enterobacteriaceae também figuraram como componentes típicos da microbiota intestinal destes insetos (Gilliam, 1997).

Cox-Foster e colaboradores (2007) estabeleceram, por meio de técnicas metagenômicas, a microbiota bacteriana intestinal de abelhas *A. mellifera* nos Estados Unidos. O grupo mais abundante observado pelos autores foi o filo Proteobacteria, em especial membros da classe Gammaproteobacteria, seguidos por membros da classe Betaproteobacteria, filo Firmicutes, (especialmente sequências de alta homologia com espécies do gênero *Lactobacillus*), classe Alphaproteobacteria e filo Actinobacteria, representado basicamente por sequências de alta homologia com espécies do gênero *Bifidobacterium* (Figura 6). Uma pequena porcentagem de espécies, em torno de 5%, não havia sido descrita anteriormente em associação com *A. mellifera*.

Resultados semelhantes foram observados na África do Sul (Jeyaprakash et al., 2003), Suíça (Babendreier et al., 2006), Alemanha (Mohr & Tebbe, 2006) e Suécia (Olofsson & Vásquez, 2008), sugerindo que a associação entre estes grupos bacterianos e abelhas é altamente conservada, independente do ambiente, localização geográfica e sub-espécie de abelha. Martinson et al. (2011) citam que esta associação pode representar uma relação simbiótica co-evolutiva, mantida através de gerações

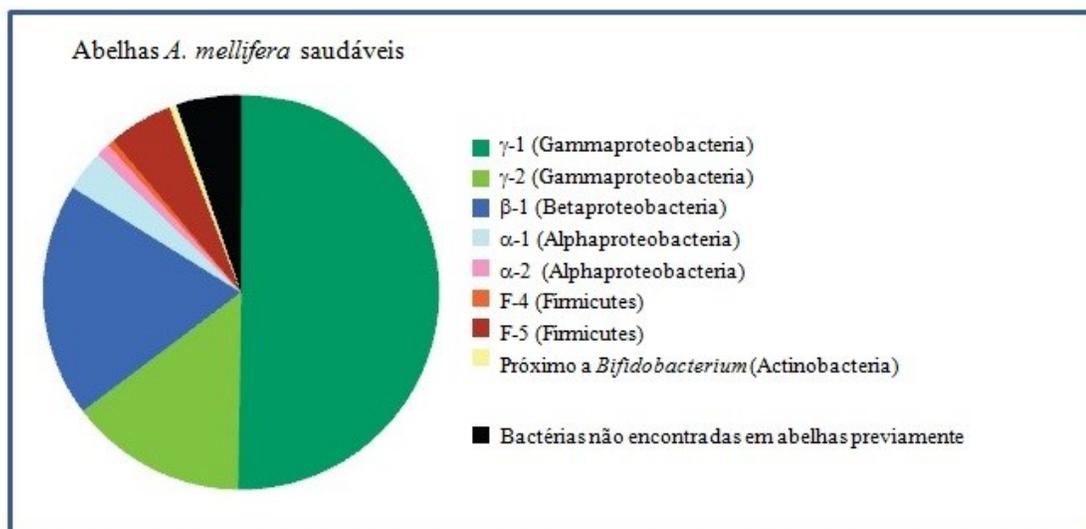


Figura 6. Composição da microbiota bacteriana intestinal de *A. mellifera*. Ilustração modificada de Cox-Foster e colaboradores (2007).

A microbiota da vesícula nectarífera (papo ou estômago de mel), estrutura expansível onde o néctar e água são armazenados após a coleta, também foi caracterizada. Esta estrutura é parte do trato alimentar da abelha e termina no proventrículo, estrutura imediatamente anterior ao intestino (ventrículo), o que assegura que o néctar esteja livre de contaminação ventricular. Corby-Harris et al. (2014) citam que o estômago de mel representa a interseção entre o compartimento/armazenamento de alimentos e o ambiente de polinização, pois recebe do ambiente a carga microbiana presente no néctar floral e água, “filtrando”, pela alta osmolaridade, os micro-organismos capazes de sobreviver neste substrato. A microbiota desta região é composta por treze filotipos, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo *L. kunkeii* o principal representante (Olofsson & Vásquez, 2008).

Estudos mais recentes têm abrangido uma esfera maior de micro-ambientes associados à *A. mellifera*. Anderson et al. (2013) avaliaram, por meio de técnicas baseadas em cultivo e metagenômica, a microbiota bacteriana de mel, pão de abelhas, estômago de mel, intestino e néctar de flores visitadas pelas abelhas. Os autores constataram que as bactérias observadas no néctar floral foram frequentemente isoladas do ambiente da colmeia e trato alimentar de *A.*

*mellifera*. O filo Firmicutes foi o mais prevalente, em especial a espécie *Lactobacillus kunkeii*, com presença massiva no estômago de mel, porção posterior do intestino, pão de abelhas e flores.

Corby-Harris et al. (2014) estudaram, também por meio de técnicas metagenômicas, a microbiota proventricular, intestinal e do pólen corbicular de *A. mellifera*. Os autores evidenciaram que a microbiota associada ao pólen corbicular é proveniente do filoplano ou ambiente circundante das colmeias e é mais diversa do que aquela observada no estômago de mel e intestino, esta última sendo similar entre abelhas nutrizas e forrageiras.

O estudo das interações entre leveduras, bactérias, *A. mellifera* e ambiente circundante das colmeias trará uma melhor compreensão das relações ecológicas existentes entre microorganismos e abelhas.

## 2 JUSTIFICATIVA

As abelhas defendem suas colmeias por meio de mecanismos sociais e individuais. O estudo de mecanismos sociais tem recebido atenção da comunidade científica. Neste cenário, a própolis, um componente estrutural com reconhecida atividade antimicrobiana, figura entre os mais promissores mecanismos sociais, pois sua utilização não se restringe à colmeia produtora, podendo ser facilmente empregada em diversas outras, como agente profilático ou terapêutico. A influência que a própolis pode apresentar em nível imunológico pode ser verificada através da avaliação da expressão de genes relacionados à imunidade, como os codificadores para peptídeos antimicrobianos, principais moléculas efetoras na defesa de *A. mellifera*. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da exposição à própolis após estimulação do sistema imune com suspensões microbianas, em abelhas de dois diferentes locais, o que até o momento ainda não se tem relato.

Além da avaliação de um componente estrutural nas defesas individuais de abelhas, o presente trabalho tem por objetivo o estudo dos micro-organismos associados a *A. mellifera*. Embora vários autores tenham concentrado seus esforços na busca de micro-organismos associados à abelhas, a maioria das espécies novas de leveduras são descritas em associação a abelhas não *Apis*. Grande parte dos estudos sobre bactérias em abelhas contemplam a microbiota de partes anatômicas específicas de *A. mellifera*. No presente trabalho, buscou-se o levantamento dos micro-organismos em diversos substratos associados a *A. mellifera*, comparando dois locais de estudo. Os métodos empregados, baseados em cultivo e identificação por técnicas de biologia molecular, possibilitam a avaliação funcional dos micro-organismos, identificação acurada e informação filogenética entre as espécies microbianas. Os resultados advindos deste estudo trazem o Brasil à luz das pesquisas sobre comunidades microbianas associadas a *A. mellifera*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

Os objetivos gerais deste trabalho foram avaliar o papel da própolis na resposta imune em abelhas *A. mellifera*, pela expressão relativa de genes relacionados à imunidade e o estudo da diversidade de bactérias e leveduras associadas a diferentes substratos de *A. mellifera* no Brasil e nos Estados Unidos.

#### 3.2 Específicos:

- Avaliar a expressão dos genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos (Hymenoptaecina, Abaecina, Apidaecina e Defensina 1), da proteína de reconhecimento celular (AmEater) e da proteína de estocagem (Vitelogénina) em *A. mellifera*, em resposta a desafios com representantes de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Escherichia coli*) e levedura de importância clínica (*Candida albicans*);
- Avaliar o efeito da própolis verde na expressão destes genes;
- Avaliar a variação sazonal na expressão destes genes nos Estados Unidos, comparando inverno e verão;
- Comparar a expressão destes genes entre abelhas provenientes do Brasil e Estados Unidos;
- Isolar leveduras e bactérias de diferentes substratos associados à *A. mellifera*: pólen corbicular, pão de abelha, resíduos da colmeia, conteúdo intestinal, superfície corpórea de abelhas nutrízes e forrageiras;
- Identificar os micro-organismos isolados, utilizando metodologia molecular;
- Comparar as comunidades bacterianas e de leveduras associadas a *A. mellifera* nos dois países.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Abelhas e apiários

Foram utilizadas no Brasil abelhas *Apis mellifera* africanizadas (Hymenoptera: Apidae), provenientes de apiário experimental em Carmo da Mata, localizado na região Oeste do estado de Minas Gerais - MG, nas coordenadas 20°33'21" de latitude Sul e 44°51'45" de longitude Oeste (Figura x, a). Este apiário é mantido pelo Serviço de Recursos Vegetais e Opoterápicos, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, em Belo Horizonte, MG (Figura 7, a).

Nos experimentos conduzidos nos Estados Unidos, foram utilizadas abelhas *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae), provenientes dos apiários experimentais Water Tower (WT) e Food and Drug Administration (FDA), ambos em Beltsville, Maryland (MD), cidade localizada no extremo Oeste dos Estados Unidos, sob as coordenadas 39°2'15" de latitude Norte e 76°55'4" de longitude Oeste (Figura x, b). Ambos os apiários são mantidos pelo Bee Research Lab, United States Department of Agriculture (BRL-USDA) (Figura 7, b).

As mesmas colmeias foram amostradas no inverno e verão, bem como para as análises microbiológicas. A coleta de abelhas para ensaios de expressão gênica no Brasil foi realizada uma vez, em 13 de abril de 2013, não sendo possível a comparação entre diferentes estações. No momento da coleta a temperatura foi de 32°C. Nos Estados Unidos, a primeira coleta de abelhas para ensaios de expressão gênica foi realizada em 20 de março de 2013, durante o inverno, período em que normalmente as temperaturas variam de 0 a 15°C. As condições climáticas no momento da coleta foram: temperatura de 13°C e umidade relativa do ar de 41%. A segunda coleta de abelhas foi realizada em 24 de julho de 2013, durante o verão, com temperaturas chegando a 30°C. As condições climáticas no momento da coleta foram: temperatura de 26°C, umidade relativa do ar de 79%. Todas as coletas de abelhas em campo foram realizadas em dias sem precipitação ou correntes de vento



Figura 7. Localização geográfica das cidades de (a) Carmo da Mata (Minas Gerais, Brasil) e (b) Beltsville (Maryland, Estados Unidos), onde os apiários experimentais foram instalados.

#### 4.2 Avaliação da resposta imune de *A. mellifera* frente a micro-organismos representativos

Aproximadamente 150 abelhas adultas (com duas semanas de idade) foram coletadas de quatro colônias do apiário experimental no Brasil (colmeias 01, 02, 03 e 04). Nos Estados Unidos, o mesmo número de abelhas com idade semelhante foi coletado de quatro colônias, sendo duas pertencentes a cada apiário no USDA (apiário FDA: colmeias 226 e 337; apiário WT: colmeias 40 e 49). As abelhas foram transportadas até os laboratórios em gaiolas plásticas e

foram incubadas a 34°C *overnight*, com solução de 50% de açúcar em água *ad libitum*, até o experimento de desafio.

#### 4.2.1 Micro-organismos

Como representantes bacterianos, foram utilizados *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram-positiva) e *Escherichia coli* JM109 (Gram-negativa) (Sigma Aldrich®), célula competente utilizada em ensaios de transformação). Como representante fúngico, foi escolhida a levedura *Candida albicans* ATCC 10321. Estas espécies microbianas foram escolhidas por sabidamente não causarem doenças em abelhas, classificando-os como representativos dos grupos microbianos.

As bactérias foram cultivadas em ágar BHI e a levedura em ágar batata, a 35°C por 24 h. Após este período, as suspensões microbianas foram preparadas em solução salina esterilizada, à concentração final de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL para bactérias e de  $1,5 \times 10^2$  UFC/mL para leveduras.

#### 4.2.2 Experimento de desafio da resposta imune: Brasil

O experimento de desafio foi realizado em abril de 2013. No dia do experimento, as abelhas de cada colônia foram anestesiadas em gelo e divididas em seis grupos de 15 indivíduos: grupo inoculado por *S. aureus* (As), por *E. coli* (Ec), por *C. albicans* (Ca), por solução salina esterilizada (Sal), grupo controle (C) e grupo controle exposto a própolis (Cp). Os controles não foram inoculados com micro-organismos ou salina. Nos grupos inoculados, um volume de aproximadamente 0,2 µL das suspensões correspondentes foi injetado manualmente no abdome das abelhas, entre o segundo e terceiro segmento abdominal da cutícula dorsal, utilizando uma agulha de 6 mm x 0,25 mm (31G) (Becton Dickinson), previamente submersa nas soluções. Para

cada grupo, uma nova agulha foi utilizada. Após inoculação, todos os grupos, exceto o último, foram transferidos para gaiolas plásticas sem própolis, sendo o último transferido para uma gaiola previamente tratada com uma solução de extrato de própolis verde. As gaiolas foram mantidas a 34°C, com solução de 50% de açúcar em água *ad libitum*.

Dez horas após, apenas as abelhas vivas foram congeladas a -20°C. Os abdomes foram coletados, submersos em 400 µL of RNAlater® Tissue Collection (Ambion®) e enviados sob refrigeração para o BRL-USDA, onde foram analisados. Ao chegar, as amostras foram mantidas a -80°C até a extração de RNA.

#### **4.2.3 Experimento de desafio da resposta imune: Estados Unidos**

Nos Estados Unidos, o experimento foi realizado em março (inverno) e julho (verão) de 2013. As abelhas foram anestesiadas como descrito e divididas em cinco grupos de 30 indivíduos: grupo inoculado por *S. aureus*, por *E. coli*, por *C. albicans*, por solução salina esterilizada e grupo controle. Nos grupos inoculados, as suspensões correspondentes foram injetadas utilizando uma seringa Hamilton com agulha de 30 gauge, no equipamento UltraMicroPump com SYS-Micro4™ Controller, World Precise Instruments, acoplado ao microscópio Wild 420, Leica Microsystems (Figura 8). Agulha e seringa foram desinfetadas entre os grupos com uma solução de álcool 70%. Assim como descrito acima, o grupo controle não foi inoculado. Depois da inoculação, os grupos foram subdivididos em dois, sendo metade das abelhas transferidas para gaiolas sem própolis e a outra metade para gaiolas previamente tratadas com uma solução de extrato comercial de própolis verde (Santa Bárbara®). As abelhas foram incubadas como descrito e após 10 horas, os indivíduos vivos foram coletados e mantidos a -80°C, até a extração de RNA.

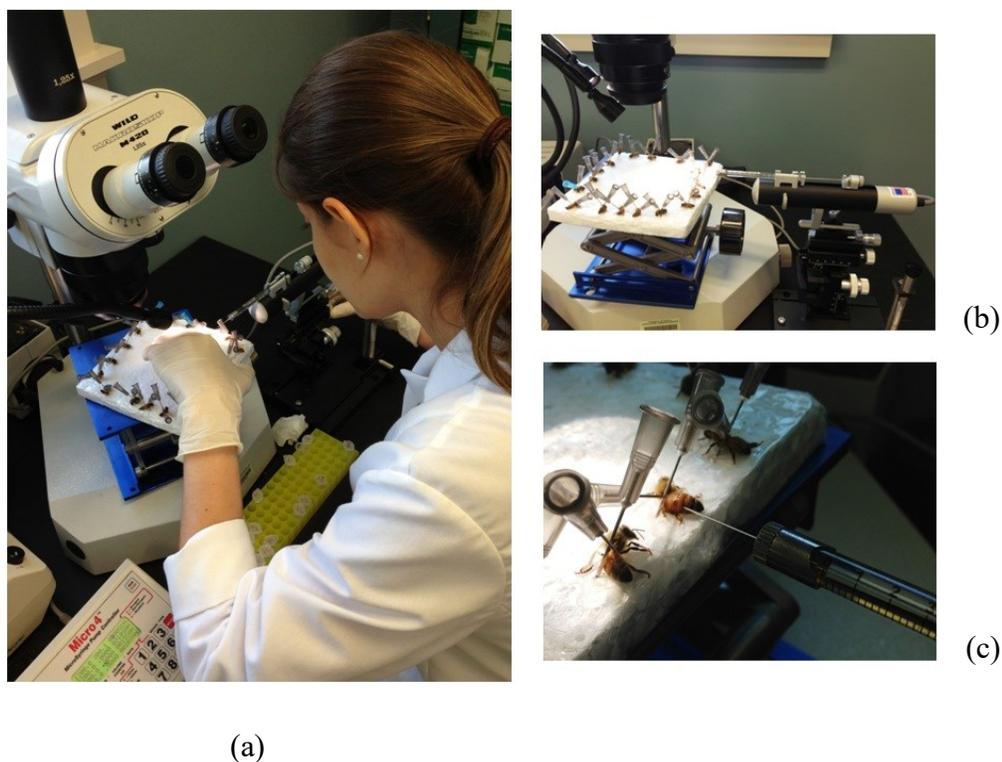


Figura 8. (a) Inoculação das suspensões microbianas nas abelhas nos Estados Unidos, utilizando o equipamento UltraMicroPump com SYS-Micro4<sup>TM</sup> Controller, World Precise Instruments, acoplado ao macroscópio Wild 420, Leica Microsystems. Em (b) detalhe do equipamento e em (c) demonstrando a exata posição da inoculação nas abelhas.

#### 4.2.4 Extração de RNA e Dosagem

O RNA total foi extraído do abdome das abelhas utilizando o reagente TRIzol (Ambion<sup>®</sup>), de acordo com as recomendações do fabricante e após, quantificado por espectrofotometria no equipamento NanoDrop ND 8000, Thermo Scientific.

#### **4.2.5 Síntese de cDNA**

O DNA contaminante foi removido por tratamento das amostras com DNase I por 1 h a 37°C, seguida de 10 min a 72°C (10 U DNase I em tampão apropriado) e 20 U do inibidor de RNase RNain (Ambion®).

Após descontaminação, a fita de cDNA foi gerada a partir de RNA total usando 50 U da enzima Superscript II (Invitrogen™) em tampão apropriado, 2 nmol de mix de DNTP, 40 U de Random 7, 0.1 nmol do iniciador poly dT (12-18) e 200 µL de DDT. A síntese foi conduzida a 42°C por 1 h, seguida de 15 min a 70°C. Após, o cDNA foi diluído 1:5 em água padrão molecular e estocado a -20°C, até a execução de PCR em tempo real (qPCR).

#### **4.2.6 Avaliação da abundância de transcritos para genes de interesse por meio de qPCR**

Os produtos de DNA de alvos específicos foram amplificados em placas de 96 poços, no termociclador Icyler Real Time PCR (Bio-Rad). Vinte microlitros de cada reação consistiam de 0.2 µM de cada iniciador (senso e antisenso) em 19 µL de 1.0 x SSoAdvanced SYBR®-Green Supermix (Bio-Rad) e 1,0 µL da amostra. Iniciadores, categoria dos mesmos, número para acesso no GenBank e referências são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores, categoria dos mesmos, número para acesso no GenBank e referências.

Alvo	Categoria do gene	Sequências dos iniciadores	Código de acesso GenBank	Referência
RPS5	Controle	Senso - AATTATTTGGTCGCTGGAATTG Antisenso - TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	GB11132	Evans e Wheller, 2000
Abaccina	AMP	Senso - CAGCATTCGCATACGTACCA Antisenso - GACCAGGAAACGTTGGAAAC	GB18323	Evans et al., 2006
Apidaecina	AMP	Senso - TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG Antisenso - GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT	GB17782	Evans et al., 2006
Defensina 1	AMP	Senso - TGCCTGCTAACTGTCTCAG Antisenso - AATGGCACTTAACCGAAACG	GB19382	Evans et al., 2006
Hymenoptaecina	AMP	Senso - CTCTTCTGTGCCGTTGCATA Antisenso - GCGTCTCCTGTCATTCCATT	GB17538	Evans et al., 2006
Vitelogenina	PE	Senso - AGTTCCGACCGACGACGA Antisenso - TTCCCTCCCACGGAGTCC	NP001011578	Piulachs et al., 2003
AmEater	PR	Senso - CATTGCCAACCTGTTTGT Antisenso - ATCCATTGGTGCAATTTGG	GB14645	Evans et al., 2006

Legenda: AMP: peptídeo antimicrobiano; PE: proteína de estocagem; PR: proteína de reconhecimento celular.

As reações de qPCR foram conduzidas nas condições: 95°C por 3 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 min. A fluorescência foi medida em cada ciclo durante o anelamento (a 58°C) com excitação a 497 nm e filtração a 520 nm.

#### 4.2.7 Análise dos dados de qPCR

Ct (*Cycle Threshold*), ou ciclo limite para qPCR, é definido como o ciclo em que há a intersecção da curva de amplificação do gene alvo em uma linha limiar (*Threshold*), que ocorre quando a fluorescência nos poços se torna maior do que 10 vezes a média do desvio padrão entre todas as amostras (Simone et al., 2009). Esta é a medida utilizada para análise de dados em qPCR.

Valores de Ct para cada um dos genes alvo foram subtraídos dos valores de Ct do gene controle RPS5 (*Ribossomal Protein S5*) nas amostras, a fim de obter a medida de abundância relativa de cDNA. Este gene foi escolhido como controle da expressão por ser constitutivo e, portanto, mantém os níveis de expressão independente dos tratamentos aos quais as abelhas foram submetidas e por já ter sido utilizado como controle em trabalhos anteriores (Evans & Wheller, 2000; Schwarz & Evans, 2013; Jefferson et al., 2013).

#### 4.2.8 Análise estatística da expressão gênica

Os dados amostrais foram verificados quanto à normalidade. Assumindo dados com distribuição não normal, o teste utilizado para verificar a influência das estações na expressão relativa de genes relacionados à imunidade e as diferenças na expressão de cada gene entre os pares de tratamentos foi o Mann-Whitney  $U$ , com nível de significância de 5%. Para verificar diferenças na expressão relativa de genes entre colmeias, o teste Kruskal-Wallis  $H$  foi utilizado, também ao nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R versão 15.2.

### **4.3 Diversidade microbiana associada a Abelhas *Apis mellifera***

#### **4.3.1 Coleta de material para análise microbiológica**

Três coletas de amostras para análises microbiológicas foram realizadas no apiário experimental em Carmo da Mata, Brasil (descrito no item 4.1), em 19 de abril, 26 de julho e 27 de outubro de 2011. Em cada coleta, foram amostradas cinco colmeias experimentais de *A. mellifera*, sendo as mesmas colmeias amostradas nas três coletas e para os ensaios de expressão gênica. O material coletado foi transportado, sob-refrigeração, até o Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte, MG, para processamento.

Duas coletas foram realizadas nos apiários experimentais em Beltsville, Estados Unidos (descritos no item 4.1), em abril e julho de 2013. Em cada coleta, foram amostradas quatro colmeias experimentais de *A. mellifera ligustica*, duas em cada apiário experimental (WT e FDA), sendo as mesmas colmeias amostradas nas duas coletas. O material amostrado foi transportado, sob-refrigeração, até o Bee Research Lab, USDA, para processamento.

Em cada coleta, os substratos amostrados foram:

- Pólen corbicular: pólen compactado nas corbículas, coletado por meio de coletores de pólen, fixados no alvado das caixas por duas horas. O conteúdo das gavetas foi transferido para sacos plásticos estéreis (Figura 9).



Figura 9. Retirada da gaveta do coletor de pólen, instalado no alvado da colmeia, para coleta de pólen.

- Pão de abelhas (alimento): coletado dos quadros de alimento no interior das caixas, por meio de um corte com bisturi circundando em torno de 6 potes de alimento, os quais apresentavam-se totalmente abertos (maduros) (Figura 10). O material retirado dos quadros foi transferido para sacos plásticos estéreis. No laboratório, apenas o conteúdo dos potes foi amostrado.

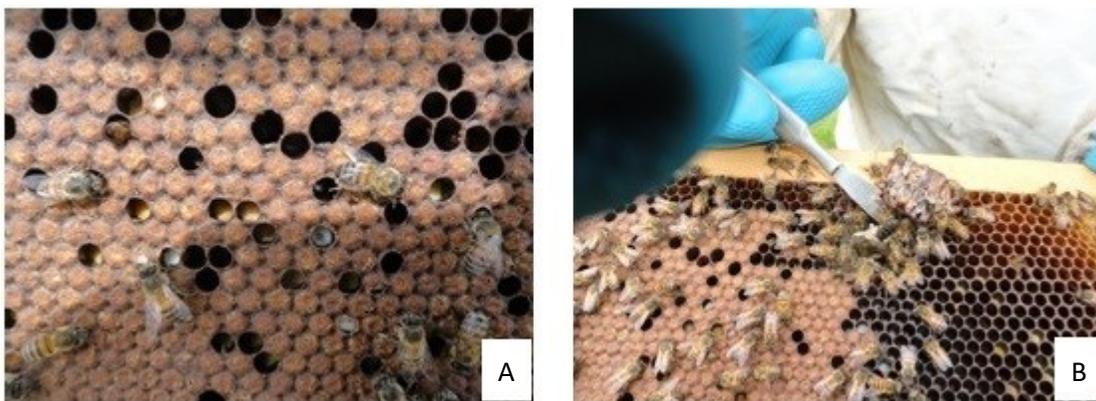


Figura 10. (a) quadros de alimento; (b) retirada de material do quadro de alimento.

- Resíduos da colmeia: material depositado na base interna da colmeia, coletado com auxílio de espátulas esterilizadas e transferido para sacos plásticos estéreis (Figura 11).



Figura 11. (a) Abertura da colmeia para (b) coleta dos resíduos na base da mesma.

- Superfície corpórea de abelhas nutrizes e forrageiras: foram amostrados sessenta (60) indivíduos adultos por colmeia em cada coleta, sendo trinta (30) correspondentes às abelhas nutrizes e trinta (30) às forrageiras. Cinco indivíduos foram coletados por placa de petri, em duplicata para cada meio de cultura. As abelhas caminharam sobre a superfície do ágar por 5 min e foram liberadas (Figura 12) (Lachance et al., 2001a).



Figura 12. Coleta de abelhas nutrizes (a) e forrageiras (b).

- Conteúdo intestinal: 5 abelhas (por coleta no Brasil e por colmeia nos Estados Unidos) foram amostradas e transportadas até o laboratório. Após lavagem corpórea superficial com álcool 70%, foram realizadas incisões laterais na região abdominal com tesoura oftálmica, para coleta do conteúdo intestinal com pipeta Pasteur plástica, esterilizada. O conteúdo intestinal dos cinco indivíduos foi agrupado.

#### 4.3.2 Processamento

O pólen corbicular, pão de abelha, resíduos das colmeias e conteúdo intestinal foram processados assepticamente, como segue: alíquotas de 0,1 g foram diluídas em 0,9 mL de água peptonada esterilizada (0,01% peptona bacteriológica) (diluição  $10^{-1}$ ). Foram realizadas diluições até  $10^{-3}$ . Das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-3}$  foram plaqueados, em duplicata, 100  $\mu$ L nos meios sólidos: extrato de malte - extrato de levedura (YM) acrescido de cloranfenicol (extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5 %, glicose 1%, ágar 2% e cloranfenicol 0,02%) para isolamento de leveduras, MRS (Difco<sup>TM</sup>) acrescido de 0,01% de ciclohexamida, para o isolamento de bactérias lácticas e Eugon (peptona de caseína 1,5%, glicose 0,55%, peptona de soja 0,5%, cloreto de sódio 0,4%, L-cistina 0,07%, sulfito de sódio 0,02%, ágar 2%) acrescido de 0,01% de ciclohexamida, para o isolamento dos demais grupos bacterianos (Gilliam, 1979b). Após plaqueamento, as placas de YM foram incubadas a 25°C, por 48 h, as de MRS a 37°C, por 24 h (placas correspondentes às diluições  $10^{-3}$  em jarra de anaerobiose) e as de Eugon a 37°C, por 24 h, em aerobiose. As placas em que as abelhas caminharam foram incubadas nas mesmas condições descritas. Após períodos de incubação específicos, as placas foram analisadas quanto ao número e diversidade de morfotipos. A contagem dos isolados foi expressa em UFC/g ou UFC/indivíduo.

### 4.3.3 Isolamento e preservação dos micro-organismos

Um representante de cada morfotipo foi purificado por plaqueamento em superfície, em meio YM, MRS ou Eugon. Os isolados de leveduras que cresceram no meio YM foram inoculados em caldo GYMP (glicose 2,0%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e fosfato de sódio monobásico 0,2%), incubados a 25°C por 24 h, e criopreservados em ultrafreezer a -80°C, após a adição de 20% de glicerol estéril.

Os isolados bacterianos que cresceram no meio MRS foram inoculados em caldo MRS, incubados a 37°C por 24 h, em aerobiose (isolados das placas referentes às diluições 10<sup>-1</sup>) ou anaerobiose (isolados das placas referentes às diluições 10<sup>-3</sup>) e criopreservados como descrito para as leveduras. Os isolados bacterianos que cresceram no meio Eugon foram inoculados em caldo BHI, incubados a 37°C por 24 h, em aerobiose e criopreservados como descrito.

### 4.4 Identificação de leveduras

As leveduras foram agrupadas de acordo com a similaridade em testes fisiológicos (Kurtzman et al., 2011). Aquelas com perfis fisiológicos idênticos foram caracterizadas molecularmente pela técnica de PCR *fingerprinting*, para posterior identificação por sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS) e dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.

#### 4.4.1 Extração de DNA de leveduras

Alíquotas das colônias de leveduras foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise. Os tubos foram incubados a 65°C por 30 min. Foram adicionados 100 µL da solução de clorofórmio:álcool-isoamílico (24:1). Após centrifugação a 14.800 rpm por 10 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e a este foi adicionado isopropanol v/v. Após precipitação à temperatura ambiente por 15 min, os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram lavados com 100 µL de etanol 70% gelado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 13000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o restante de etanol eliminado por evaporação *overnight*. O DNA foi então ressuspendido em 50 µL de tampão TE e armazenado a -20°C.

#### 4.4.2 Agrupamento molecular por PCR *fingerprinting*

O agrupamento molecular foi realizado apenas para os isolados obtidos no Brasil. O iniciador utilizado foi o microsatélite (GTG)<sub>5</sub> (Silva-Filho et al., 2005). Para a reação, foram utilizados: 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,1 mM (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (MBI Fermentas), 2 µL do iniciador (GTG)<sub>5</sub> 10 µmol-1 (Invitrogen), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas), 1,0 µL de betaína (Sigma-Aldrich), 0,5 µL de DMSO (Sigma), 1 µL de DNA e água deionizada q.s.p. 25 µL. As reações foram realizadas em um termociclador Eppendorf (Mastercycler<sup>®</sup> pro) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por um min e extensão a 72°C por um min, seguidos de extensão final a 72°C por seis min.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) com voltagem fixa em 80 V, para a separação das bandas. Os géis foram corados com

solução de Gelred (Biotium, EUA), revelados sob luz ultravioleta (UV) e documentados em sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França). Um representante de cada grupo molecular foi escolhido para identificação.

#### **4.4.3 PCR para amplificação dos domínios D1/D2 ou região ITS da subunidade maior do gene do rRNA**

A identificação das leveduras foi realizada por meio do sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior (26S) do gene do RNA ribossomal – rRNA, região de 600 pares de base (pb) que apresenta no máximo de 2 a 3 pares de bases diferentes, não contíguos, em isolados da mesma espécie e com variabilidade interespecífica suficiente para discriminar entre diferentes espécies (Kurtzman & Robnett, 1998). Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). As reações foram realizadas utilizando 5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (MBI Fermentas), 1 µL do iniciador NL1 10 µmol-1 (Invitrogen), 1 µL do iniciador NL4 10 µmol-1 (Invitrogen, EUA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas), 1,0 µL de betaína (Sigma-Aldrich), 0,5 µL de DMSO (Sigma), 1 µL de DNA e água deionizada q.s.p. 50 µL. A reação foi realizada em termociclador Eppendorf (Mastercycler<sup>®</sup> pro), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por dois min, trinta e cinco ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram revelados como descrito para a PCR *fingerprint*, em gel de agarose a 1% e voltagem de 120 V.

Quando o sequenciamento da região D1/D2 não foi suficiente para a identificação da espécie ou quando a confirmação da identificação se fez necessária, os isolados foram submetidos ao sequenciamento da região espaçadora interna transcrita (ITS) da subunidade maior do gene do rRNA (Schoch et al., 2012), utilizando os iniciadores ITS1

(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por cinco min, trinta e cinco ciclos de desnaturação a 94°C por um min, anelamento a 55°C por um min e extensão a 72°C por um min, seguidos de extensão final a 72°C por cinco min. A análise dos produtos amplificados ocorreu de maneira idêntica à descrita para o sequenciamento da região D1/D2.

#### **4.4.4 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento**

Produtos da PCR com os iniciadores NL1/NL4 ou ITS1/ITS4 foram purificados com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e etanol absoluto. Foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto aos produtos de PCR. O conteúdo foi homogeneizado por inversão e precipitado na bancada por 15 min a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 25 min, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 120 µL de etanol 70% gelado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 13000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o restante de etanol eliminado por evaporação *overnight*. O DNA purificado foi então ressuscitado em 10 µL de água deionizada, e incubado a 37°C por 30 min. A dosagem de DNA foi realizada em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e os tubos foram armazenados a -20°C.

### **4.5 Identificação de bactérias**

#### **4.5.1 Extração de DNA bacteriano**

O DNA total das bactérias foi extraído a partir de uma adaptação do método descrito por Hoffman & Winston (1987). Aliquotas das colônias foram ressuscitadas em 100 µL de TE. Aos

tubos foram adicionados 100  $\mu$ L da solução de fenol: clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) e em torno de 0,3 g de pérolas de vidro. Os tubos foram homogeneizados por 3,5 min e centrifugados a 13000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e a este foi adicionado v/v de etanol 96% gelado. O conteúdo foi homogeneizado por inversão e os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi desprezado e o restante de etanol eliminado por evaporação *overnight*. O DNA foi então ressuspensionado em 50  $\mu$ L de TE e armazenado a -20°C.

#### 4.5.2 PCR para amplificação do gene da subunidade menor (16S) do rDNA

A identificação das bactérias foi realizada por meio do sequenciamento do gene da subunidade 16S do rDNA, amplificada com os iniciadores 27F (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1495R (CTACGGCTACCTTGTTACGA), segundo Weisburg et al. (1991). A amplificação desta região resulta em um amplicon em torno de 1468 pb e, assim como a região D1/D2 em leveduras, também apresenta regiões altamente conservadas intra-espécies e polimorfismo interespecífico suficiente para a identificação de espécies (Clarridge III, 2004).

As reações de PCR utilizaram: 5  $\mu$ L de tampão 10X (MBI Fermentas), 1  $\mu$ L de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (MBI Fermentas), 1  $\mu$ L do iniciador 27F 10  $\mu$ mol-1 (Invitrogen, EUA), 1  $\mu$ L do iniciador 1495R 10  $\mu$ mol-1 (Invitrogen, EUA), 0,25  $\mu$ L de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas), 1  $\mu$ L de DNA e água deionizada q.s.p. 50  $\mu$ L. A reação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Mastercycler<sup>®</sup>pro) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por dois min, trinta ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto e meio, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos.

### **4.5.3 Agrupamento por perfil de digestão do DNA**

O agrupamento de isolados bacterianos foi realizado para os isolados do Brasil. Para as bactérias obtidas nos Estados Unidos foi realizado o sequenciamento da subunidade 16S do gene do rRNA de todos os isolados.

Os produtos de PCR obtidos como descritos no item anterior foram tratados com as enzimas de restrição *Hinf*I, *Hae*III e *Msp*I. Para cada 1500 ng/ $\mu$ L de DNA, foram adicionados 2  $\mu$ L de tampão 10 X, 2  $\mu$ L de albumina de soro bovino (BSA), 1  $\mu$ L de enzima e água q.s.p. 20  $\mu$ L. Os tubos foram incubados a 37°C por três horas. Os fragmentos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha), como descrito no item 4.4.2. Um representante de cada grupo molecular foi escolhido para sequenciamento. A PCR com os iniciadores 27F e 1495R foi repetida e os produtos desta purificados para sequenciamento como descrito no item 4.4.4.

## **4.6 Sequenciamento**

As reações de sequenciamento foram realizadas no equipamento ABI3130 da Valid Biotecnologia, Laboratório de Genética Animal, Escola de Veterinária da UFMG e no sistema automatizado Mega-BACE<sup>TM</sup> 1000, do Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, da UFMG. Nos Estados Unidos, as reações de sequenciamento foram realizadas no equipamento ABI3730xl do Instituto de Pesquisa em Biociência e Biotecnologia, Universidade de Maryland, College Park, MD, US e na Unidade de Sequenciamento, Centro de Biotecnologia da Universidade de Wisconsin, Madison, WI.

#### 4.6.1 Análise de sequências

Os cromatogramas obtidos para cada isolado foram avaliados quanto à qualidade do sequenciamento pela ferramenta online PHPH, pacote PHRED, disponível em [HTTP://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/](http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/) (Togawa & Brigido, 2003), sendo selecionados para análise apenas sequências contíguas de pares de base com escore superior a 20.

As sequências selecionadas foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – nucleotide) versão 2.215 do BLAST 2.0, disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e comparadas com aquelas já depositadas no GenBank, provenientes de coleções de cultura ou publicações em periódicos indexados. Os seguintes critérios foram utilizados para interpretação dos resultados: isolados que apresentaram  $\geq 99\%$  de similaridade com aqueles já depositados foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Aqueles que apresentaram 98% de similaridade foram designados com o termo “similar”. Isolados que apresentaram similaridade inferior a 98% podem representar uma nova espécie.

#### 4.6.2 Análises Filogenéticas

As sequências em identificação foram alinhadas com as sequências idênticas ou com máxima similaridade resultantes da análise no BLASTn, utilizando o método CLUSTAL W, no programa MEGA, versão 6.06 (Tamura et al., 2013), para confirmação da identidade.

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o método *Neighbor Joining* (NJ), também no programa MEGA, versão 6.06. A análise de *bootstrap* com mil réplicas foi utilizada para gerar maior confiabilidade aos valores dos grupamentos.

#### **4.7 Análise de diversidade microbiana**

Para a análise de diversidade microbiana associada a *A. mellifera*, foram calculadas curvas de acúmulo de espécies, por meio do número de espécies de leveduras e bactérias (láticas e não- láticas) observadas em todos os substratos. O estimador de riqueza *Chao 2* foi também calculado, a partir de 1000 reamostragens aleatórias das amostras (*bootstrap*). Estas análises foram realizadas no software PAST v.2.12 (Hammer et al., 2001).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da resposta imune de *A. mellifera* frente a micro-organismos

Os ensaios de desafio conduzidos nos Estados Unidos avaliaram dez condições de tratamento. O objetivo destes ensaios, diferente do realizado no Brasil, foi avaliar os níveis de expressão de genes relacionados à imunidade em *Apis mellifera* e o efeito da própolis na expressão destes genes. É importante ressaltar que devido às intensas variações climáticas na área de coleta das abelhas, o efeito sazonal entre inverno e verão também foi avaliado.

No Brasil, os ensaios foram realizados com apenas seis condições, com o objetivo principal de avaliar os níveis de expressão de genes relacionados à imunidade em *Apis mellifera*.

A bioprospecção de componentes da imunidade de *A. mellifera* foi acessada por meio da avaliação de seis genes relacionados à imunidade: quatro genes codificadores para peptídeos antimicrobianos (Hymenoptaecina, Abacina, Apidaecina e Defensina 1), um gene codificador para proteína de reconhecimento celular (AmEater) e um gene codificador para proteína de estocagem (Vitelogenina). Os resultados serão descritos para cada gene a seguir.

#### 5.1.1 Hymenoptaecina

A expressão do peptídeo Hymenoptaecina tem sido vastamente estudada por diversos autores, na avaliação de diferentes desafios e/ou estímulos ao sistema imune das abelhas, tendo mostrado maior consistência e responsividade em relação aos demais genes codificadores de AMPs (Evans, 2006; Simone et al., 2009; Siede et al., 2012; Cornman et al., 2013, Chaimanee et al., 2013).

As estações do ano (inverno e verão) parecem influenciar na expressão do gene *Hym* em abelhas americanas ( $U = 64.808$ ,  $Z = 3.01$ ,  $P = 0.0026$ ). No inverno, a expressão de transcritos de *Hym* não diferiu entre as abelhas das colmeias 226, 40 e 49, que diferiram significativamente das abelhas da colmeia 337, com maior expressão (Figura 13a). Exceto para a colmeia 226, não foi possível observar diferenças significativas na expressão entre os grupos desafiados e o grupo injetado por salina ( $H_{(3, 391)} = 19.15$ ;  $P = 0.0003$ ).

Apenas o grupo desafiado com *C. albicans* e exposto à própolis (Cap) da colmeia 226 apresentou indução significativa da expressão de *Hym*, comparado ao grupo sem exposição à resina (Ca) (Figura 13a). Nas demais condições desafio, não houve diferenças significativas quando os grupos foram expostos à própolis ( $H_{(3, 391)} = 19.15$ ;  $P = 0.0003$ ).

Para todas as colmeias, a expressão de *Hym* no inverno foi maior nos grupos tratados do que nos controles. Os controles expostos à própolis (Cp) (exceto colmeia 40) apresentaram redução significativa na expressão de *Hym*, em comparação aos controles não expostos (C) ( $H_{(3, 391)} = 19.15$ ;  $P = 0.0003$ ), sugerindo que abelhas saudáveis expostas à própolis apresentam diminuição na elicitação da resposta imune, como já relatado por Simone-Finstrom & Spivak (2010) e demonstrado por Siede e colaboradores (2009).

No verão, a expressão de transcritos de *Hym* foi menor para as colmeias 226, 40 e 49, que não diferiram entre si e maior na colmeia 337, quando comparado aos valores observados no inverno ( $H_{(3, 379)} = 70.80$ ;  $P = 0.0001$ ) (Figura 13b). Este resultado indica que as baixas temperaturas representam um estímulo à expressão deste peptídeo.

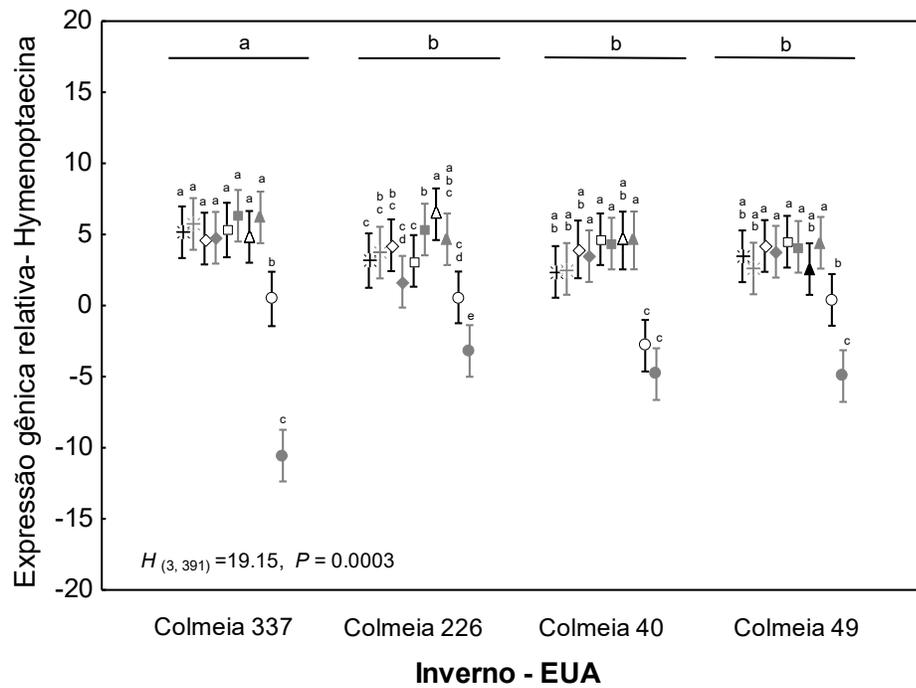
A expressão observada no inverno por abelhas dos grupos-controle expostos à própolis se inverte no verão, quando foi observada indução significativa da expressão de *Hym* ( $H_{(3, 379)} = 70.80$ ;  $P = 0.0001$ ). Novamente, não foram observadas diferenças significativas na expressão entre os grupos desafiados e o grupo injetado por salina no verão, e nem entre os grupos desafiados expostos ou não à própolis ( $H_{(3, 379)} = 70.80$ ;  $P = 0.0001$ ).

Há maior homogeneidade na expressão de *Hym* em abelhas brasileiras, que não apresentaram diferenças significativas na expressão de *Hym* entre as colmeias (Figura 13c).

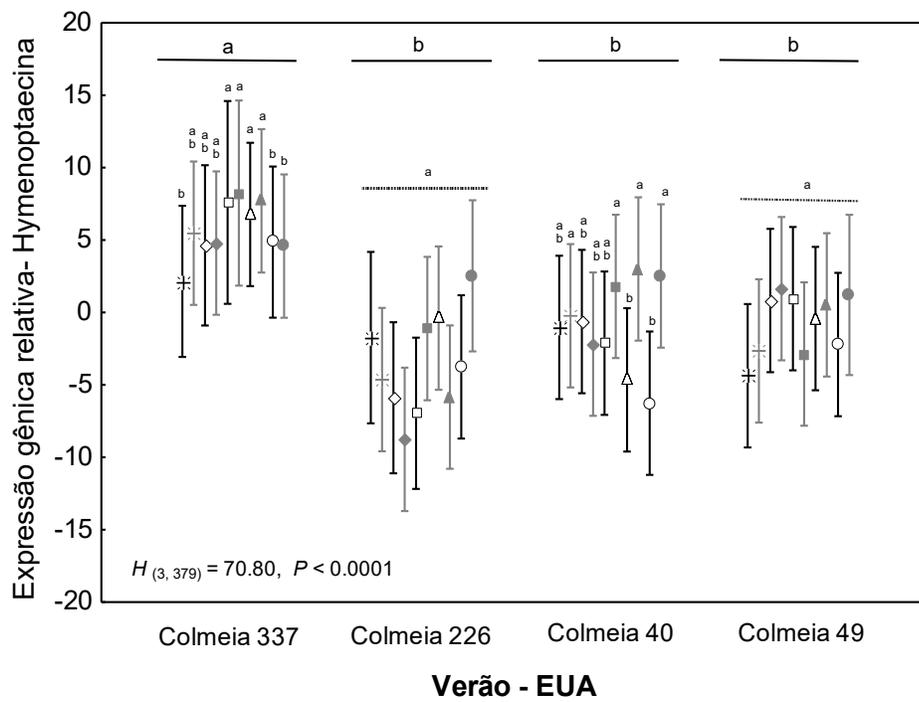
Abelhas das colmeias 01, 02 e 03 não diferiram significativamente quanto à expressão de *Hym* entre grupos desafiados e entre estes e os grupos injetados com salina (Sal), como observado para abelhas americanas nas duas estações ( $H_{(3,238)} = 0.820$ ;  $P < 0.8448$ ). Na colmeia 04 a expressão de transcritos de *Hym* foi significativamente menor para o grupo desafiado com *E. coli* (Ec), em relação aos demais tratamentos ( $H_{(3,238)} = 0.820$ ;  $P < 0.8448$ ).

Simone e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento de colônias de *A. mellifera* com própolis verde (proveniente do Brasil) e própolis produzida em Minnessota, EUA, diminui significativamente os níveis de expressão do gene *Hym*, pois quando presente esta resina diminui a concentração microbiana e, conseqüentemente, o investimento energético das abelhas na expressão deste peptídeo. Os resultados observados para a expressão de *Hym* no inverno corroboram os dados obtidos por estes autores, pois a própolis regulou negativamente a expressão de *Hym* em abelhas dos grupos controle (Cp-sem desafio). No entanto, o aumento na expressão deste AMP em decorrência da exposição à própolis no verão ainda não está claro.

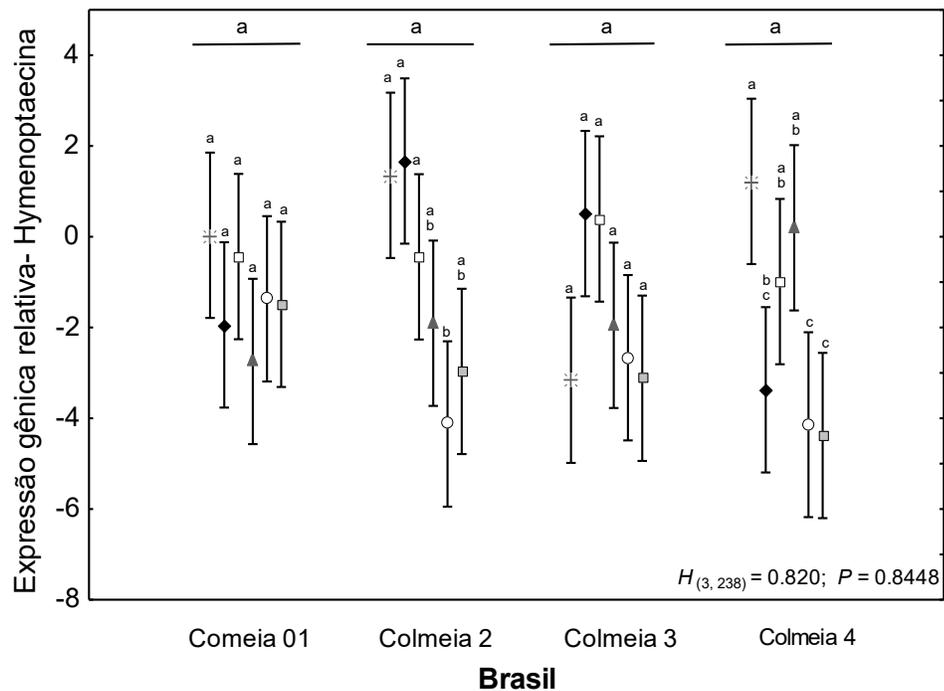
É interessante observar que a exposição de abelhas desafiadas (com soluções microbianas ou salina) à própolis não altera os níveis de expressão de *Hym* (exceto o desafio com *C. albicans* da colmeia 226), contrariamente ao observado para as abelhas dos grupos controle, nas quais a exposição à própolis causa redução significativa da expressão no inverno e aumento igualmente significativo no verão. Este dado indica que o estímulo ocasionado pela própolis é efetivo apenas em abelhas que não foram expostas a patógenos ou condições de injúria.



(a)



(b)



(c)

Figura 13. Expressão relativa do peptídeo antimicrobiano Hymenoptaecina. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colméia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatísticas, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro:  $\pm$  desvio padrão.

### 5.1.2 Abaecina

Assim como Hymenoptaecina, a expressão do peptídeo antimicrobiano Abaecina já foi avaliada em abelhas sob diferentes condições, como após inoculação com o patógeno bacteriano *P. larvae* (Siede et al., 2012; Cornman et al., 2013), patógeno fúngico *Nosema ceranae* (Chaimanee et al., 2013), exposição à pesticidas (Gregorc et al., 2012) e a própolis (Simone et al., 2009).

A expressão do gene codificador para o peptídeo antimicrobiano Abaecina (*Aba*) em abelhas americanas foi mais variável do que o observado para Hymenoptaecina (Figura 12a e b). As estações diferiram significativamente sobre a expressão de *Aba* ( $U = 26,678$ ,  $Z = -14,72$ ,  $P < 0.0001$ ). No inverno, as abelhas das colmeias 337 e 49 não diferiram quanto à expressão de *Aba*, assim como as abelhas das colmeias 226 e 40 ( $H_{(3, 391)} = 19.15$ ;  $P = 0.0003$ ) (Figura 14a).

Não houve diferenças significativas na expressão de *Aba* entre os grupos desafiados e os grupos injetados por salina no inverno. Os grupos controles expostos à própolis (Cp) (exceto colmeia 40) apresentaram redução significativa na expressão de *Aba*, em comparação aos controles não expostos. Também não foram observadas diferenças significativas na expressão *Aba* quando os grupos desafiados foram expostos à própolis, exceto o grupo desafio com *C. albicans* da colmeia 40 ( $H_{(3, 391)} = 19.15$ ;  $P = 0.0003$ ) (Figura 14a).

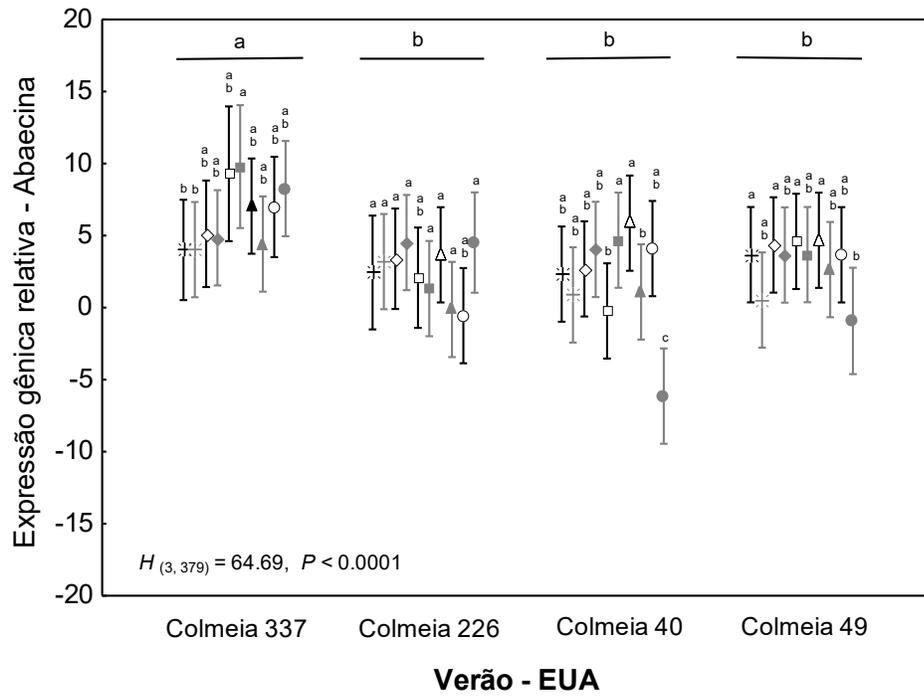
No verão, a expressão de transcritos para *Aba* foi menor, quando comparada aos valores observados no inverno (Figura 14b). As colmeias 226, 40 e 49 apresentam os mesmos níveis de expressão relativa para este gene, menor do que o observado para a colmeia 337 ( $H_{(3, 379)} = 64.69$ ;  $P < 0.0001$ ). Novamente, não há diferenças significativas na expressão de *Aba* entre os grupos desafiados e os grupos injetados com salina no verão. É interessante observar que os controles expostos à própolis (Cp) apresentaram redução significativa na expressão de *Aba* nas colmeias do apiário WT e indução significativa nas colmeias do apiário FDA, em relação aos controles não expostos. Dentre todos os grupos desafiados, apenas o tratamento com *C. albicans*

exposto à própolis da colmeia 226 apresentou indução significativa da expressão de *Aba* ( $H_{(3, 379)} = 64.69$ ;  $P < 0.0001$ ).

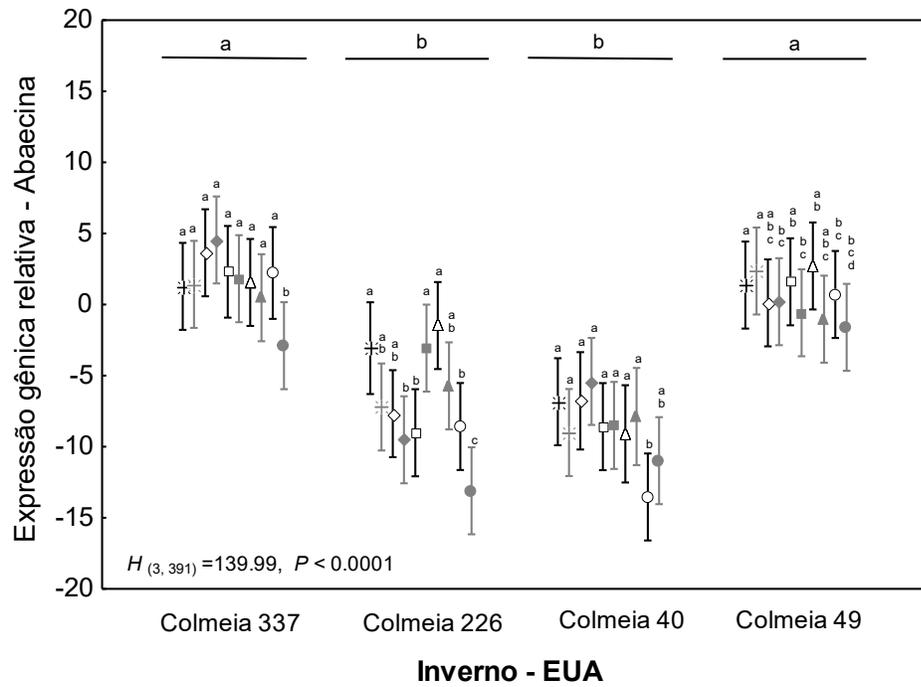
Ao avaliar a expressão de Abaecina no Brasil, nota-se que três das quatro colmeias avaliadas apresentaram perfil de expressão semelhante (Figura 14c). Dentre estas, a expressão de transcritos de *Aba* não diferiu, como também não foi diferente a expressão observada entre tratamentos e controles ( $H_{(3,238)} = 45.60$ ;  $P < 0.0001$ ).

Apenas na colmeia 04, a qual apresentou níveis de expressão significativamente diferente das demais, foi possível observar indução significativa na transcrição de *Aba*, em relação ao controle. É interessante observar que o controle exposto à própolis nesta colmeia não diferiu dos demais tratamentos ( $H_{(3,238)} = 45.60$ ;  $P < 0.0001$ ).

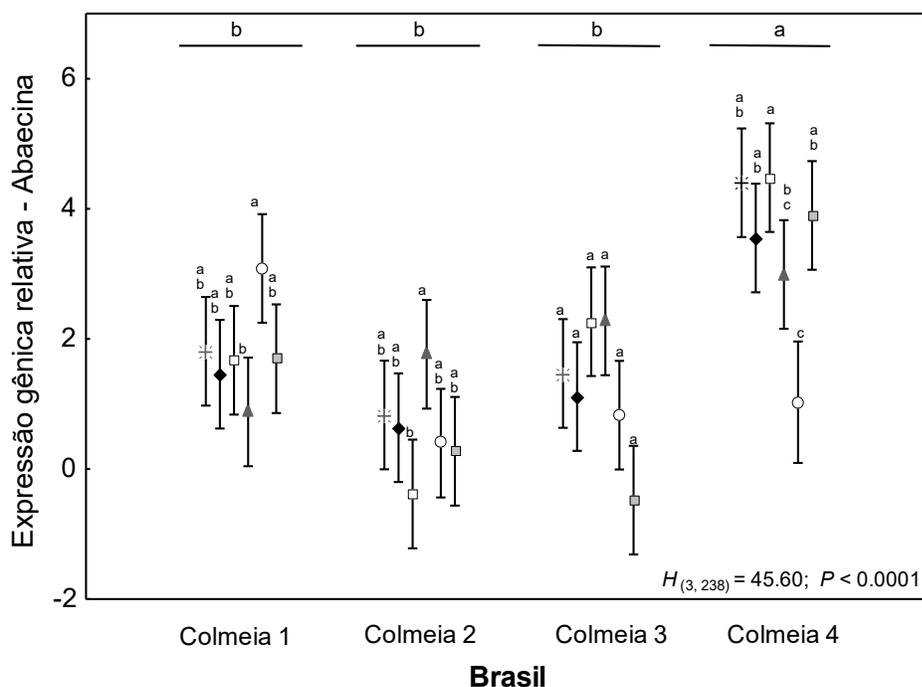
Simone e colaboradores (2009), ao estudar o papel de própolis verde brasileira e americana sob a expressão de diversos genes codificadores de AMP e proteína de reconhecimento celular evidenciou que os níveis de transcritos de *Aba* não foram alterados em decorrência da utilização da resina. No presente trabalho, foi observado que a própolis é capaz de modular a expressão deste AMP: houve redução significativa na expressão de *Aba* em abelhas dos grupos controles no inverno e em metade destas no verão. O efeito indutório da própolis nas demais colmeias avaliadas no verão, assim como na expressão de *Hym*, não está claro.



(a)



(b)



(c)

Figura 14. Expressão relativa do peptídeo antimicrobiano Abaecina. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro:  $\pm$  desvio padrão.

### 5.1.3 Apidaecina

O gene codificador para o peptídeo antimicrobiano Apidaecina (*Api*) também compõe a gama de peptídeos antimicrobianos rotineiramente utilizados na avaliação do sistema imune de *A. mellifera* (Simone et al., 2009; Siede et al., 2012; Chaimanee et al., 2013).

Assim como constatado na expressão dos genes *Hym* e *Aba* em abelhas americanas, as estações diferem significativamente sobre a expressão de *Api*, com claro aumento da expressão deste peptídeo no verão ( $U = 4,918$ ;  $Z = -22.42$ ,  $P < 0.0001$ ).

Na condição inverno, a expressão de transcritos de *Api* não diferiu entre as colmeias (Figura 15a). Também não há diferenças significativas quanto à expressão de *Api* entre tratamentos e os grupos injetados com salina. Nota-se que a exposição de grupos controle à própolis (Cp) diminuiu significativamente os níveis de expressão de *Api* em relação aos controles não expostos nas colmeias 226 e 49, permanecendo estes inalterados nas demais colmeias ( $H_{(3,391)} = 5.50$ ;  $P < 0.139$ ).

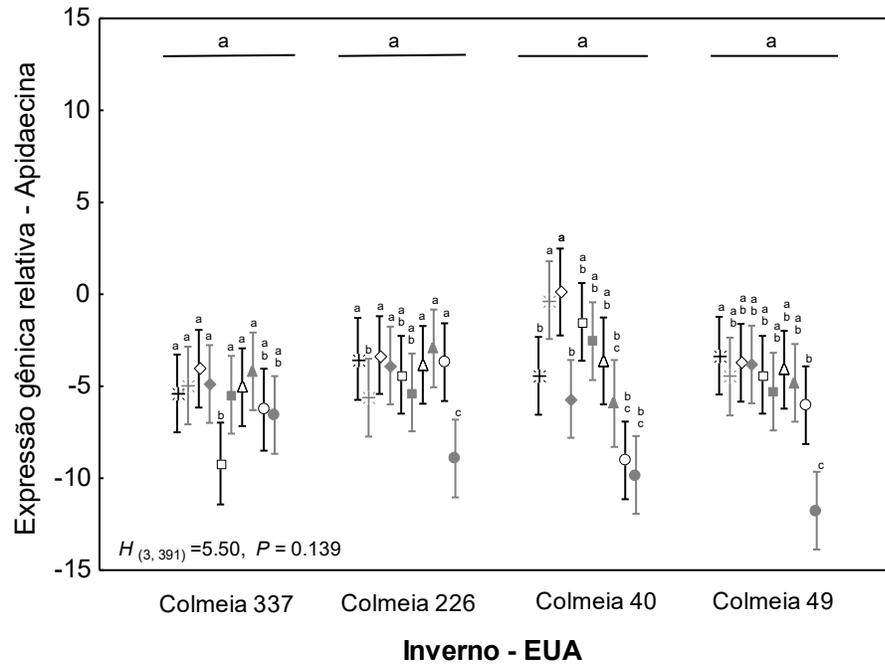
A variação na expressão de *Api* nos grupos desafiados e expostos à própolis no inverno (Figura 15a, Tabela 2) é maior do que o observado para *Hym* e *Aba*: na colmeia 337, o grupo desafiado com *C. albicans* exposto à própolis (Cap) apresentou aumento significativo na expressão de *Api*, semelhante ao observado no grupo desafiado com *E. coli* exposto à própolis (Ecp) da colmeia 40. Já os grupos desafiados com *S. aureus* e expostos à própolis (Sap) das colmeias 226 e 40 apresentaram significativa redução e indução, respectivamente, na expressão deste AMP ( $H_{(3,391)} = 5.50$ ;  $P < 0.139$ ).

No verão (Figura 15b), as colmeias diferiram significativamente quanto a expressão de *Api*, exceto a colmeia 49, que apresentou níveis intermediários de expressão entre a colmeia 337 e 226. Salvo a colmeia 337, os tratamentos não diferiram dos grupos injetados com salina quanto à expressão deste gene. Quando expostas à própolis, as abelhas dos grupos controles (Cp) das colmeias 226, 40 e 49 apresentaram diminuição significativa na expressão de *Api* ( $H_{(3,391)} = 132.59$ ;  $P < 0.0001$ ).

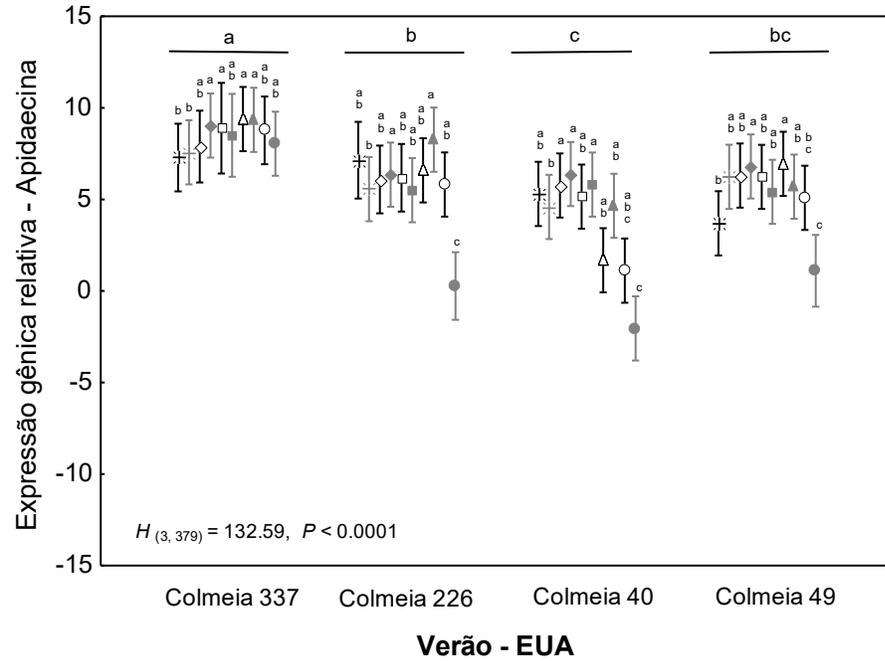
No Brasil, a expressão de *Api* foi significativamente semelhante em três das quatro colmeias avaliadas (Figura 15c). Todas as colmeias apresentaram níveis de expressão de transcritos semelhantes entre tratamentos e grupo injetado com salina, com destaque apenas para o grupo desafiado com *E. coli* na colmeia 03, o qual apresentou aumento significativo na expressão de *Api* ( $H_{(3,238)} = 81.16; P < 0.0001$ ).

Alguns autores têm demonstrado que a expressão de Apidaecina é menor, quando comparada aos demais genes em situações de desafio. Siede e colaboradores (2012) avaliaram a expressão de peptídeos em abelhas inoculadas com LPS, ácido lipoteicóico, peptidoglicano, suspensão do patógeno *P. larvae* e do vírus da paralisia em abelhas (*Bee Paralysis Virus* –ABPV) e constataram que, dentre todos os genes para AMPs avaliados, Apidaecina foi o que sofreu menor alteração na expressão em decorrência dos estímulos.

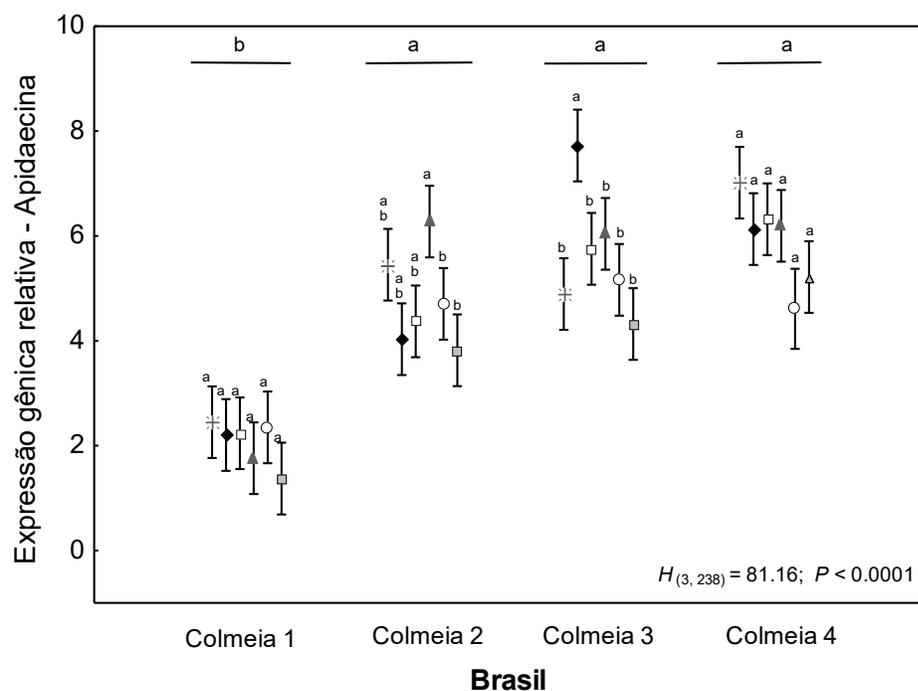
A expressão de Apidaecina manteve-se inalterada quando abelhas foram expostas a própolis verde e própolis de Minnesota, EUA (Simone et al., 2009). No presente trabalho, a exposição de grupos controle à própolis verde reduziu significativamente os níveis de expressão de *Api* em metade das colmeias no inverno e em três colmeias no verão, apresentando também a maior variação entre os grupos desafiados com micro-organismos e expostos à própolis dentre todos os AMPs avaliados (Tabela 2).



(a)



(b)



(c)

Figura 15. Expressão relativa do peptídeo antimicrobiano Apidaecina. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro:  $\pm$  desvio padrão.

#### 5.1.4 Defensina 1

O gene *Defl* codifica o peptídeo Defensina 1, um dos principais componente do sistema imune de abelhas, e tem demonstrado indução frente a vários estímulos (Siede et al., 2012; Cornman et al., 2013).

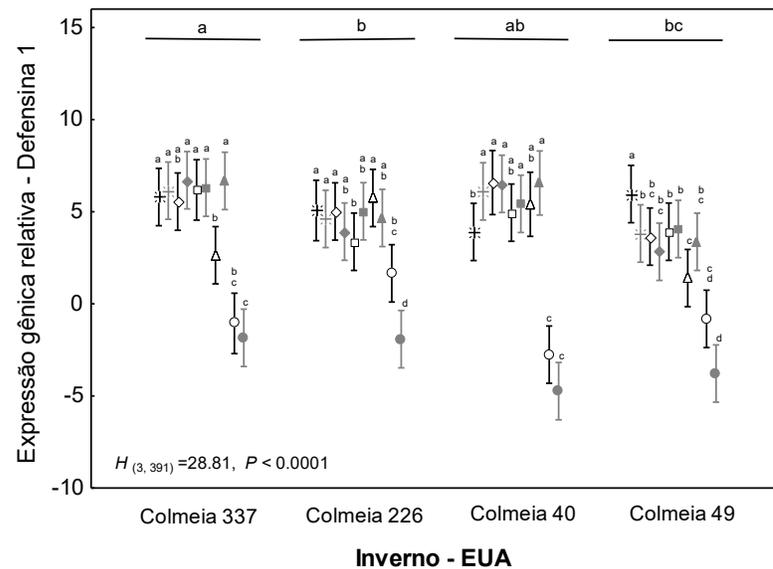
As estações também influenciaram na expressão de *Defl* em abelhas americanas ( $U = 69,433$ ,  $Z = -1,51$ ,  $P < 0.1309$ ). No inverno a expressão de transcritos para *Defl* foi significativamente maior nos grupos tratados do que nos controles, indicando indução da transcrição deste peptídeo em decorrência dos estímulos. Há diferenças significativas na expressão de *Defl* entre as colmeias no inverno, ao passo que no verão três das quatro colmeias não apresentaram diferenças significativas (Fig 16a e b).

Em geral, a expressão de transcritos de *Defl* não diferiu entre tratamentos e os grupos injetados com salina no inverno, exceto nos casos relatados na tabela 2. Apenas na colmeia 226, a exposição do grupo controle à própolis (Cp) reduziu significativamente a expressão de *Defl* ( $H_{(3,391)} = 28.81$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figura 13a). É interessante observar que no verão houve aumento da expressão de *Defl* nos grupos controles expostos à própolis (Cp), sendo este significativo nas colmeias do apiário WT (40 e 49). Não houve diferenças significativas entre a expressão de transcritos para *Defl* entre os grupos desafiados e o grupo injetado por salina ( $H_{(3,379)} = 113.60$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figura 16b).

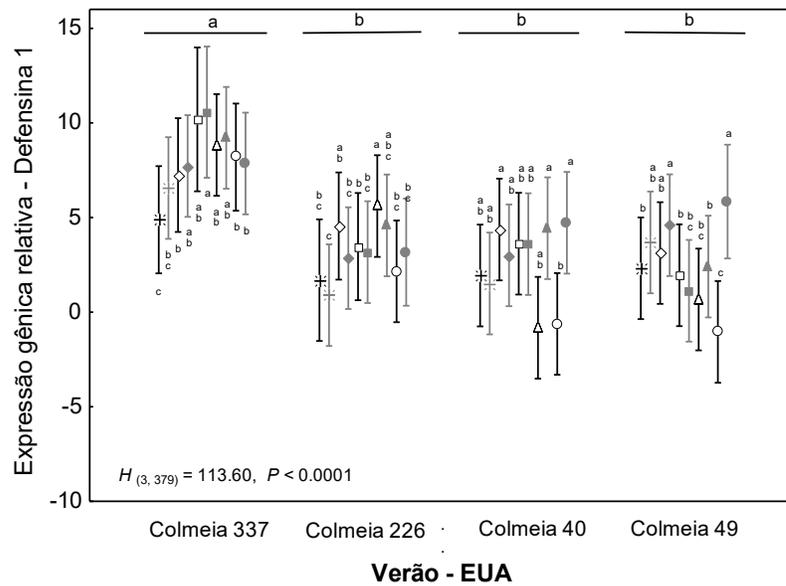
Não foi possível observar diferenças significativas na expressão de *Defl* entre as abelhas desafiadas das colmeias brasileiras, como também não houve diferenças significativas na expressão de *Defl* entre os grupos desafiados e grupos injetados com salina (Sal) (Figura 16c). Nas colmeias 01 e 03, os grupos tratados não diferiram dos grupos controles. Na colmeia 02 os tratamentos com micro-organismos, salina e a exposição à própolis do grupo controle (Cp) induziram a produção de *Defl* de maneira semelhante e significativamente maior do que o controle não exposto à própolis. Na colmeia 04, o desafio com *S. aureus* apresentou o mesmo

efeito indutório do tratamento com salina, e este não diferiu dos demais tratamentos e controles ( $H_{(3,238)} = 13.79; P < 0.2856$ ).

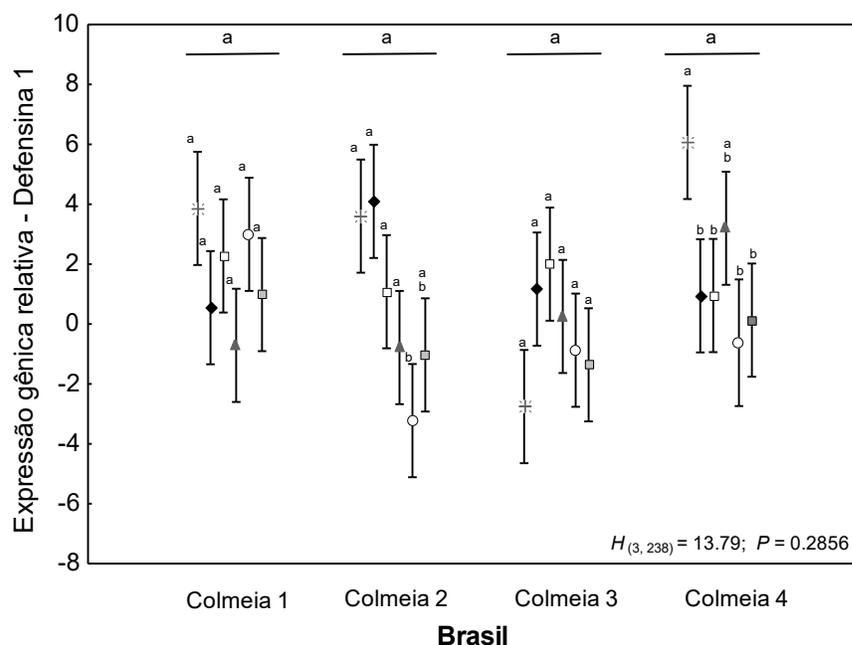
Foi demonstrado por Siede e colaboradores (2009) que a expressão de *Def1*, assim como a expressão de *Aba* e *Api*, manteve-se inalterada quando abelhas foram expostas a própolis, o que contraria os resultados deste trabalho, onde foi observada a modulação da expressão de *Def1* em decorrência da exposição à própolis verde.



(a)



(b)



(c)

Figura 16. Expressão relativa do peptídeo antimicrobiano Defensina 1. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatísticas, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro:  $\pm$  desvio padrão.

### 5.1.5 AmEater

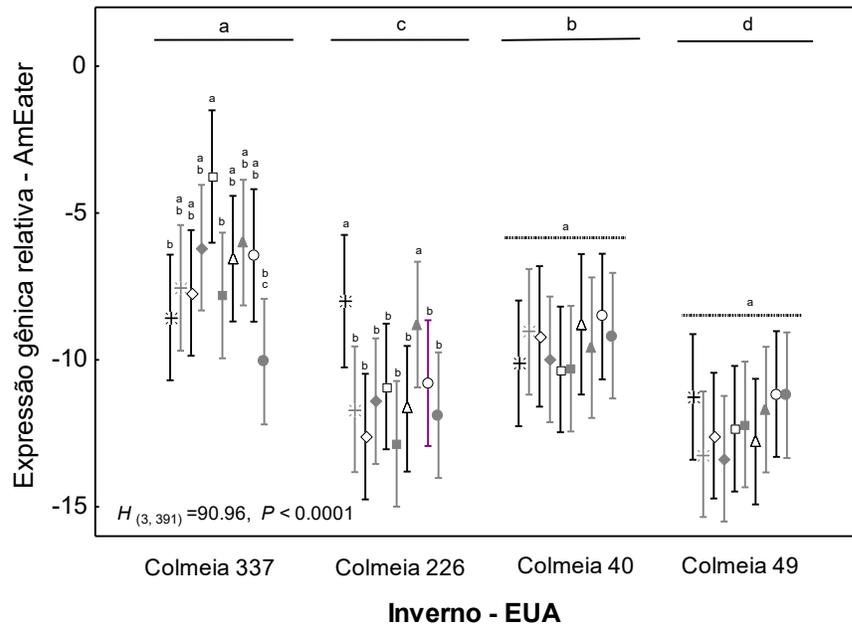
Além dos peptídeos antimicrobianos, foi avaliada a expressão de outros genes relacionados à imunidade, como a proteína de reconhecimento celular AmEater. As estações diferem sobre a expressão relativa desta proteína em abelhas americanas ( $U= 54.965$ ;  $Z = -6.20$ ;  $P < 0.0001$ ).

No inverno, as colmeias foram significativamente diferentes quanto a expressão de transcritos para AmEater. Em geral, os desafios microbianos não diferiram do tratamento com salina e controles. Algumas alterações pontuais foram observadas em grupos desafiados e expostos a própolis (Tabela 2). Os grupos controle expostos a própolis (Cp) não apresentaram diminuição significativa na expressão de AmEater em relação aos grupos não expostos ( $H_{(3,391)} = 90.96$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figura 17a).

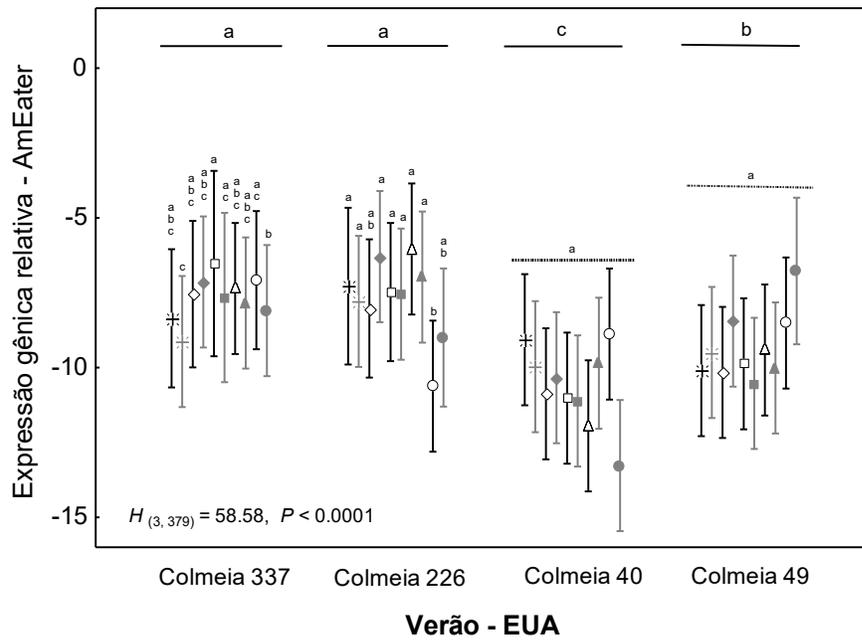
No verão, assim como no inverno, os desafios microbianos não diferiram da injeção com salina na expressão de transcritos para AmEater. Os controles expostos à própolis também não diferiram daqueles não expostos, exceto para a colmeia 337 ( $H_{(3,379)} = 58.58$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figura 17b).

Em abelhas brasileiras, a expressão de AmEater foi semelhante às americanas. O grupo controle exposto à própolis apresentou níveis reduzidos de transcritos para AmEater apenas na colmeia 01. A expressão de grupos controle não diferiu daquela dos grupos desafiados ( $H_{(3,238)} = 104.63$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figura 17c).

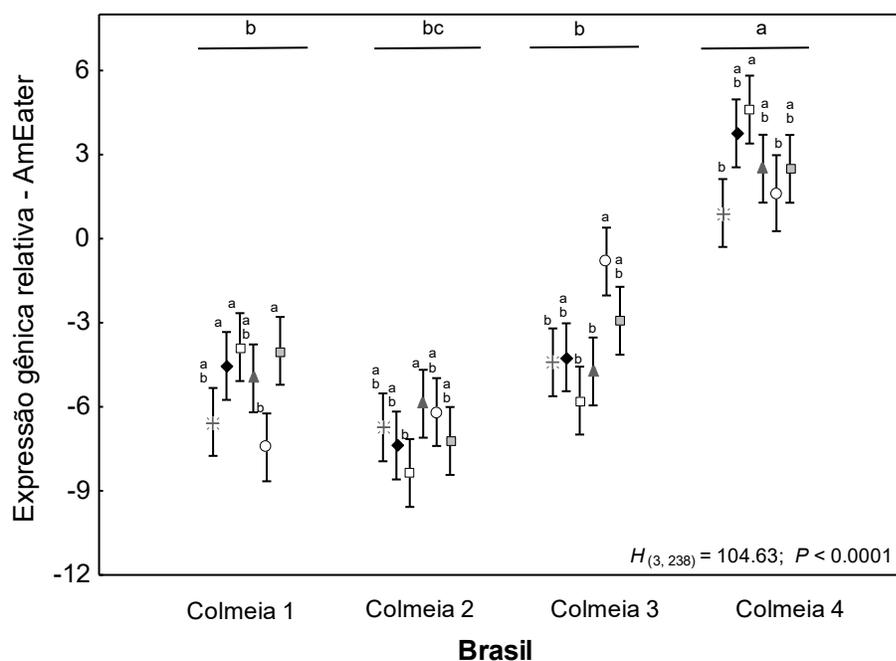
Em estudo anterior, Simone e colaboradores (2009) observaram que a proteína de reconhecimento celular em *A. mellifera* AmEater teve sua síntese reduzida quando as abelhas foram expostas a própolis, como observado para *Hym*. No presente trabalho, no entanto, a carga microbiana ou o período de estimulação da resposta imune após inoculação (10 horas) não foram suficientes para a redução nos níveis de transcritos deste gene.



(a)



(b)



(c)

Figura 17. Expressão relativa da proteína de reconhecimento celular AmEater. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatística, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro: +/- desvio padrão.

### 5.1.6 Vitelogenina

Vitelogenina (Vg) é a principal proteína de estocagem em *A. mellifera* e seus níveis estão intimamente relacionados à dieta e às concentrações de Hormônio Juvenil, com reflexos na condição imune das abelhas (Munch & Amdam, 2010). Observa-se diferenças significativas nos níveis de expressão de Vg entre as estações ( $U = 64.832$ ,  $Z = -3.00$ ,  $P < 0.0027$ ). A produção desta proteína de estocagem foi semelhante em duas das quatro colmeias americanas avaliadas no inverno (Figura 18a). As colmeias não diferiram quanto a expressão de Vg entre desafios microbianos e injeção com salina, exceto a colmeia 226, como já demonstrado para os demais genes avaliados. A exposição dos controles à própolis não alterou os níveis de expressão de Vg ( $H_{(3.391)} = 112.14$ ;  $P < 0.0001$ ).

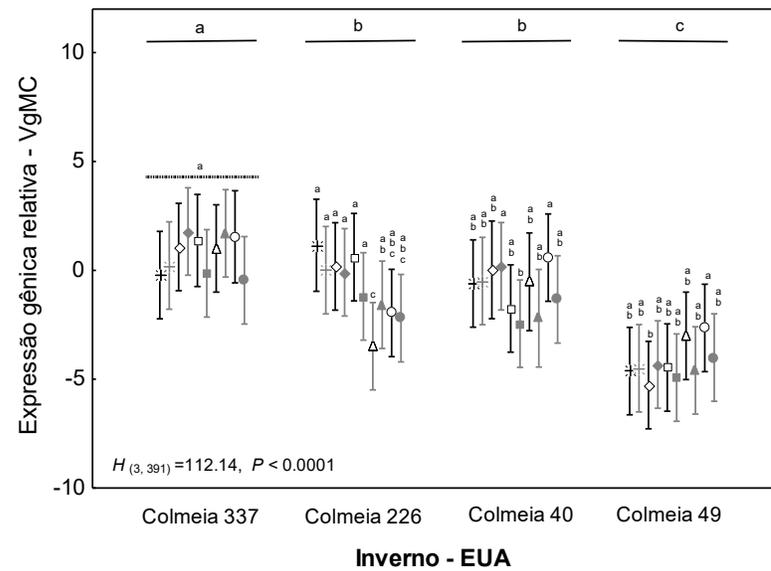
No verão, as colmeias do apiário FDA (226 e 337) e 49 não diferiram quanto à expressão de Vg (Figura 18b). Também não houve diferença entre a expressão de Vg observada nos grupos desafiados e tratamento com salina. Interessantemente, três colmeias apresentaram níveis de expressão significativamente superiores nos grupos controles expostos à própolis (Cp) em relação aos controles não expostos (C) ( $H_{(3.379)} = 53.23$ ;  $P < 0.0001$ ).

A expressão da proteína de Vg foi menos variável do que AmEater em abelhas brasileiras (Figura 18c). A colmeia 01 apresentou níveis de expressão significativamente diferentes e menores do que as demais colmeias, que não diferiram entre si. Nas colmeias 01 e 03, a expressão de Vg se manteve inalterada entre os grupos desafios, tratamento com salina e controles ( $H_{(3.238)} = 43.59$ ;  $P < 0.0001$ ).

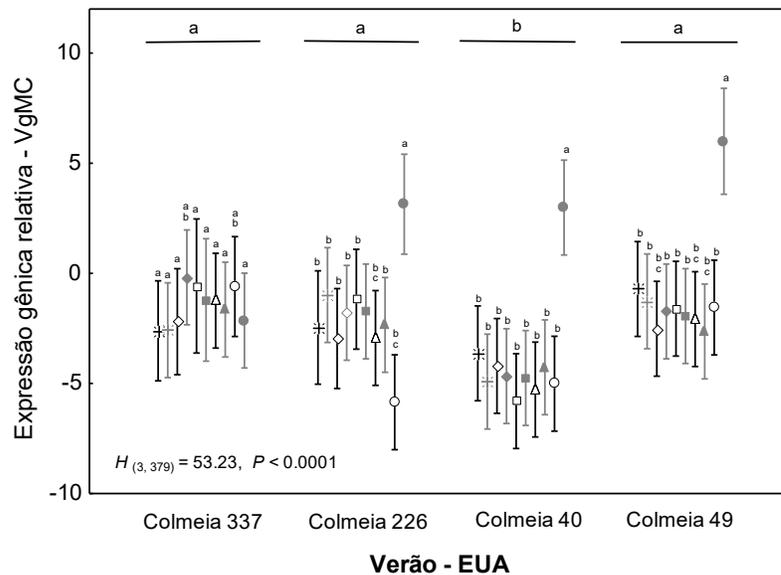
Na colmeia 02, os desafios microbianos e a exposição à própolis apresentaram os mesmos níveis de expressão relativa de Vg, ao passo que o tratamento com salina e controle sem exposição à própolis (C) mantiveram níveis significativamente maiores de expressão, demonstrando que o sistema imune de abelhas direciona seus recursos energéticos quando estimulado por micro-organismos. Já na colmeia 04, os desafios com *S. aureus* e *C. albicans*

diferiram significativamente quanto aos níveis de expressão de *Vg*, mas o tratamento com salina não diferiu dos desafios microbianos.

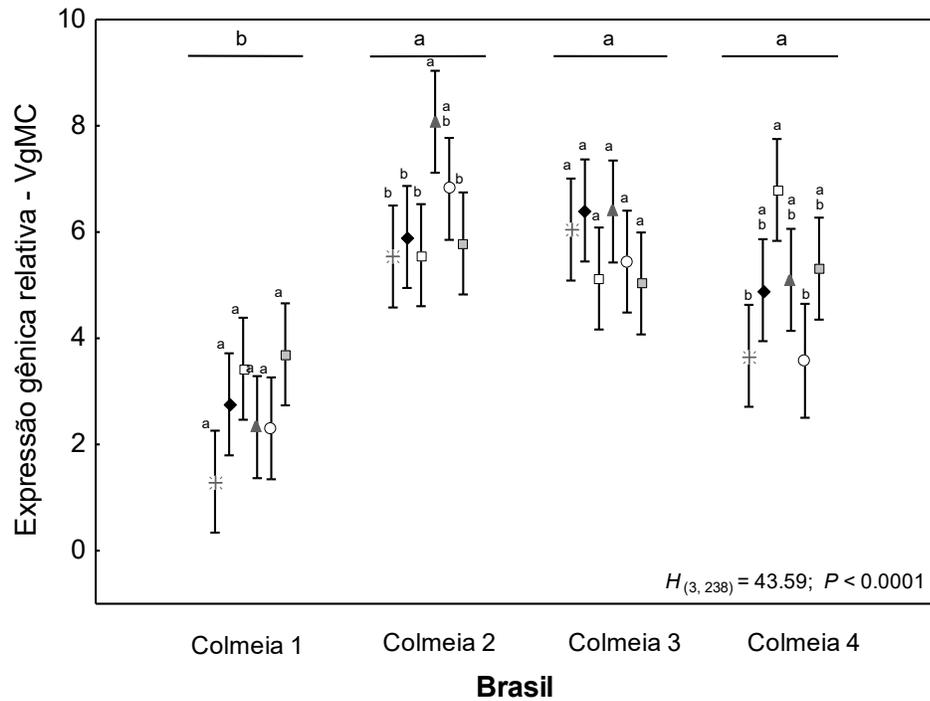
Simone et al. (2009) não observaram alterações nos níveis de Vitelogenina em decorrência da exposição à própolis em *A. mellifera*, assim como o observado para os genes *Aba*, *Api* e *Defl*. No entanto, no presente trabalho, a própolis foi capaz de induzir a síntese desta nos grupos controles no verão.



(a)



(b)



(c)

Figura 18. Expressão relativa da proteína de estocagem Vitelogenina. Eixo y representa a expressão em (a) abelhas americanas no inverno, (b) abelhas americanas no verão e (c) abelhas brasileiras. O eixo x representa as colmeias. Em (a) e (b) os pares de tratamento estão assim ordenados dentro de cada colmeia: Sa (grupo inoculado por *S. aureus*), Sap (grupo inoculado por *S. aureus* e exposto à própolis), Ec (grupo inoculado por *E. coli*), Ecp (grupo inoculado com *E. coli* e exposto à própolis), Ca (grupo inoculado por *C. albicans*), Cap (grupo inoculado por *C. albicans* e exposto à própolis), Sal (grupo inoculado por salina), Salp (grupo inoculado por salina e exposto à própolis), C (grupo controle) e Cp (grupo controle exposto à própolis). Em (c) os tratamentos estão assim ordenados: Sa, Ec, Ca, Sal, C e Cp. Barras superiores e letras iguais indicam colmeias que não apresentaram diferença estatística significativa, a partir do teste de Kruskal-Wallis  $H$  ( $p < 0,05$ ). Dentro de cada colmeia, as letras sobre os tratamentos indicam diferenças estatísticas, a partir do teste de Mann-Whitney  $U$  ( $P < 0,05$ ). Barras representam erro: + - desvio padrão.

Os resultados observados na avaliação da expressão de peptídeos antimicrobianos (Hymenoptaecina, Abaecina, Apidaecina e Defensina 1), AmEater e Vitelogenina por abelhas *A. mellifera* indicam que os estímulos (desafios microbianos e injeção de solução salina) foram capazes de induzir uma resposta imunológica efetiva, provavelmente pela estimulação das vias gênicas Toll e Imd (Siede et al., 2012), embora componentes específicos das vias não tenham sido avaliados. O período após estimulação (10 horas) foi suficiente para a detecção de níveis mensuráveis de RNA mensageiro, codificadores destes peptídeos. Siede e colaboradores (2012) avaliaram a resposta imunológica de *A. mellifera* após desafio e também observaram regulação positiva da resposta imune após 10 horas.

Nos experimentos conduzidos nos Estados Unidos, onde foi possível avaliar a expressão gênica em duas condições distintas de temperatura (inverno e verão), foi observado que a expressão de AMPs apresenta um padrão similar: há diferenças significativas na expressão de abelhas da mesma colmeia desafiadas no inverno e verão, sendo que a expressão no verão é normalmente superior. Observa-se também que há maior variação na expressão de AMPs entre as colmeias do que entre os tratamentos (Fig 13, 14, 15 e 16;  $P < 0.05$ ).

Tanto nos ensaios conduzidos no Brasil como nos Estados Unidos, a expressão de transcritos de AMPs foi regulada positivamente. Embora haja tratamentos pontuais para os quais o perfil de expressão é divergente (Tabela 2), em geral, as abelhas desafiadas com suspensões de micro-organismos não apresentaram maior expressão de AMPs do que aquelas inoculadas com salina, como já demonstrado em estudos anteriores (Casteels et al., 1993; Lourenço, 2007; Simone et al., 2009; Siede et al., 2012). Tanto os desafios quanto a injeção com salina induziram à uma resposta imune significativa, porém não específica.

A própolis verde parece ter um papel modulador da resposta imune, evidente em abelhas americanas. Na condição inverno, a exposição de abelhas controle (não inoculadas com micro-organismos ou salina) à resina por um período de 10 horas foi capaz de reduzir a expressão de *Hym* em todas as colmeias, de *Aba* em três das quatro colmeias e de *Api* e *Def1* em metade das colmeias, em relação aos grupos controle não expostos à própolis.

É sabido que a própolis, especialmente a variedade verde produzida em Minas Gerais, apresenta propriedades antimicrobianas, inclusive frente a patógenos apícolas (Santos et al., 2003, Evans & Armstrong, 2005; Bastos et al., 2008; Bankova et al., 2014). A atividade biológica da própolis verde é atribuída à composição química, resultado de sua origem botânica (*Baccharis dracunculifolia*) e demais características locais, como solo e condições climáticas, o que torna este produto único (Bastos et al., 2011).

A redução na expressão de genes relacionados à imunidade em *A. mellifera*, como resposta a exposição à própolis verde, foi demonstrada por Simone e colaboradores (2009). Os autores atribuíram a redução na expressão de *Hym* e *AmEater* como consequência da redução da carga microbiana global da colmeia, ocasionada pela própolis. Com menor pressão microbiana, o sistema imune das abelhas apresentou diminuição da síntese destes genes, evidenciando que a própolis é capaz de modular a resposta imune em *A. mellifera*, assim como observado no presente trabalho, principalmente na avaliação da expressão de AMPs durante o inverno. No entanto, não foi observado alterações na expressão de *AmEater* em decorrência da própolis.

Ação semelhante de utilização de resinas na defesa do ninho já foi demonstrada em formigas da madeira, *Formica paralugubris*. Esta espécie coleta pedaços solidificados de resina de coníferas e incorpora em seus ninhos. Assim como o observado em *A. mellifera*, a presença da resina reduz a densidade de bactérias e fungos e inibe o crescimento de potenciais patógenos, o que reduz por consequência a ativação das defesas imunes de operárias desta espécie (Castella et al., 2008).

A coleta de resina para a produção de própolis pode ser aumentada após desafio com patógenos específicos. Simone-Finstrom & Spivak (2012) inocularam *Ascospaera apis* em colmeias experimentais de *A. mellifera* e observaram um aumento no número de forrageiras responsáveis pela coleta de resina, classificando este comportamento como “automedicação” em abelhas.

A coleta e utilização da própolis pelas abelhas é um exemplo de imunidade social, termo cunhado originalmente por Cremer e colaboradores (2007) e que tem recebido atenção pela comunidade científica desde então (Castella et al., 2008; Simone et al., 2009; Cotter & Kilner,

2010; Evans & Spivak, 2010; Simone-Finstrom & Spivak, 2010; Simone-Finstrom & Spivak, 2012). Os mecanismos utilizados coletivamente pelas abelhas para defesa da colmeia culminam em redução da imunidade individual. Evans e colaboradores (2006) constataram que em *A. mellifera*, o número de genes relacionados à função imune é um terço do observado em *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*, atribuindo essa redução também à força do comportamento social.

Interessantemente, na condição verão, os níveis de expressão de AMPs, AmEater e Vitelogenina aumentaram significativamente nos grupos controle expostos a própolis. Todas as colmeias apresentaram aumento na expressão de *Hym*, três colmeias apresentaram aumento na expressão de Vg e metade apresentou também aumento na expressão de *Aba*, *Defl* e AmEater. Apenas a expressão relativa de *Api* foi regulada negativamente no verão em três colmeias, como o observado na condição inverno para todos os genes.

Alguns grupos desafiados e expostos a própolis apresentaram alteração significativa na expressão de AMPs e demais proteínas avaliadas, em relação ao par de tratamento não exposto a própolis (Tabela 2). No entanto, estas alterações nos grupos desafiados foram pontuais, apenas na condição inverno, e não caracterizam o mesmo efeito observado nos grupos controle, o que sugere que a ação da própolis é mais evidente em abelhas não expostas à patógenos.

No Brasil, a exposição de abelhas controle à própolis não alterou significativamente a expressão de AMPs nos grupos controles, salvo divergências pontuais observadas (expressão de *Hym* pela colmeia 02, expressão de *Aba* nas colmeias 01 e 04 e *Defl* na colmeia 02). A expressão de AmEater foi induzida apenas na colmeia 01 e a expressão de Vitelogenina não sofreu alterações significativas em decorrência da exposição à própolis. Isto pode ser devido a dois fatores: (1) não foi realizada avaliação par a par de cada tratamento, em relação à exposição à própolis, como o experimento conduzido nos Estados Unidos (devido ao número reduzido de abelhas disponíveis para ensaio) e (2) abelhas *A. mellifera* brasileiras já são naturalmente expostas à própolis verde, como componente da colmeia, diferente do que ocorre com abelhas americanas, para as quais a exposição à este tipo de própolis é um estímulo novo e ainda não reconhecido pelas abelhas.

Tabela 2. Ação da própolis sobre os níveis de expressão de transcritos em relação aos pares de tratamentos não expostos à própolis.

Gene	Estação	Colmeia/Tratamento	Alteração na expressão com o emprego da própolis	Demonstração no texto
<i>Hym</i>	Inverno	226/Cap	indução	Fig 13a
<i>Aba</i>	Inverno	226/Cap	indução	Fig 14a
<i>Api</i>	Inverno	337/Cap	indução	Fig 15a
		226/Sap	redução	
		40/Sap	indução	
		40/Ecp	redução	
<i>Defl</i>	Inverno	337/Salp	indução	Fig 16a
		40/Sap	indução	
		49/Sap	redução	
AmEater	Inverno	3377Cap	redução	Fig 17a
		226/Sap	redução	
Vitlogenina	Inverno	226/Salp	indução	Fig 18a
		226/Salp	indução	

Legenda. Cap: tratamento com *C. albicans* e exposição à própolis; Ecp: tratamento com *E. coli* e exposição à própolis; Sap: tratamento com *S.aureus* e exposição à própolis; Salp: tratamento com salina e exposição à própolis.

## 5.2 Micro-organismos associados à *Apis mellifera*

### 5.2.1 Leveduras

Foram obtidos 214 isolados de leveduras, 131 no Brasil e 83 nos Estados Unidos, representando a soma de todas as coletas nos dois ambientes. Ao final do processo de isolamento, foram identificados 45 táxons, pertencentes a 19 gêneros. Todos os táxons foram identificados em nível de espécie, pois apresentaram de 99 a 100% de similaridade de sequência dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA com aquelas depositadas em Coleções de Cultura ou provenientes de publicações em revista indexada. Apenas um táxon, com oito isolados, não apresentou identidade com sequências já depositadas e, portanto, não foi identificado a nível específico, podendo representar uma espécie ainda não descrita. Dois táxons foram identificados como fungos leveduriformes e foram incluídos nas análises deste estudo.

No Brasil, o substrato para o qual foi observada maior riqueza de espécies de leveduras foi os resíduo das colmeias, com 16 espécies identificadas, seguido de pólen corbicular, pão de abelhas, superfície corpórea de abelhas forrageiras e superfície corpórea de abelhas nutrizas. Não foram observadas leveduras nas amostras de conteúdo intestinais avaliadas (Tabela 3).

Nos Estados Unidos, o substrato com maior riqueza de espécies foi a superfície corpórea de abelhas forrageiras, com 15 espécies, seguido de pólen corbicular e resíduos das colmeias (que apresentaram a mesma riqueza de espécies), pão de abelhas, superfície corpórea de abelhas nutrizas e conteúdo intestinal (Tabela 3).

Tabela 3. Riqueza de espécies de leveduras nos diferentes substratos de isolamento associados à *Apis mellifera*.

Local	Substratos de isolamento					
	Pólen	Alimento	Abelhas nutrizes	Abelhas Forrageiras	Resíduos	Conteúdo Intestinal
Brasil						
Riqueza (S)	10	9	1	3	16	-
Número de isolados	25	15	16	21	54	-
Estados Unidos						
Riqueza (S)	8	7	4	15	8	2
Número de isolados	17	9	6	28	22	2

Todas as espécies de leveduras isoladas e suas respectivas abundâncias estão mostradas na tabela 4. Do total de 17 espécies associadas à superfície corpórea de abelhas forrageiras, oito foram observadas também em outros substratos. Na superfície corpórea das abelhas nutrizes apenas quatro espécies foram observadas, sendo três comuns à superfície de forrageiras. A menor riqueza de espécies observada na superfície de abelhas nutrizes reflete o comportamento de limpeza (*grooming*) a que estas abelhas estão expostas ao exercerem funções dentro da colmeia (Boecking & Spivak, 1999). Morais e colaboradores (2006) citam que, como organismos imóveis, as leveduras dependem de um vetor para disseminá-las no ambiente, principalmente insetos. Dessa forma, as superfícies das abelhas atuam como substratos carreadores de leveduras.

Pólen corbicular e pão de abelha são dois substratos altamente relacionados, embora bioquimicamente distintos (Gilliam, 1979a). De fato, a microbiota associada a estes dois substratos é também distinta: do total de espécies de leveduras observadas no pólen e pão de abelhas, apenas quatro foram comuns a ambos no Brasil e três nos Estados Unidos. Seis espécies

observadas em abelhas forrageiras foram comuns ao pólen corbicular e cinco espécies foram comuns também ao pão de abelhas (Tabela 4).

O substrato denominado de resíduos da colméia foi o que apresentou maior riqueza de espécies de leveduras no Brasil e o segundo em riqueza nos Estados Unidos, juntamente com o pólen corbicular. Foi também o substrato onde fora observado o maior número de isolados nos dois ambientes (Tabela 3). De acordo com Forsgren & Laugen (2014) a análise dos resíduos depositados no fundo de uma colônia de abelhas reflete um histórico acumulado de micro-organismos que estiveram presentes na colônia durante longos períodos. Assim, não é surpreendente que das 21 espécies observadas neste substrato, onze tenham sido observadas exclusivamente nos resíduos das colmeias avaliadas.

Apenas seis do total de espécies descritas em associação com *A. mellifera* foram comuns a ambos os ambientes, em sua maioria espécies generalistas: *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida parapsilosis*, *Meyerozyma caribbica*, *Cryptococcus victoriae* e *Occultifur aff. externus*.

Além de comum a ambos os ambientes, *Aureobasidium pullulans* (fungo leveduriforme) foi o mais prevalente e representou 24,3% do total de isolados, observado em todos os substratos avaliados, exceto pão de abelhas no Brasil e conteúdo intestinal. A representatividade dessa espécie atingiu seu ápice na superfície corpórea de abelhas nutrizas e forrageiras (Tabela 4). Como generalista, *A. pullulans* já foi observada em diversos substratos, incluindo aqueles relacionados às abelhas, como flores (Lachance et al., 2001b), pólen corbicular e pão de abelha de *A. mellifera* (Gilliam et al., 1989). Acredita-se que as abelhas entram em contato com flores ou partes vegetais que podem abrigar esta espécie e a carregam para as colmeias. É interessante observar que a presença de *A. pullulans* não é expressiva no pólen corbicular (Tabela 4), indicando que a inoculação provavelmente é via superfície corpórea das abelhas.

O gênero *Rhodotorula* correspondeu a 15,4% dos isolados, e a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* representou 10,7%, sendo a segunda espécie mais prevalente, também comum aos dois ambientes. No presente estudo, esta levedura foi observada a partir de abelhas forrageiras, pão de abelhas, pólen corbicular e resíduos da colmeia. Segundo Sampaio (2011a; 2011b), *R.*

*mucilaginosa* é uma levedura basidiomicética ubíqua e tem sido observada em vários habitats naturais: lagos oligotróficos da Patagonia (Brandão et al., 2011), flores, insetos e material vegetal em decomposição (Barriga et al., 2014), nectários de diversas espécies (Pozo et al., 2011), pólen floral (Gilliam, 1979a) e associada a outras espécies de abelhas (Rosa et al., 2003; Calaça, 2011). Por se tratar de uma espécie ubíqua, a presença em substratos associados a abelhas sugere que estes insetos atuem como vetores disseminadores da levedura no ambiente.

O gênero *Candida*, táxon altamente polifilético e que aloca leveduras para as quais a fase teleomórfica ainda não foi descrita ou observada (Lachance et al., 2011b) representou 18,2% do total de isolados. No Brasil, este gênero foi representado pelas espécies *C. hawaiiiana*, *C. orthopsilosis* e *C. sorbosivorans* e nos Estados Unidos pelas espécies *C. magnoliae* e *C. oleophila*, sendo *C. parapsilosis* observada nos dois ambientes. A espécie *C. orthopsilosis* foi a mais prevalente do gênero, representando 13% do total de isolados, observada no pão de abelhas, superfície corpórea de abelhas forrageiras e principalmente nos resíduos da colmeia. *Candida oleophila*, observada nas forrageiras, foi descrita em associação com plantas visitadas por *Drosophila* e foi proposta uma relação mutualística entre este inseto e as plantas por ele visitadas (Lachance et al. 2011a), já *C. hawaiiiana*, isolada de pão de abelha, foi descrita em associação à insetos nectívoros, visitantes da flor de *Ipomea indica*.

As espécies *C. sorbosivorans* e *C. magnoliae* fazem parte do clado *Starmerella*. *C. sorbosivorans* foi isolada de dejetos da colmeia, pão de abelha e pólen, e já foi descrita em associação a polpas de frutas tropicais brasileiras (Trindade et al., 2002). A espécie *C. magnoliae* foi isolada de pão de abelha e resíduos. Como observado por Gilliam (1979a), em estudo de leveduras associadas ao pólen e pão de abelhas, a presença desta levedura no pólen corbicular e alimento e ausência no pólen floral indica que *C. magnoliae* tenha sido introduzida aos demais substratos pelas abelhas.

Um total de oito espécies do gênero *Cryptococcus* foi observado neste trabalho (Tabela 4), correspondendo a 6,5% do total de isolados. Assim como o gênero *Candida*, o gênero *Cryptococcus* tem origem polifilética, abrigando espécies com características muito distintas. No Brasil, *Cr. aldbosimilis*, *Cr. laurentii*, *Cr. victoriae* e *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans*

foram isoladas apenas do pólen corbicular, enquanto nos Estados Unidos as espécies *Cr. amyloletus*, *Cr. flavus*, *Cr. saltoi* e *Cr. victoriae* foram isoladas de diversos substratos. Estas espécies já foram observadas no filoplano (Fonseca & Inacio, 2006), indivíduos adultos da abelha *Melipona quadrifasciata* (Rosa et al., 2003), néctar e superfícies vegetais (Pozo et al., 2011), pólen e pão de abelha de *A. mellifera* (Gilliam, 1979a).

Destaque se dá a espécie *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans*, reconhecidamente patogênica (Goldman et al., 1994). Embora a ecologia desta espécie ainda não seja clara, alguns autores tem relatado a presença de *F. neoformans* em plantas e animais que se alimentam destas plantas. Ergin e colaboradores (2004) isolaram *F. neoformans* de colmeia experimental de *A. mellifera* na Turquia e citam que a possível fonte da levedura seria plantações de *Eucalyptus* spp., uma vez que colmeias amostradas em regiões com outro tipo de vegetação não apresentaram a levedura. As abelhas atuam como vetores da levedura no ambiente. No presente estudo, esta espécie foi encontrada apenas no pólen corbicular, indicando possivelmente que as abelhas trouxeram à colmeia o próprio pólen contaminado ou introduziram a levedura neste substrato, proveniente de outra superfície.

Os gêneros *Debaryomyces*, *Kodamea*, *Pseudozyma*, *Rhodosporidium* e *Zygosaccharomyces* foram exclusivos do ambiente norte-americano e representaram juntos 17,3% dos isolados. *Debaryomyces hanseni* foi a espécie mais prevalente dentre estes gêneros, representando 8,4% do total de isolados, sendo observada em todos os substratos, exceto conteúdo intestinal. Generalista, esta espécie é halotolerante e osmotolerante, comumente encontrada no filoplano e como contaminante de alimentos (Rosa et al., 2003). Há relatos de sua ocorrência em vários substratos associados a abelhas (Snowdon & Cliver, 1996; Lachance et al., 2001b; Rosa et al., 2003). Embora alguns autores tenham observado sua ocorrência no Brasil associada a abelhas (Rosa et al., 2003; Calaça, 2011), esta espécie foi isolada apenas dos substratos amostrados nos Estados Unidos e foi a levedura prevalente na coleta realizada no final do inverno.

O gênero *Pseudozyma* foi representado neste trabalho por três espécies, sendo que *P. aphidis* representou 6% do total de isolados, proveniente do pólen corbicular, alimento e abelhas,

apenas na coleta realizada no verão. Nesta coleta, foi a levedura mais prevalente. As demais espécies do gênero foram isoladas apenas uma vez, de diferentes substratos (Tabela 4).

Assim como a espécie *Kodamea ohmeri*, já isolada de besouros Nitidulidae em flores (Lachance, dados não publicados, *apud* Rosa et al., 2003), as espécies *Rhodospodium toruloides* e *Zygosaccharomyces rouxii* foram observadas apenas uma vez neste trabalho. *Z. rouxii* é o principal agente de fermentação deteriorante em méis de *A. mellifera*, devido a sua tolerância a ambientes com alta pressão osmótica (Snowdon & Cliver, 1996). *Z. rouxii*, juntamente com *P. aphidis*, foram as duas únicas espécies de leveduras isoladas do conteúdo intestinal de *A. mellifera*.

Tabela 4. Riqueza e abundância de espécies de leveduras em diferentes substratos associados a *Apis mellifera* nos Estados Unidos e Brasil.

Espécies de Leveduras	Estados Unidos						Brasil				
	Pólen (n=8)	Alimento (n=8)	Abelhas nutrizes (n=40)	Abelhas Forrageiras (n=40)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=40)	Pólen (n=15)	Alimento (n=15)	Abelhas nutrizes (n=75)	Abelhas Forrageiras (n=75)	Resíduos (n=15)
<b>Ascomycota</b>											
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	1	1	6	5		2		16	19	1
<i>Candida hawaiiiana</i>								1			
<i>Candida magnoliae</i>		1			1						
<i>Candida oleophila</i>				1							
<i>Candida orthopsilosis</i>								7	1	20	
<i>Candida parapsilosis</i>				1						1	
<i>Candida sorbosivorans</i>							1	1		3	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	3	3	3	2	7						
<i>Debaryomyces nepalensis</i>				1							
<i>Exophiala dermatitidis</i>							2	1	1	3	
<i>Kodamaea ohmeri</i>					1						
<i>Metschnikowia koreensis</i>								1			
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		1									
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	1										
<i>Meyerozyma caribbica</i>					2			1			
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>										1	
<b>Basidiomycota</b>											
<i>Bullera japonica</i>										1	
<i>Bensingtonia</i> sp.							4			4	
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>							1				
<i>Cryptococcus amyloletus</i>		1									
<i>Cryptococcus flavus</i>				1							
<i>Cryptococcus laurentii</i>							1				

Tabela 4. Continuação

Espécies de Leveduras	Estados Unidos						Brasil				
	Pólen (n=8)	Alimento (n=8)	Abelhas nutrizes (n=40)	Abelhas Forrageiras (n=40)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=40)	Pólen (n=15)	Alimento (n=15)	Abelhas nutrizes (n=75)	Abelhas Forrageiras (n=75)	Resíduos (n=15)
<i>Cryptococcus magnus</i>				2							
<i>Cryptococcus saitoi</i>			1	2							
<i>Cryptococcus victoriae</i>	1						1				
<i>Filobasidiella neoformans</i>							3				
<i>Kockovaella thailandica</i>											1
<i>Kwoniella mangroviensis</i>							4	1			2
<i>Occultifur aff. externus</i>					1						2
<i>Pseudozyma aphidis</i>	8	1		3		1					
<i>Pseudozyma flocculosa</i>				1							
<i>Pseudozyma graminicola</i>		1									
<i>Rhodospiridium toruloides</i>				1							
<i>Rhodotorula acheniorum</i>				1							
<i>Rhodotorula colostri</i>				2							
<i>Rhodotorula graminis</i>	1										
<i>Rhodotorula minuta</i>								1			1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1			2	3		6	1			10
<i>Rhodotorula pallida</i>					2						
<i>Rhodotorula slooffiae</i>											2
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	1			1							
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>											1
<i>Sporobolomyces poonsookiae</i>											1
<i>Sporobolomyces symmetricus</i>			1								
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>						1					
Número de espécies	8	7	4	15	8	1	10	9	1	3	16

Assim como alguns gêneros só ocorreram nos Estados Unidos, alguns também foram exclusivos do ambiente brasileiro: *Bensingtonia*, *Bullera*, *Exophiala*, *Kockovaella* e *Kwoniella*, e estes tiveram a representatividade de 11,2% do total de isolados. A espécie designada neste trabalho como *Bensingtonia* sp. foi a segunda espécie de levedura basidiomicética mais prevalente no Brasil (3,3% do total), para a qual ainda não há descrição formal. Foi observada a partir de pólen corbicular e resíduos da colmeia. A árvore filogenética com oito isolados pertencentes a este táxon mostrou que estes apresentam sequências idênticas entre si. A espécie mais próxima é *Bensingtonia sakaguchii* (acesso no GenBank sob o código AF363646.1), descrita em associação com folhas da espécie vegetal *Bischofia javanica* no Japão (Sugita et al., 1997). As análises no BLASTn evidenciaram que o novo táxon e a espécie mais próxima apresentaram baixa similaridade de sequência da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, entre 89 e 92% (Figura 19). Por este motivo, este táxon pode representar uma nova espécie ou gênero.

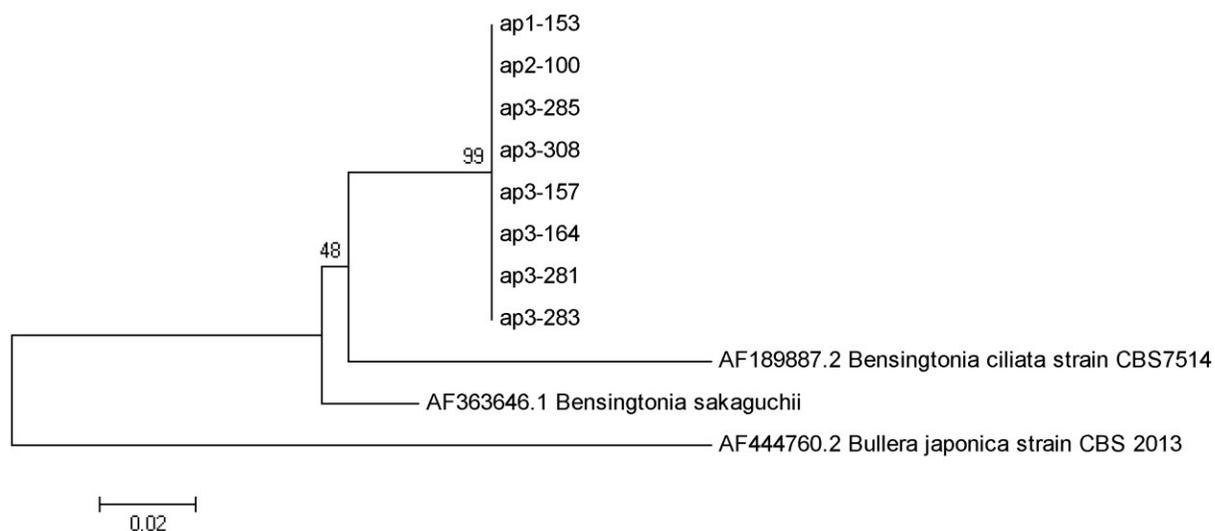


Figura 19. Árvore filogenética dos oito isolados de táxon ainda não descrito, baseada nas sequências da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, gerada pelo método de *Neighbour-joining*, mostrando a identidade entre eles, a relação destes com a espécie filogeneticamente mais próxima e espécie tipo do gênero. Os valores percentuais de *bootstrap* (1000 repetições) estão mostrados.

Embora o pólen floral não tenha sido amostrado, a presença desta possível espécie nova no pólen corbicular (e resíduos da colmeia) indica que a mesma possa ter sido adicionada à este substrato pelas abelhas, como observado por Gilliam (1979a) para a espécie *C. magnoliae*.

*Bullera japonica* e *Kockovaella thailandica* foram observadas apenas uma vez, nos resíduos da colmeia, e já foram relatadas em folhas e gramíneas, respectivamente (Kurtzman, 2011). As espécies *Exophiala dermatitidis* e *Kwoniella mangroviensis* representaram cada 3,6% do total de isolados e ambas foram observadas no pólen, pão de abelhas e resíduos da colmeia, sendo que *E. dermatitidis* foi ainda observada na superfície de abelhas forrageiras. Destaque se dá a espécie *E. dermatitidis*, um fungo negro leveduriforme como *A. pullulans*, reconhecidamente neuropatogênico, que ainda apresenta habitat natural incerto. Sudhadham e colaboradores (2008) observaram esta espécie em frutos, fezes de aves e morcegos, carcaça de animais, solo e segundo os autores, a possível explicação para o isolamento de *E. dermatitidis* destes substratos seria que os frutos selvagens contendo a levedura são ingeridos por aves, que a dissemina por meio das fezes. A observação desta espécie em substratos associados a abelhas sugere que estas entraram em contato com superfícies contaminadas e carregaram a levedura para a colmeia.

*Kwoniella mangroviensis* foi descrita em associação à água marinha e áreas de mangue, nas Ilhas Bahamas e Florida, e foi sugerido pelos autores um papel relacionado a este habitat (Statzell-Tallman et al., 2008). Melo (2009) isolou *K. mangroviensis* de exudatos da espécie *Calophyllum brasiliense*, no estado do Tocantins. Foi observada a presença desta espécie em pólen, pão de abelhas e resíduos da colmeia.

Durante a atividade de forrageamento, as abelhas deixam as colmeias em busca de fontes vegetais para satisfazer os requerimentos nutricionais da colônia. O néctar floral é a fonte primária de carboidratos e o pólen de proteínas, de onde advêm também lipídeos, vitaminas e minerais. A própria bionomia da abelha proporciona sua relação direta com superfícies vegetais, principalmente florais, o que pode resultar em alteração da comunidade microbiana vegetal e na disseminação desta para o vasto universo de substratos que circundam este inseto. É neste contexto que a maioria das leveduras associadas a abelhas tem sido isolada.

As observadas neste trabalho foram também isoladas por outros autores, provenientes de superfícies florais e insetos visitantes (Lachance et al., 2001b), filoplano (Fonseca e Inácio, 2006), tanques de bromélias (Landell, 2006), flores, insetos e material vegetal em decomposição (Barriga et al., 2014), nectários de diversas espécies (Pozo et al., 2011), plantas, aves polinizadoras (Belisle et al., 2012) e exsudados arbóreos (Melo, 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que as leveduras presentes no néctar floral podem alterar o comportamento de forrageamento e coleta das abelhas (Vannette et al., 2012). Good e colaboradores (2014) avaliaram a presença de bactérias (*Asia astilbes*, *Erwinia tasmaniensis* e *Lactobacillus kunkeii*) e levedura (*Metschnikowia reukaufii*) em nectários artificiais, disponíveis para *A. mellifera* em apiário experimental. Os autores evidenciaram que as abelhas evitaram os nectários inoculados pelas bactérias possivelmente pelas alterações bioquímicas resultantes do metabolismo bacteriano, ao passo que não apresentaram alteração na atividade de forrageamento pela presença da levedura, provavelmente porque as alterações bioquímicas ocasionadas por *M. reukaufii* aumentaram a atratividade do néctar para as abelhas.

Embora a explicação para a observação de leveduras associadas a insetos venha de outros substratos dos quais aquela levedura já fora isolada, a relação inseto-levedura pode ser a alternativa explanatória para esta ocorrência (Ganter, 2006). Lachance et al. (2001b) cita que a observação abelha-levedura não é uma ocorrência ao acaso e sim indica uma relação funcional entre os dois indivíduos. A natureza desta relação não é conhecida, mas acredita-se que as leveduras tenham um papel importante na maturação do pólen (Starmer & Lachance, 2011), melhorando a qualidade nutricional desses substratos para as abelhas (Rosa et al., 2003). Gilliam (1979a) observou maior diversidade de leveduras no pólen floral do que no pólen corbicular de *A. mellifera* e apenas uma espécie no pão de abelha (*C. magnoliae*), concluindo que as abelhas utilizam as leveduras para processar o pólen corbicular, antes que este esteja adequado como alimento. Espécies de leveduras isoladas neste trabalho foram também observadas em estudos anteriores com a abelha *A. mellifera* (Gilliam, 1979a; Snowdon & Cliver, 1996) e abelhas de outras espécies (Rosa et al., 2003; Calaça, 2011).

As comunidades de leveduras observadas no Brasil e nos Estados Unidos são diferentes (Tabela 4), apresentando em comum apenas seis espécies e em sua maioria generalistas. Este resultado sugere que abelhas da mesma espécie, embora abriguem leveduras espécie-específicas, tem sua microbiota composta em grande parte por espécies presentes no ambiente no qual estão inseridas, refletindo em comunidades de leveduras distintas entre os dois ambientes.

### 5.2.1.1 Análise de diversidade de leveduras associadas a *A. mellifera*

A partir de 339 amostras de substratos em associação com *A. mellifera* (Brasil = 195 e Estados Unidos = 144) o total de 214 leveduras foi isolado, correspondendo a 45 táxons. As curvas de acumulação de espécies dos substratos avaliados (todos os substratos compilados) tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos não estabilizaram, evidenciando que a amostragem não foi representativa do total de espécies possíveis destes locais (Figura 20). Estes dados indicam que um maior esforço amostral possivelmente resultaria em um maior número de espécies de leveduras do que o observado neste trabalho.

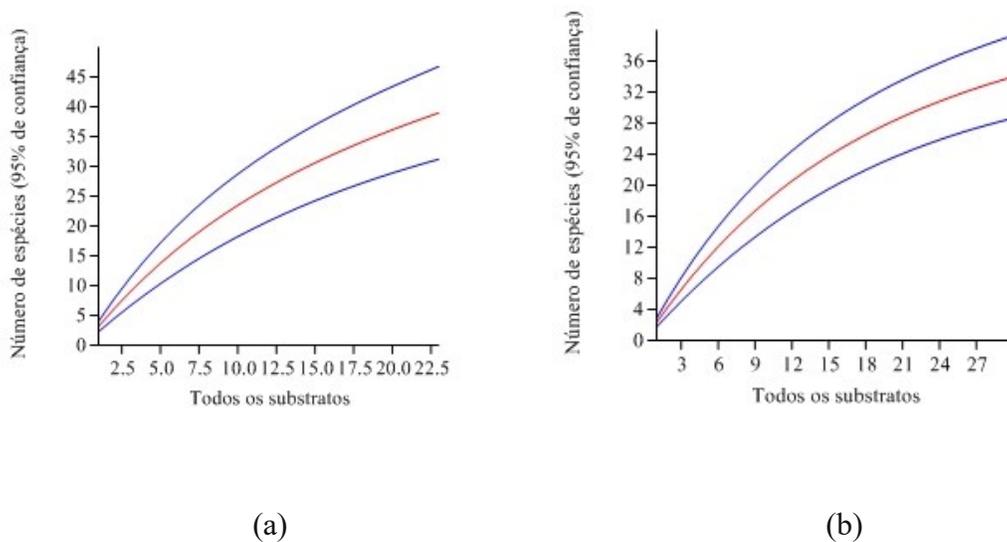


Figura 20. Curvas de acumulação de espécies de leveduras (linhas vermelhas) no (a) Brasil e (b) nos Estados Unidos, com intervalos de confiança de 95% (linhas azuis), baseada em 1.000 repetições de *bootstrap*.

Além da curva de acumulação de espécies, a riqueza da comunidade de leveduras associada a *A. mellifera* foi também avaliada pelo estimador de riqueza *Chao 2*, o qual é

resultante de medidas que possibilitam estimar o número total de espécies numa comunidade, a partir de dados amostrais (Tabela 5).

Tabela 5. Valores observados e valores esperados de espécies de leveduras, baseados no estimador de riqueza *Chao 2*, para todos os substratos associados a *A. mellifera* no Brasil e Estados Unidos.

Local	Nº observado de espécies	Estimador de riqueza <i>Chao 2</i>
Brasil	23	39,5 ± 12,9
Estados Unidos	28	34,2 ± 8,9

O estimador *Chao 2* indicou estimativas de riqueza de espécies de leveduras superior às observadas neste trabalho (Tabela 5), corroborando os resultados gerados pelas curvas de acumulação de espécies, que estabelece que um maior esforço amostral possivelmente resultaria em um maior número de espécies observado.

### 5.2.2 Bactérias

Foram obtidos 283 isolados bacterianos, 125 no Brasil e 158 nos Estados Unidos. Do total, 71 (25%) dos isolados corresponderam às bactérias do ácido lático (BAL) e serão discutidos no item 5.2.2.1. Os demais 212 isolados, correspondentes às bactérias não-láticas, serão discutidos a seguir.

Ao final do processo de identificação das bactérias não-láticas, 51 táxons foram observados, sendo quatro identificados em nível de gênero, pois não foi possível determinar homologia de sequência de 99 a 100% do gene da subunidade menor (16S) do rRNA com aquelas sequências já depositadas, provenientes de Coleções de Culturas ou publicações em revistas indexadas. Os táxons observados foram distribuídos entre os filos Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria, sendo que 88,7% do total de isolados pertencem aos dois últimos.

A tabela 6 mostra a riqueza e o número de isolados para cada substrato avaliado. No Brasil, assim como observado para as leveduras, o substrato com maior riqueza foi o resíduo das colmeias, com 14 espécies, seguido de pólen corbicular, alimento, superfície de nutrizes e forrageiras (estes três últimos apresentando a mesma riqueza) e conteúdo intestinal. Como citado anteriormente, os micro-organismos depositados no fundo de uma colônia de abelhas reflete um histórico acumulado daqueles que estiveram presentes na colônia durante longos períodos (Forsgren & Laugen, 2014), não sendo surpreendente que este seja o substrato com maior riqueza de espécies

Nos Estados Unidos, o substrato com maior riqueza foi a superfície corpórea de abelhas forrageiras, com 19 espécies, seguido de conteúdo intestinal, alimento e resíduos da colmeia (que apresentaram a mesma riqueza), pólen e superfície corpórea de abelhas nutrizes (Tabela 6). Como observado na avaliação de leveduras, o substrato mais diverso nos Estados Unidos foi novamente a superfície de forrageiras, provavelmente por serem as forrageiras a via de comunicação do interior da colmeia com o ambiente externo. Todas as espécies de bactérias observadas em associação com *A. mellifera* estão listadas na tabela 6.

Tabela 6. Riqueza de espécies de bactérias não lácticas nos diferentes substratos de isolamento associados à *Apis mellifera*.

Local	Substratos de isolamento					
	Pólen	Alimento	Abelhas nutrízes	Abelhas Forrageiras	Resíduos da Colmeia	Conteúdo Intestinal
Brasil						
Riqueza (S)	9	4	4	4	14	2
Número de isolados	32	7	8	7	26	4
Estados Unidos						
Riqueza (S)	9	11	6	19	11	18
Número de isolados	18	20	7	39	20	26

O filo Actinobacteria é composto por bactérias Gram-positivas com alto índice de G+C, altamente pleomórficas, filamentosas e habitantes comuns do solo (Tortora et al., 2005). Quatro gêneros deste filo foram observados, exclusivos do ambiente norte americano: *Curtobacterium*, representado pelas espécies *C. citreum*, *C. flaccumfaciens* e *C. oceanosedimentum*, *Microbacterium oxydus*, *Rhodococcus equi* e *Streptomyces fumigatiscleroticus*, associados à superfície corpórea de abelhas, conteúdo intestinal e pólen corbicular (Tabela 7). Espécies de Actinobacteria já foram observadas em néctar floral (Fridman et al., 2012), pólen e pão de abelhas de *A. mellifera* (Anderson et al., 2013) e tem sido relatadas como mutualistas em alimentos estocados, materiais da colmeia e cutícula de uma variedade de espécies de Hymenoptera (Kaltenpoth, 2009; Anderson et al., 2013). Corby-Harris e colaboradores (2014) citam que a transmissão de Actinobacteria entre diferentes ambientes ligados às colmeias deve ocorrer pela superfície corpórea de abelhas, possivelmente a mesma explanação para a ocorrência observada neste trabalho.

O filo Firmicutes agrupa bactérias Gram-positivas com baixo índice de G+C. São tipicamente bastonetes formadores de endósporos, também comuns no solo (Tortora et al., 2005). Neste trabalho, o gênero *Bacillus* representou 83,1% do número total de isolados do filo e 62,7% do total isolados de bactérias não-láticas associadas a *A. mellifera*.

Pelo sequenciamento da subunidade 16S do gene do rRNA foi possível identificar em nível de espécie dez dos doze táxons pertencentes ao gênero *Bacillus*. Dois táxons foram identificados em nível de gênero, designados como *Bacillus* sp.1 e *Bacillus* sp.2. O táxon *Bacillus* sp1 agrupou isolados que apresentaram de 99 a 100% de homologia no BLASTn com sequências de três espécies: *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*, pertencentes ao grupo do *B. cereus*. Bavykin e colaboradores (2004) relataram que espécies pertencentes ao grupo do *B. cereus* apresentam alta similaridade de sequência na região gênica utilizada neste trabalho para identificação e, portanto, o sequenciamento apenas desta região não é suficiente para a resolução entre estas espécies. Os isolados pertencentes ao táxon *Bacillus* sp.1 estão mostrados na figura 21.

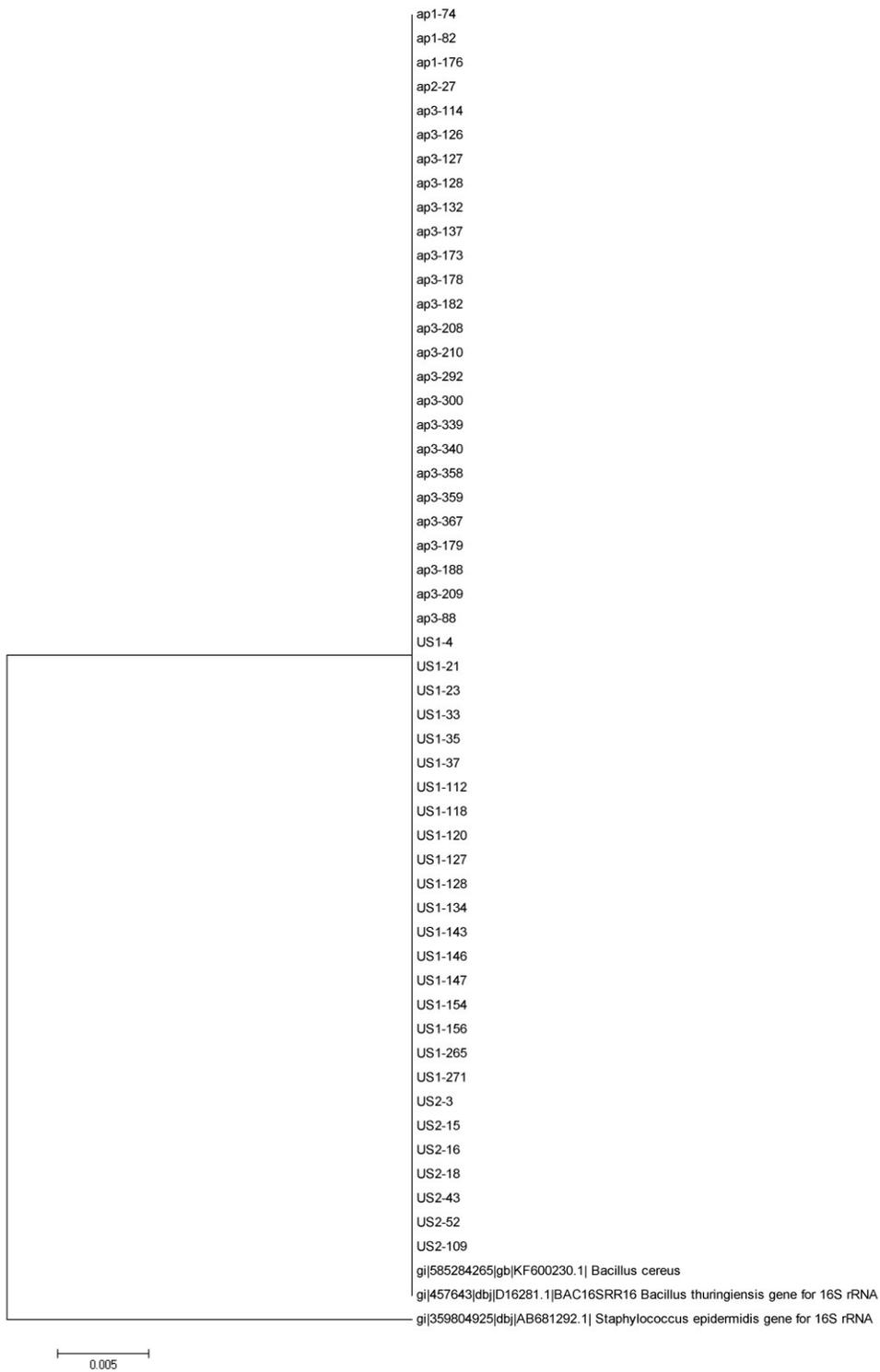


Figura 21. Árvore filogenética de 58 isolados de táxon sem resolução, designado de *Bacillus* sp.1, gerada pelo método de *Neighbour-joining*. Os valores percentuais de *bootstrap* (1000 repetições) estão mostrados.

De maneira semelhante ao observado para o táxon *Bacillus* sp.1, o táxon *Bacillus* sp.2 agrupou isolados que apresentaram de 99 a 100% de homologia no BLASTn com sequências de duas espécies: *B. safensis* e *B. pumilus*, pertencentes ao grupo do *B. subtilis*. As espécies do subgrupo onde estão alocadas *B. safensis* e *B. pumilus*, compreendo as espécies *B. stratosphericus*, *B. altitudinis* e *B. aerophilus* compartilham similaridade acima de 99,5% na região 16S do gene do rRNA, sendo necessária a utilização de outras sequências gênicas que forneçam variabilidade inter-específica para resolução entre estas espécies (Evans & Armstrong, 2006; Liu et al., 2013). Os isolados pertencentes ao táxon *Bacillus* sp.2 estão mostrados na figura 22.

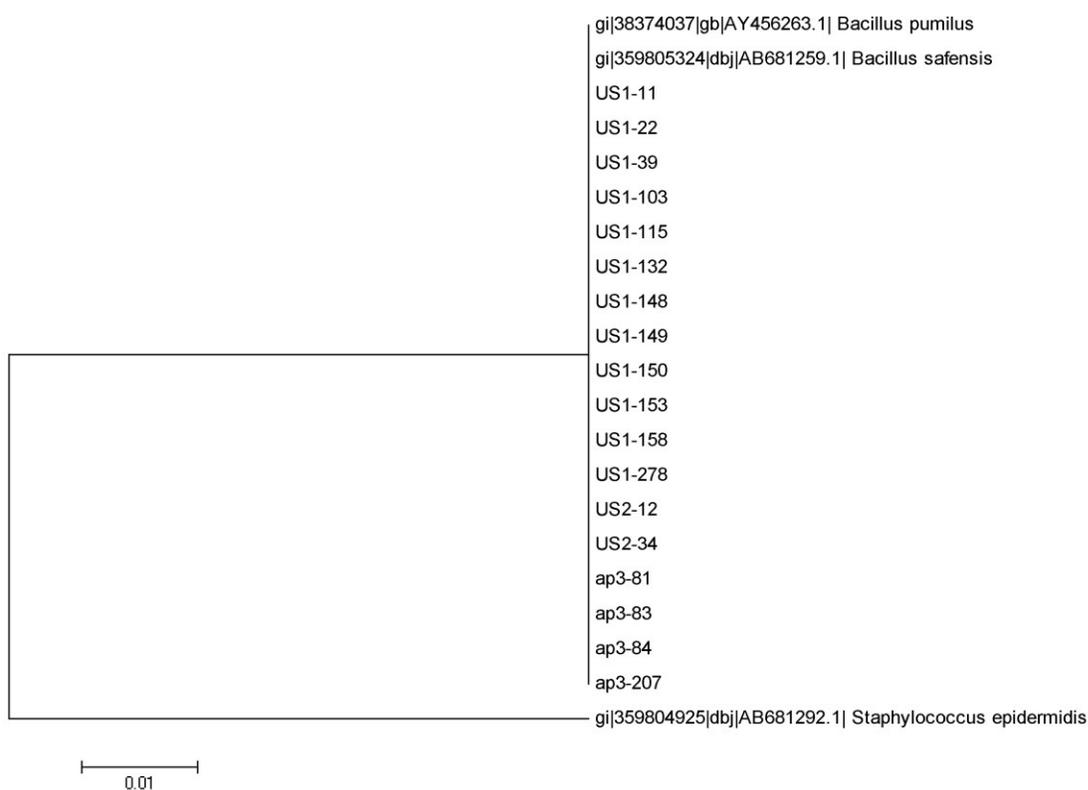


Figura 22. Árvore filogenética de 18 isolados de táxon sem resolução, designado de *Bacillus* sp.2, gerada pelo método de *Neighbour-joining*. Os valores percentuais de *bootstrap* (1000 repetições) estão mostrados.

Tanto o táxon *Bacillus* sp.1 quanto *Bacillus* sp.2 foram observados em todos os substratos avaliados, nos dois ambientes. Dentre as dez outras espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, apenas três foram comuns aos dois ambientes: *B. aerophilus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*, associadas ao pólen corbicular, superfície de forrageiras e principalmente conteúdo intestinal. Duas espécies foram observadas apenas no Brasil: *B. amyloliquifaciens* e *B. oleronius*, em associação ao pólen corbicular, superfície de forrageiras e resíduos das colmeias. As demais ocorreram apenas nos Estados Unidos: *B. aryabhata*, *B. asahii*, *B. megaterium*, *B. nealsonii* e *pseudomycooides*, observadas em todos os substratos (Tabela 7).

Trabalhos pioneiros relataram a associação entre espécies de *Bacillus* e abelhas. Gilliam (1979b) ao estudar pólen e pão de abelhas identificou cinco espécies do gênero *Bacillus*, quatro destas também observadas no presente trabalho. A autora cita que, apesar do número de *Bacillus* ser inferior ao de leveduras nestes substratos, estas bactérias devem contribuir para a produção e preservação do pão de abelhas, devido a sua intensa e diversificada atividade metabólica. Bactérias deste gênero foram também observadas em intestinos de abelhas selvagens (Gilliam & Tabber, 1990) e experimentais de *A. mellifera* (Kacanoná et al., 2004), material fecal larval da mesma espécie (Gilliam & Prest, 1987) e alimento larval de meliponíneos (Gilliam et al., 1985). Para Cano e colaboradores (1994) o papel destas bactérias parece estar relacionado também à proteção do alimento larval e produção de substâncias antagonistas.

De fato, alguns autores já demonstraram atividade antagonista de espécies de *Bacillus* frente a patógenos apícolas. Alippi & Reynaldi (2006) relataram ação inibitória das espécies *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. subtilis*, também isoladas neste trabalho, sobre o crescimento de *Paenibacillus larvae*, principal patógeno apícola, causador da Cria Pútrida Americana. Surfactinas produzida por *B. subtilis* inibiram o crescimento de *P. larvae* e *Ascospaera apis*, outro importante patógeno apícola, causador da doença Cria Giz (Sabaté et al., 2009).

Estudos recentes conduzidos por Anderson e colaboradores (2013) avaliaram a microbiota associada a diversos substratos associados a *A. mellifera*. Foram observadas espécies do gênero *Bacillus* no estômago de mel, porções medial e distal do intestino, mel, pão de abelhas e

massivamente no néctar de flores visitadas por abelhas, sendo que um total de 17.7% das espécies observadas no néctar foi idêntico às observadas nos demais substratos. Outros autores já relataram a presença de espécies de *Bacillus* em néctar floral (Fridman, 2012; Aizenberg-Gershtein et al., 2013). A comparação entre abelhas, nectários de flores visitadas por abelhas e nectários de flores cobertas (sem visitação) revelou que a comunidade bacteriana dos nectários de flores não visitadas é significativamente diferente das demais, sugerindo que as abelhas possam modificar a microbiota do néctar.

Duas espécies do gênero *Lysinibacillus* foram observadas em associa o com abelhas: *L. fusiformis* e *L. sphaericus*. A primeira ocorreu em todos os substratos, exceto superfície de abelhas nutrizas nos Estados Unidos, ao passo que a segunda foi observada apenas no cont duo intestinal no Brasil. Espécies deste gênero são frequentemente encontradas no solo e plantas. *Lysinibacillus sphaericus* (Tabela 7) tem sido reportada como patógeno para insetos, inclusive utilizada como controle biológico de diversas espécies (Berry, 2012).

O gênero *Paenibacillus*, que abriga o principal patógeno apícola, *P. larvae*, é composto por bacilos anaeróbicos facultativos ou aeróbios estritos, formadores de esporos, ubíquos na natureza, especialmente solo (Kim et al., 2011). Neste trabalho foi representado pelas espécies *P. alvei*, *P. anaericanus* e *P. amylolyticus* (Tabela 7). *Paenibacillus alvei*, observada no alimento, forrageiras e cont duo intestinal nos Estados Unidos, tem sido frequentemente isolada como invasora secundária de abelhas acometidas pelo coco Gram-positivo *Melissococcus plutonious*, causador da Cria Pútrida Européia (Forsgren, 2010). *P. anaericanus* e *P. amylolyticus* foram observadas apenas uma vez, associadas aos resíduos das colmeias no Brasil e alimento nos Estados Unidos, respectivamente. Espécies de *Paenibacillus*, incluindo *P. alvei*, foram recentemente observadas em mel e néctar de flores visitadas por *A. mellifera* (Anderson et al., 2013).

Tabela 7. Riqueza e abundância de espécies de bactérias em diferentes substratos associados a *Apis mellifera* nos Estados Unidos e Brasil.

Espécies de Bactérias	Estados Unidos						Brasil					
	Pólen (n=8)	Alimento (n=8)	Abelhas nutrízes (n=40)	Abelhas Forrageiras (n=40)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=40)	Pólen (n=15)	Alimento (n=15)	Abelhas nutrízes (n=75)	Abelhas Forrageiras (n=75)	Resíduos (n=15)	Conteúdo Intestinal (n=15)
<b>Actinobacteria</b>												
<i>Curtobacterium citreum</i>			2			1						
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>				1	1							
<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>					1	3						
<i>Microbacterium oxydan</i>	1											
<i>Rhodococcus equi</i>				1		1						
<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i>				1								
<b>Firmicutes</b>												
<i>Bacillus</i> sp.1	7	5	1	9	6	4	8	2	3	4	6	3
<i>Bacillus</i> sp.2	2	5	1	3	2	1		1	3		1	
<i>Bacillus aerophilus</i>	2					3			1			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>							10			1	1	
<i>Bacillus aryabhatai</i>		2			1	1						
<i>Bacillus asahii</i>				1								
<i>Bacillus licheniformis</i>				2		1	2					
<i>Bacillus megaterium</i>		1	1	5								
<i>Bacillus nealsonii</i>	1											
<i>Bacillus pseudomycooides</i>					1							
<i>Bacillus oleronius</i>							1					
<i>Bacillus subtilis</i>				4		1	6	3			4	
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1	1		2	1	2						
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>											1	
<i>Paenibacillus alvei</i>		1		1		1						

Tabela 7. Continuação

Espécies de Bactérias	Estados Unidos						Brasil					
	Pólen (n=8)	Alimento (n=8)	Abelhas nutrizes (n=40)	Abelhas Forrageiras (n=40)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=40)	Pólen (n=15)	Alimento (n=15)	Abelhas nutrizes (n=75)	Abelhas Forrageiras (n=75)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=15)
<b>Firmicutes (continuação)</b>												
<i>Paenibacillus anaericanus</i>											1	
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>		1										
<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>				1	1	1						
<i>Solibacillus silvestris</i>				1								
<i>Sporosarcina saromensis</i>		1										
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1		1		1			1			
<i>Staphylococcus sciuri</i>					2							
<i>Staphylococcus succinus</i>							1				1	
<i>Staphylococcus warneri</i>						1						
<b>Proteobacteria</b>												
<b>Alphaproteobacteria</b>												
<i>Saccharibacter</i> sp.		1	1									
<b>BetaProteobacteria</b>												
<i>Bordetella</i> sp											1	
<b>Gammaproteobacteria</b>												
<i>Enterobacter cloacae</i>						1						
<i>Enterobacter sacchari</i>							1					
<i>Escherichia coli</i>						1						
<i>Ewingella americana</i>				1	1							
<i>Kluyvera intermedia</i>											1	
<i>Morganella morgani</i>											1	1

Tabela 7. Continuação

Espécies de Bactérias	Estados Unidos						Brasil					
	Pólen (n=8)	Alimento (n=8)	Abelhas nutrizes (n=40)	Abelhas Forrageiras (n=40)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=40)	Pólen (n=15)	Alimento (n=15)	Abelhas nutrizes (n=75)	Abelhas Forrageiras (n=75)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=15)
<b>Gammaproteobacteria (cont.)</b>												
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	1								1		
<i>Pantoea brenneri</i>				2			2	1			4	
<i>Pantoea eucrina</i>	1		1									
<i>Pantoea septica</i>											1	
<i>Pantoea stewartii</i>				1								
<i>Pantoea vagans</i>											1	
<i>Pseudocitrobacter anthropi</i>											1	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>						1						
<i>Pseudomonas fulva</i>										1		
<i>Pseudomonas koreensis</i>						1						
<i>Pseudomonas protegens</i>					3							
<i>Rahnella aquatilis</i>				1								
<i>Serratia marcescens</i>	1			1								
Número de espécies	17	20	7	39	20	26	32	7	8	7	25	4

O gênero *Staphylococcus* é altamente heterogêneo e ubíquo no ambiente, abrigando espécies patogênicas e benéficas para o homem e animais. Foram observadas quatro espécies deste gênero no presente estudo: *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. succinus* e *S. warneri*. *Staphylococcus epidermidis* foi observada em alimento, superfície de forrageiras e conteúdo intestinal nos Estados Unidos e superfície de nutrizes no Brasil. *Staphylococcus sciuri* e *S. warneri* ocorreram nos resíduos da colmeia e conteúdo intestinal nos Estados Unidos, respectivamente e *S. succinus* em pólen corbicular e resíduos da colmeia no Brasil (Tabela 7). A ocorrência de espécies deste gênero já foi observada em conteúdo intestinal de *A. mellifera* de colônias selvagens (Gilliam & Tabber III, 1990), néctar floral (Fridman et al., 2012) e mais recentemente em pão de abelhas, mel, néctar de flores visitadas por *A. mellifera* (Anderson et al., 2013) e outras flores (Baruzzi et al., 2012; Jacquemyn et al., 2013). No entanto, espécies de *Staphylococcus* parecem não compor a microbiota associada a *A. mellifera*, raramente estão presentes no mel (Snowdon & Cliver, 1996) e sua presença em substratos associados às abelhas sugerem uma microbiota transiente, proveniente de substratos aos quais as abelhas tiveram contato durante a atividade de forrageamento.

A espécie *Rummeliibacillus stabekisii* foi observada apenas nos Estados Unidos, isolada da superfície de abelhas forrageiras, resíduos da colmeia e conteúdo intestinal (Tabela 7). Esta espécie foi descrita por Vaishampayan e colaboradores (2009), isolada do chão de nave espacial e campo de compostagem. Já foi também observada em associação com abelhas visitantes das flores de *Citrus paradisi* (Aizenberg-Gershtein et al., 2013).

O filo Proteobacteria agrupa a maioria das espécies de bactérias Gram-negativas quimio-heterotróficas e é bastante diverso (Tortora et al., 2005). Foi representado neste trabalho pelas classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria. As duas primeiras classes contaram apenas com uma espécie, sendo que 90,5% do total de isolados pertencentes a este filo foram alocados na classe Gammaproteobacteria.

A espécie designada neste trabalho como *Saccharibacter* sp. foi a única representante da classe Alphaproteobacteria, que engloba espécies capazes de crescer com níveis muito baixos de nutrientes (Tortora et al., 2005). Os dois isolados deste táxon foram observados no alimento e

superfície de abelhas nutrizes, apenas nos Estados Unidos, e apresentaram 96% de homologia no BLASTn com a sequência da região 16S do gene do rRNA da espécie *Saccharibacter floricola* (acesso no GenBank sob o código JF794031.1), podendo representar uma nova espécie (Figura 23). Descrita em associação com pólen floral no Japão (Jojima et al., 2004), *S. floricola* é uma bactéria osmofílica recentemente referida como simbiote intestinal de diversos insetos, incluindo *A. mellifera* (Chouaia et al., 2014). A presença de *S. floricola*-like no alimento e superfícies de nutrizes indica que as abelhas a tenham carregado do ambiente externo, como o pólen floral, para a colmeia.

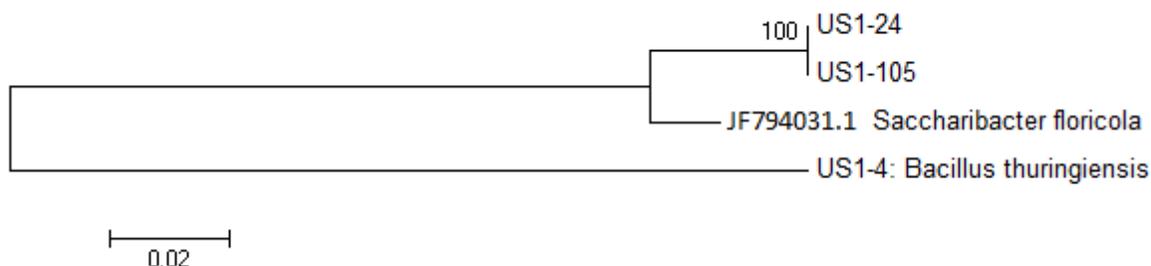


Figura 23. Árvore filogenética de dois isolados de táxon ainda não descrito, baseada nas sequências da região 16S do gene do rRNA, gerada pelo método de *Neighbour-joining*, mostrando a relação destes com a espécie filogeneticamente mais próxima *Saccharibacter floricola*. Os valores percentuais de *bootstrap* (1000 repetições) estão mostrados.

A classe Gammaproteobacteria, o maior subgrupo do filo Proteobacteria, foi representado por dez gêneros, sendo nove destes pertencentes a Família Enterobacteriaceae e apenas um, *Pseudomonas*, pertencente a família Pseudomonadaceae. Enterobacteriaceae é uma grande família de bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos, com capacidade fermentativa. Muitos membros fazem parte da microbiota normal intestinal de vários animais, enquanto outros são comumente encontrados no solo e plantas (Tortora et al., 2005). A família Entetobacteriaceae

foi representada neste trabalho pelos gêneros: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pseudocitrobacter*, *Rahnella* e *Serratia*, sendo que apenas os gêneros *Enterobacter* e *Pantoea* foram representados por mais do que uma espécie.

Duas espécies do gênero *Enterobacter* foram observadas em associação com abelhas: *E. cloaceae* e *E. sacchari*, isoladas do conteúdo intestinal nos Estados Unidos e pólen corbicular no Brasil, respectivamente (Tabela 7). *Enterobacter cloaceae* e outras espécies do gênero foram observadas em néctar floral, pão de abelhas de *A. mellifera* (Anderson et al., 2013) e mel (Olaitan, et al., 2007), indicando que, de maneira semelhante ao já observado para outras espécies, as abelhas adquirem bactérias comuns no ambiente de forrageamento e as adicionam aos micro-ambientes da colmeia, podendo conseqüentemente serem isoladas do conteúdo intestinal.

O gênero *Pantoea* inclui diversas espécies bacterianas, geralmente associadas às plantas, como parte do filoplano ou patógenos e poucas são patogênicas para humanos (Deletóile et al., 2009). Seis espécies do gênero foram isoladas: *P. agglomerans*, *P. breneri*, *P. eucrina*, *P. septica*, *P. stewartii* e *P. vagans*. As espécies *P. agglomerans* e *P. breneri* foram observadas em associação ao pólen corbicular, alimento e superfície de forrageiras nos dois ambientes e resíduos das colmeias no Brasil. *Pantoea eucrina* foi isolada de pólen e superfície de abelhas nutrizes, enquanto *P. stewartii* da superfície de forrageiras, ambas com ocorrência apenas nos Estados Unidos. Já as espécies *P. septica* e *P. vagans* foram observadas apenas nos resíduos das colmeias no Brasil (Tabela 7).

O gênero *Pseudomonas*, único representante do filo Gammaproteobacteria que pertence à outra família que não Enterobacteriaceae, foi representado neste trabalho por quatro espécies: *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. koreensis* e *P. protegens*. As espécies *P. fluorescens* e *P. koreensis* foram observadas em associação ao conteúdo intestinal de *A. mellifera* e *P. protegens* aos resíduos das colmeias nos Estados Unidos, ao passo que *P. fulva* foi isolada da superfície de forrageiras no Brasil (Tabela 7).

Vários estudos têm relatado a presença de espécies do gênero *Pantoea* e *Pseudomonas* em superfícies florais (Baruzzi et al., 2012) e néctar floral de diversas espécies (Fridman et al., 2012;

Anderson et al., 2013; Samuni-Blank et al., 2014), o que novamente suscita a possibilidade de transmissão de bactérias provenientes de superfícies e néctar para os substratos circundantes das colmeias apícolas, incluindo conteúdo intestinal destes insetos, pelas próprias abelhas, que ao visitar estas espécies florais adquirem a microbiota presente e a carregam para os demais ambientes.

As demais espécies de bactérias observadas em associação com *Apis mellifera* e seus substratos foram isoladas apenas uma vez e possivelmente são parte da microbiota transiente desta espécie. São elas: *Solibacillus silvestris*, *Sporosarcina saromensis*, *Pseudocitrobacter anthropi*, *Rahnella aquatilis* e *Serratia marcescens*.

Diversas espécies observadas neste estudo foram isoladas por outros autores, associadas ao néctar floral, pólen e superfícies florais (Baruzzi et al., 2012; Fridman et al., 2012; Anderson et al., 2013; Aizenberg-Gershtein et al., 2013; Jacquemyn et al., 2013; Corby-Harris et al., 2014; Samuni-Blank et al., 2014). O néctar floral é a fonte de carboidratos utilizada pelas abelhas para a produção de mel. Abelhas forrageiras coletam esse líquido após repousarem as patas nas superfícies florais, o que possibilita a introdução da probóscide no nectário da flor. Após a coleta, o néctar é armazenado no estômago de mel, que representa a interseção entre o compartilhamento/armazenamento de alimentos e o ambiente de polinização (Corby-Harris et al., 2014). A coleta de pólen, fonte primária de proteínas, é realizada pelo contato dos pelos da superfície das abelhas com os grãos de pólen, que são então compactados pelas patas dianteiras, misturados a líquidos açucarados do estômago de mel e transferidos às corbículas, nas patas traseiras. Ao retornar à colmeia, as abelhas forrageiras transferem a carga coletada para as abelhas do interior das colmeias, entre elas as nutrízes. É esperado que grande parte da microbiota observada nos micro-ambientes associados às abelhas seja proveniente de superfícies florais, pólen e néctar, sendo portanto caracterizada como microbiota transiente nas colmeias.

Além das espécies bacterianas provenientes das flores, o pólen corbicular pode ser inoculado por bactérias do ar, durante o retorno das abelhas às colmeias. Assim, os micro-organismos presentes no pólen corbicular não refletem apenas o conteúdo floral, e sim todo o

caminho transcorrido pelas abelhas entre a coleta e a chegada à colmeia (Corby-Harris et al, 2014).

Durante o contato com o micro-ambiente floral, as abelhas parecem não só adquirir parte dos micro-organismos como também alterar a composição microbiana do néctar. Aizenberg-Gershtein et al. (2013) verificaram que as abelhas introduzem bactérias endógenas nos nectários e disseminam a microbiota deste entre as demais plantas visitadas, modificando a comunidade bacteriana das flores a medida que as visita.

É interessante ressaltar que, embora não tenha sido o substrato mais diverso nos Estados Unidos e tenha tido pouca expressão no Brasil (Tabela 7), a microbiota intestinal bacteriana apresentou alta riqueza de espécies, quando comparada a microbiota de leveduras deste mesmo substrato. Alguns autores citam que a microbiota intestinal de insetos é o maior reservatório inexplorado da diversidade microbiana (Dillon & Dillon, 2004; Vásquez et al, 2012).

É sabido que *A. mellifera* possui uma microbiota intrínseca, simbiótica, principalmente associada ao intestino, sendo esta altamente consistente e composta em sua maioria por espécies do filo Proteobacteria (Jeyaprakash et al., 2003; Babendreier et al., 2006; Mohr & Tebbe, 2006; Olofsson & Vásquez, 2008; Martinson et al., 2011) (Figura 6). No entanto, no presente trabalho, a maioria das espécies bacterianas não-láticas foram classificadas no filo Firmicutes. Esta divergência pode ser em decorrência das metodologias empregadas: nos trabalhos citados, a microbiota bacteriana foi acessada por metodologias independentes de cultivo, que resultam em maior diversidade, o que poderia acarretar maior contribuição de grupos não observados neste trabalho, que utilizou metodologias baseadas em cultivo.

Do total de 51 táxons de bactérias não-láticas identificados, apenas oito são comuns aos dois ambientes. Semelhante ao observado na avaliação de leveduras associadas a *Apis mellifera*, grande parte da microbiota bacteriana não-lática parece também ter sido adquirida no ambiente circundante das abelhas, como superfícies florais, nectários, pólen e ar, resultando em comunidades tão distintas quanto as observadas nos substratos avaliados no Brasil e Estados Unidos.

### 5.2.2.1 Bactérias do ácido láctico

Foram obtidos 71 isolados de BAL, 42 no Brasil e 29 nos Estados Unidos, correspondendo a dez táxons distribuídos em cinco gêneros, pertencentes ao filo Firmicutes, exceto *Bifidobacterium*. Todos os táxons foram identificados em nível de espécie, pois apresentaram de 99 a 100% de similaridade de sequência do gene da subunidade menor (16S) do rRNA com aquelas depositadas em Coleções de Cultura ou provenientes de publicações em revistas indexadas. No Brasil, o substrato com maior riqueza de espécies de BAL foi o pão de abelhas (alimento), com cinco espécies, seguido de resíduos das colmeias, superfície de abelhas nutrizas e forrageiras (que apresentaram a mesma riqueza), pólen e conteúdo intestinal. Nos Estados Unidos, os substratos mais diversos foram o alimento e superfície de abelhas forrageiras, ambas com quatro espécies, seguido de pólen, superfície de abelhas nutrizas e resíduos das colmeias (que apresentaram a mesma riqueza) e conteúdo intestinal (Tabela 8).

Tabela 8. Riqueza de espécies de bactérias lácticas nos substratos de isolamento associados à *Apis mellifera*.

Local	Substratos de isolamento					
	Pólen	Alimento	Abelhas nutrizas	Abelhas Forrageiras	Resíduos da Colmeia	Conteúdo Intestinal
Brasil						
Riqueza (S)	2	5	3	3	4	1
Número de isolados	2	17	9	4	7	3
Estados Unidos						
Riqueza (S)	3	4	2	4	2	1
Número de isolados	4	7	3	5	6	4

Todas as espécies de BAL associadas a *A. mellifera* estão listadas na tabela 9. Os gêneros pertencentes ao filo Firmicutes foram: *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Fructobacillus* e *Lactobacillus*. A espécie *Aerococcus viridans* foi observada apenas uma vez, associada ao pólen corbicular nos Estados Unidos, provavelmente como microbiota transitente, pois não há relatos desta espécie associada a abelhas.

O gênero *Enterococcus* foi representado por três espécies: *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. pallens*. A espécie *E. casseliflavus* foi observada em associação com pão de abelhas nos Estados Unidos e Brasil e resíduos das colmeias no Brasil. As espécies *E. gallinarum* e *E. pallens* foram observadas apenas no Brasil, a primeira nos resíduos das colmeias e a segunda no pólen corbicular e também resíduos (Tabela 8). Espécies deste gênero foram isoladas de plantas, solo, (Collins et al., 1984), intestino de *Drosophila* (Cox & Gilmore, 2007), néctar floral, pão de abelhas (Anderson et al., 2013) e trato gastrointestinal de *A. mellifera* (Rada et al., 1997; Kacaniova et al., 2004; Audisio et al., 2011). Embora tenha sido associada ao trato intestinal de *A. mellifera*, bactérias deste gênero parecem não fazer parte da microbiota endógena de abelhas.

O gênero *Fructobacillus*, juntamente com algumas espécies do gênero *Lactobacillus*, como *L. kunkeii*, fazem parte de um grupo especial de BAL, as quais utilizam preferencialmente a frutose em detrimento da glicose como substrato de crescimento (Endo et al., 2009; Endo & Salminen, 2013). Duas espécies de *Fructobacillus* foram isoladas em associação com *A. mellifera*: *F. fructosus* e *F. tropaeoli*, a primeira de pólen corbicular, superfície de nutrizes e resíduos das colmeias nos Estados Unidos, pão de abelhas e superfície de forrageiras no Brasil e a segunda em associação com pão de abelhas e superfície de nutrizes no Brasil (Tabela 8). Membros deste gênero são frequentemente associados a flores e frutos, substratos ricos em frutose, de onde advém a denominação do grupo (Endo et al., 2009). Já foram isolados de intestinos de larvas a partir do terceiro instar (Vojvodic et al., 2013) e intestinos de abelhas adultas, figurando como parte da microbiota intestinal de *A. mellifera* desde a fase larval (Endo & Salminen, 2013).

Tabela 9. Riqueza e abundância de espécies de bactérias lácticas em diferentes substratos associados a *Apis mellifera* nos Estados Unidos e Brasil.

Espécies de Bactérias	Estados Unidos						Brasil					
	Pólen (n=8)	Alimento (n=8)	Abelhas nutrizes (n=40)	Abelhas Forrageiras (n=40)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=40)	Pólen (n=15)	Alimento (n=15)	Abelhas nutrizes (n=75)	Abelhas Forrageiras (n=75)	Resíduos (n=8)	Conteúdo Intestinal (n=15)
<b>Firmicutes</b>												
<i>Aerococcus viridans</i>	1											
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		1									2	
<i>Enterococcus gallinarum</i>											1	
<i>Enterococcus pallens</i>							1				2	
<i>Fructobacillus fructosus</i>	2		1		1			3		1		
<i>Fructobacillus tropaeoli</i>								1	2			
<i>Lactobacillus apis</i>		4		2	5	4						
<i>Lactobacillus mellis</i>	1		2	1								
<i>Lactobacillus kunkeii</i>		1		1			1	8	4	2	2	3
<b>Actinobacteria</b>												
<i>Bifidobacterium asteroides</i>		1		1				4	3	1		

O gênero *Lactobacillus* tem sido vastamente associado a *A. mellifera* (Olofsson & Vásquez, 2008; Endo et al., 2009; Vásquez et al., 2012; Endo & Salminen, 2013). No presente estudo, foi representado pelas espécies *L. apis*, *L. mellis* e *L. kunkeii*. As duas primeiras espécies foram observadas apenas nos Estados Unidos, *L. apis* em associação com alimento, abelhas forrageiras, resíduos das colmeias e conteúdo intestinal, ao passo que *L. mellis* foi observada no pólen, superfície de nutrízes e forrageiras. A espécie *L. kunkeii* foi observada no alimento e superfície de forrageiras nos Estados Unidos e todos os substratos no Brasil (Tabela 8).

As espécies *L. apis* (Killer, et al., 2014) e *L. mellis* (Olofsson et al., 2014) foram recentemente descritas, ambas isoladas do estômago de mel em *A. mellifera*. *Lactobacillus apis* apresentou ação inibitória frente aos patógenos *Paenibacillus larvae* e *Melissococcus plutonius*, causadores da Cria Pútrida Americana e Européia, respectivamente (Killer, et al., 2014). A espécie *L. kunkeii* é composta por diversas linhagens e é considerada a BAL frutofílica dominante na natureza, associada mundialmente a flores, frutos (Endo et al, 2009), espécies de abelhas solitárias (Vásquez et al., 2012) e sociais (Olofsson & Vásquez, 2008; Vásquez et al., 2012; Anderson et al, 2013). Estas três espécies estão normalmente presentes no estômago de mel destes insetos, como parte da microbiota das abelhas, sendo transmitidas deste para os demais substratos associados a *A. mellifera*, como evidenciado neste trabalho e em estudos anteriores (Olofsson & Vásquez, 2008; Vásquez et al., 2012; Anderson et al, 2013; Corby-Harris et al., 2014).

Bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* compreendem um grupo microbiano comensal presente nos intestinos de vários animais, incluindo mamíferos e insetos sociais (Ventura et al, 2012). Neste trabalho, este gênero foi representado pela espécie *B. asteroides*, observada no pão de abelhas e superfície de abelhas nutrízes e forrageiras, em ambos os ambientes. Assim como espécies do gênero *Lactobacillus*, *B. asteroides* foi citada por Olofsson & Vásquez (2008) como parte da microbiota do estômago de mel de *A. mellifera*. Foi isolada também de outros substratos associados a esta abelha, como néctar floral, mel, pólen corbicular, pão de abelhas e trato alimentar (Olofsson & Vásquez, 2008; Vázques et al., 2012; Anderson et al, 2013; Corby-Harris et al., 2014).

As espécies de bactérias do ácido láctico observadas em associação com *A. mellifera* neste trabalho, em sua maioria, compõem a microbiota do estômago de mel deste inseto, estrutura anatômica que representa a interseção entre o compartilhamento/armazenamento de alimentos e o ambiente de polinização (Corby-Harris et al., 2014). A partir do estômago de mel, os microorganismos do ambiente (provenientes do néctar, superfície florais e água) e endógenos desta região anatômica podem ser transmitidos para o mel, conteúdo intestinal e deste para os resíduos das colméias. Ainda, através de trocas trofaláticas, o conteúdo armazenado no estômago de mel pode ser transmitido para as abelhas mais jovens (nutrizes), destas para o pão de abelhas, crias, alcançando todos os substratos da colmeia, como evidenciado para a espécie *L. kunkeii* neste trabalho. Embora alguns autores sugiram que espécies de BAL sejam transientes, adquiridas no ambiente de polinização (Anderson et al., 2013), as abelhas as coletam e as mantêm em regiões anatômicas específicas, provavelmente pelo efeito benéfico que estas devem conferir a estes insetos.

### 5.2.2.2 Análise de diversidade de bactérias associadas a *A. mellifera*

A partir das mesmas 339 amostras de substratos em associação com *A. mellifera* (Brasil = 195 e Estados Unidos = 144) utilizadas para o isolamento de leveduras, o total de 283 bactérias (láticas e não láticas) foi isolado, correspondendo a 61 táxons. As curvas de acumulação de espécies dos substratos avaliados no Brasil (todos os substratos compilados) não estabilizou, assim como observado nas curvas de acumulação de espécies de leveduras, evidenciando mais uma vez que a amostragem não foi representativa do total de espécies possíveis neste local (Figura x, a). No entanto, a curva de acumulação de espécies de bactérias associadas a *A. mellifera* nos Estados Unidos atingiu a assíntota (formato de uma curva estabilizada, em que o valor do eixo y não muda, tornando a curva sempre paralela ao eixo x), mostrando que, virtualmente, todas as espécies de um hospedeiro já foram coletadas naquele país (Figura x, b).

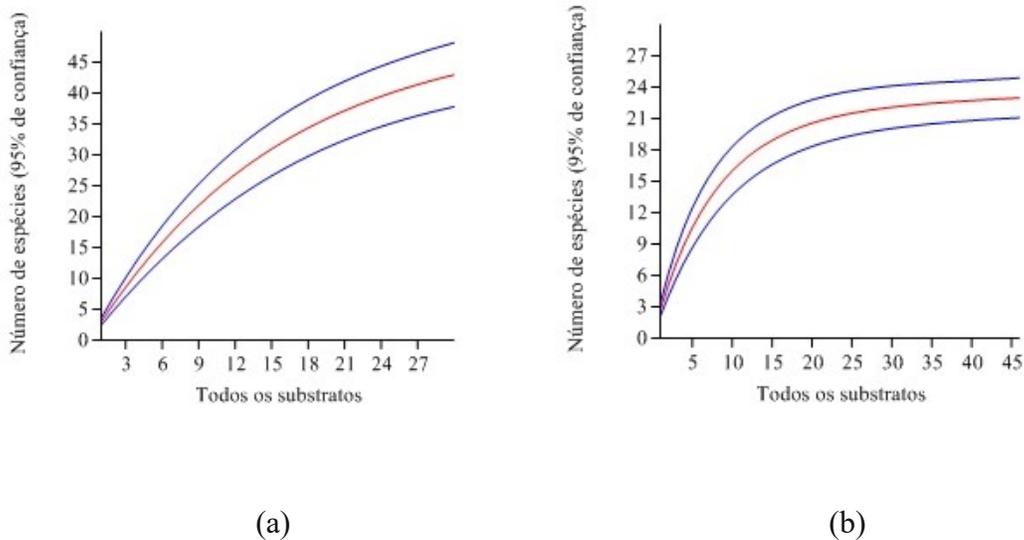


Figura 24. Curvas de acumulação de espécies de bactérias (linha central) no Brasil (a) e nos Estados Unidos (b), com intervalos de confiança de 95% (linhas externas), baseada em 1.000 repetições de *bootstrap*

O estimador de riqueza *Chao* foi também utilizado para a avaliação da riqueza de espécies de bactérias associadas a *A. mellifera* (Tabela 10).

Tabela 10. Valores observados e valores esperados de bactérias (láticas e não láticas), baseados no estimador de riqueza *Chao 2*, para todos os substratos associados a *A. mellifera* no Brasil e Estados Unidos.

Local	Nº observado de espécies	Estimador de riqueza <i>Chao 2</i>
Brasil	28	41,8 ± 7,5
Estados Unidos	45	22,6 ± 1,6

O estimador *Chao 2* indicou estimativas de riquezas de espécies superiores às observadas neste trabalho, para os substratos avaliados no Brasil. No entanto, a riqueza de espécies de bactérias observada nos substratos provenientes dos Estados Unidos mostrou-se superior aos valores esperados, o que corrobora o já observado pela curva de acumulação de bactérias, indicando que a riqueza de espécies de bactérias nos Estados Unidos foi totalmente acessada (Tabela 10).

Os resultados advindos deste trabalho evidenciam que um componente estrutural da colmeia, a própolis, é capaz de modular a função imune em *Apis mellifera*, alterando a expressão gênica de importantes moléculas efetoras da imunidade em abelhas. Tal como um componente da imunidade social, as comunidades de leveduras e bactérias associadas a este inseto foram inventariadas, o que vem a contribuir para o melhor entendimento das relações ecológicas existentes entre micro-organismos e abelhas.

## 6 CONCLUSÕES

- Os estímulos (desafios microbianos e injeção com solução salina) foram capazes de induzir uma resposta imunológica efetiva, caracterizada pela regulação positiva da expressão de peptídeos antimicrobianos (Hymenoptaecina, Abaecina, Apidaecina e Defensina 1), AmEater e Vitelogenina. Tanto nos ensaios conduzidos no Brasil como nos Estados Unidos, as abelhas desafiadas com suspensões de micro-organismos não apresentaram maior expressão de AMPs do que aquelas inoculadas com salina, indicando que os desafios induziram à uma resposta imune significativa, porém não específica.
- O período de dez horas após estimulação foi suficiente para a detecção de níveis mensuráveis de RNA mensageiro, codificadores destes peptídeos e proteínas.
- A própolis verde parece ter um papel modulador da resposta imune, evidente em abelhas americanas. Na condição inverno, a exposição de abelhas dos grupos controle à resina foi capaz de reduzir a expressão de *Hym* em todas as colmeias, de *Aba* em três das quatro colmeias e de *Api* e *Def1* em metade das colmeias, em relação aos grupos controle não expostos à própolis. Já no verão, a expressão de grupos controle expostos a própolis foi, em geral, induzida, provavelmente devido a atividade de forrageamento, que aumenta o contato da colmeia com micro-organismos provenientes do ambiente, aumentando por consequência a expressão dos genes avaliados.
- Não foi possível observar o mesmo efeito modulador da própolis verde sobre as abelhas provenientes do Brasil, provavelmente por não ter sido realizada a avaliação par a par nos tratamentos (com e sem à exposição à própolis) e pelo fato destas abelhas serem naturalmente expostas à própolis como componente da colmeia, neste caso não representando um estímulo novo a estes insetos.
- As leveduras observadas em associação aos substratos de *A. mellifera* parecem ter sido adquiridas do ambiente de forrageamento, como nectários e superfícies florais, caracterizando-se, em sua maioria, como microbiota transiente neste inseto.

- Assim como o observado para as leveduras, a comunidade de bactérias associadas a *A. mellifera* parece ter sido adquirida do ambiente de forrageamento, caracterizando-se também como microbiota transiente.
- As comunidades de leveduras e bactérias observadas no Brasil e nos Estados Unidos são diferentes. Apenas seis dos quarenta e cinco táxons de leveduras observados em *Apis* são comuns aos dois ambientes e apenas doze (oito não-láticas e quatro láticas) do total de sessenta e um táxons de bactérias foram observados no Brasil e Estados Unidos. Estes resultados sugerem que abelhas da mesma espécie apresentam sua microbiota composta em grande parte por espécies de micro-organismos presentes no ambiente no qual estão inseridas, refletindo comunidades de leveduras e bactérias distintas entre os dois ambientes.
- Foi possível observar duas prováveis espécies novas, uma levedura e uma bactéria, associadas a *A. mellifera*, evidenciando que abelhas são uma fonte rica para descoberta de novas espécies microbianas.

## 7 REFERÊNCIAS

- Aguirre, M. & Collins, M.D (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.*, 62: 473-477.
- Aizenberg-Gershtein, Y., Izhaki I., Halpern, M. (2013). Do Honeybees Shape the Bacterial Community Composition in Floral Nectar? *PLoS ONE*, 8 (7): e67556.
- Alippi, A.M. & Reynaldi, F.J. (2006). Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *J. Invertebr. Pathol.*, 91: 141–146
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schröder, K., Mikkelsen, O., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W. (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Geront.*, 39: 767–773.
- Anderson K.E., Sheehan, T.H., Mott, B.M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M.R., Walton, A., Jones, B.M., Corby-Harris, V. (2013). Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8(12): e83125.
- Audisio, C., Torres, M.J., Sabaté, D.C., Ibarguren, C., Apella, M.C. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol. Res.*, 166: 1-13
- Axelsson, L. (2005). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology in Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. (2005). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3<sup>a</sup> ed, New York: Marcel Dekker, Inc., 1-7.
- Barriga, E.J.C., Barahona, P.P., Tufiño, C., Bastidas, B., Guamán-Burneo, C., Freitas, L., Rosa, C.A (2014). An Overview of the Yeast Biodiversity in the Galápagos Islands and Other

- Ecuadorian Regions in Grillo, O (ed) (2014). *Biodiversity - The Dynamic Balance of the Planet*, 378p.
- Baruzzi, F., Cefola, M., Carito, A., Vanadia, S., Calabrese, C. (2012). Changes in Bacterial Composition of Zucchini Flowers Exposed to Refrigeration Temperatures. *Scientific World Journal*, ID 127805.
- Bastos, E.M.A.F., Santana, R.M., Calaça-Costa, A.G.F., Thiago, P.S. (2011). Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. *Braz. J. Biol.*, 71 (3): 727-734.
- Bastos, E.M.A.F., Simone, M., Jorge, D.M., Soares, A.E.S., Spivak, M. (2008). In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian and Minnesota, USA propolis against *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 97: 273–281.
- Bavykin, S.G., Yuri P., Lysov, Y.P.L., Zakhariyev, V., Kelly, J.J., Jackman, J., Stahl, D.A., Cherni, A. (2004). Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* Gene sequence Analysis To Determine Phylogenetic Relationships of *Bacillus cereus* Group Microorganisms. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (8): 3711–3730.
- Bazzo, R., Tappin, M.J., Pastore, A., Harvey, T.S., Carver, J.A., Campbell, I.D. (1988). The structure of melittin A <sup>1</sup>H-NMR study in methanol. *Eur. J. Biochem.*, 173: 139-146.
- Belisle, M., Peay, K.G., Fukami, T. (2012). Flowers as Islands: Spatial Distribution of Nectar-Inhabiting Microfungi among Plants of *Mimulus aurantiacus*, a Hummingbird-Pollinated Shrub. *Microbiol. Ecol.* 63:711–718
- Berry, C. (2012). The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *J. Invertebr. Pathol.*, 109: 1–10
- Boecking, O. & Spivak, M. (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30: 141–158

- Brandão, L.R., Libkind, D., Vaz, A.B.M, Santo, L.C.E., Moliné, M., García, V., Broock, M., Rosa, C.A. (2011). Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 76 (1): 1–13.
- Burri, R. (1947). Die Beziehungen der Bakterien zum Lebenszyklus der Honoigbiene. Schweinz. *Bienen-Ztg*, 70: 273-276 apud Gilliam, M. e Prest, D.B. (1987). Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 49: 70-75.
- Calaça, P.S.S.T. (2011). Aspectos da biologia de *Melipona quinquefasciata* Lepeletier (Mandaçaia do chão), características físico-químicas do mel, recursos alimentares e leveduras associadas. Universidade Federal de Ouro Preto, 109p. [Dissertação de Mestrado].
- Cano, R. J., Borucki, M.K., Higby-Schweitzer, M., Poinar, H.N., Poinar J.R,G.O., Pollard, K.J. (1994). *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (6): 2164-2167.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst P. (1989). Apidaecinas: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.*, 8 (8): 2387-2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.*, 187: 381 -386.
- Casteels, P., Christophe, A., Jacobs, F., Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that Is infection-inducible in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Biol. Chem.*, 268 (10): 7044-7054.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.*, 293: 28569-28575.

- Castella, G., Chapuisat, M., Moret, Y., Christe, P. (2008). The presence of conifer resin decreases the use of immune system in wood ants. *Ecol. Entomol.*, 33, 408-412.
- Chaimanee, V., Pettis, J.S., Chen, Y., Evans, J.D., Khongphinitbunjong, K., Chantawannakul, P. (2013). Susceptibility of four different honey bee species to *Nosema ceranae*. *Vet. Parasitol.*, 193: 260– 265.
- Chevtchik, V. (1950). Mikrobiologie pyloveho kvaseni. *Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk*, 323: 103-130 apud Gilliam, M. (1979) Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, 10: 43-53.
- Chouaia, B., Gaiarsa, S., Crotti, E., Comandatore, F., Esposti, M.D., Ricci, I., Alma, A., Favia, G., Bandi, C., Daffonchio, D. (2014). Acetic Acid Bacteria Genomes Reveal Functional Traits for Adaptation to Life in Insect Guts. *Genome Biol. Evol.*, 6(4): 912–920.
- Clarridge III, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, (4): 840–862.
- Coenye, T. & Vandamme, P. (2003). Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. *Microbiology*, 149: 3507–3517.
- Collins, M.D., Jones, D., Farrow, J.A.E., Kilpper-Bälz, R., Schleifer, K.H. (1984). *Enterococcus avium* nom.rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 220 –223.
- Corby-Harris V., Maes P., Anderson, K.E. (2014). The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers. *PLoS ONE*, 9(4): e95056.
- Cornman R.S., Lopez D., Evans J.D. (2013) Transcriptional Response of Honey Bee Larvae Infected with the Bacterial Pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE*, 8(6): e65424.

- Cotter, S.C. & Kilner, R.M. (2010). Personal immunity versus social immunity. *Behav. Ecol.*, 5 (5): 645–656.
- Cox, C.R. & Gilmore, M.S. (2007). Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infect. Immun.*, 75: 1565–1576.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Engelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, I. (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*, 318, 283-287.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Cur. Biol.*, 17: 693–702.
- Da Silva, P.I. Jr. (2000). Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 143p. [Tese de Doutorado].
- Daniel H.M., Rosa, C.A., São Thiago-Calaça, P.S., Antonini, Y., Basto, E.M., Evrard P., Huret, S., Fidalgo-Jiménez, A., Lachance, M.A. (2013) *Starmerella neotropicalis* f.a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63: 3896-903.
- Deletóile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., Arlet, G., Brisse, S. (2009). Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea agglomerans* Strains by Multilocus Gene Sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 47 (2): 300–310.
- Dillon, R.J. & Dillon, V.M. (2004). The Gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 49: 71–92.
- Endo, A. & Salminen, S. (2013). Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 36: 444-448.

- Ergin, Ç., Ilkit, M., Kaftanoglu, O. (2004). Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Mycoses*, 47: 431–434.
- Evans, J.D. & Wheller, D.E. (2000). Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol.*, 2 (1): research0001.1–0001.6.
- Evans, J.D. & Armstrong, T.N. (2005b). Inhibition of the American foulbrood bacterium, *Paenibacillus larvae larvae*, by bacteria isolated from honey bees. *J. Apicult. Res.*, 44(4): 168–171.
- Evans, J.D. & Armstrong, T-N (2005a). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology* 2006, 6:4.
- Evans, J.D. & Pettis, J.S. (2005). Colony-level effects of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. *Evolution*, 59: 2270–2274.
- Evans, J.D. (2006). Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J. Invertebr. Pathol.*, 93: 135–139.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J-L, Jiang, H., M. Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15 (5): 645-656.
- Evans, J.D. & Spivak, M. (2010) Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr Pathol*, 103: S62–S72.
- Fearnley J. (2001.) *Bee propolis: natural healing from the hive*, London:Souvenir Press, 180 p.
- Fonseca, A. & Inácio, J. (2006). Phylloplane Yeasts in Rosa, C., Péter, G. (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Berlin: Springer-Verlag, 461-484.
- Fontana, R., Mendes, M.A., Souza, B.M., Konno, K., César, L.M.C., Malaspina, O., Palma, M.S. (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 25: 919–928.

- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 103: S5–S9.
- Forsgren, E. & Laugen, A.T. (2014). Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie*, 45: 10–20.
- Free, J.B. (1980). *A organização social das abelha (Apis)*. São Paulo: Edusp, 13: 79p.
- Fridman, S., Izhaki, I., Gerchman, Y. Halpern, M., (2012). Bacterial communities in floral nectar. *Environ. Microbiol. Rep.*, 4 (1): 97–104.
- Fujita, T., Kozuka-Hata, H., Ao-Kondo, H., Kunieda. (2013). Proteomic analysis of the royal jelly and characterization of the functions of its derivation glands in the honeybee. *J. Proteome Res.* 12: 404–411.
- Fujiwara, S., Jiro, I., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashit, K. (1990). From the Biochemical Research A Potent Antibacterial Protein in Royal Jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.*, 265 (19): 11333-11337.
- Ganter, P.F. (2006). Yeast and Invertebrate Associations Ecosystems in Rosa, C., Péter, G. (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Berlin: Springer-Verlag, 303-370.
- Ghisalberti, E.L. (1979). Propolis: a review. *Bee world*, 60 (2): 59-84.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol*, 42: 611–643.
- Gilliam, M., Morton, H.L. (1974). Enterobacteriaceae isolated from honey bees *Apis mellifera*, treated with 2,4-D and antibiotics. *J. Invertebr. Pathol.*, 23: 25-42.
- Gilliam, M. (1979a) Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, 10, 43-53.
- Gilliam, M. (1979b) Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10: 269-274.
- Gilliam, M., Buchmann, S.L., Lorenz, B.J. (1985). Microbiology of the larval provisions of the stingless bee, *Trigona hypogea*, an obligate necrophage. *Biotropica*, 17 (1): 28-31.

- Gilliam, M., Prest, D.B. (1987) Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol*, 49: 70-75.
- Gilliam, M., Lorenz, B.J., Richardson, G.V. (1988). Digestive enzymes and micro-organisms in honey bees, *Apis mellifera*: influence of streptomycin, age, season and pollen. *Microbios*, 55: 95-114.
- Gilliam, M., Prest, D. B., Lorenz, B.J. (1989). Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie*, 20: 53-68.
- Gilliam, M., Tabber III, S. (1990). Diseases, pests, and normal microflora of honeybees, *Apis mellifera*, from feral colonies. *J. Invertebr. Pathol*, 58: 286-289.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Lett*, 155, 1-10.
- Goldman, D., Lee, S.C., Casadevall, A. (1994). Pathogenesis of Pulmonary *Cryptococcus neoformans* Infection in the Rat. *Infect. Immun.*, 62 (11): 4755-4761.
- Good, A.P., Gauthier, M.-P.L., Vannette, R.L., Fukami, T. (2014). Honey Bees Avoid Nectar Colonized by Three Bacterial Species, But Not by a Yeast Species, Isolated from the Bee Gut. *PLoS ONE*, 9 (1): e86494.
- Graaf, D.C, Dauwe, R., Walravens, K., Jacobs, F.J. (2002). Flow cytometric analysis of lectin-stained haemocytes of the honeybee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 33: 571–579.
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D. (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa mites* (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.*, 58(8): 1042-1049.
- Gregorio, E.D., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M., Lemaitre, B. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.*, 21 (11): 2568 – 2579.

- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001) PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.*, 4: 1–9.
- Herbiniere J., Braquart-Varnier, C., Grève, P., Strub, J.M., Frère, J., Van Dorsselaer, A., Martin, G. (2005). Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Dev. Comp. Immunol.*, 29: 489–499.
- Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006). The genome of a highly social insect, the honey bee. *Nature*, 443: 931-949.
- Hoyt, M. (1965). *The World of Bees*. New York: Coward McCann, Inc, 254p.
- Hultmark, D. (2003). *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol.*, 15:12-19.
- Imler, J.-C. (2014). Overview of *Drosophila* immunity: A historical perspective. *Dev. Comp. Immunol.*, 42: 3–15.
- Jacquemyn, H., Lenaerts, M., Brys, R., Willems, K., Honnay, O., Lievens, B. (2013). Among-Population Variation in Microbial Community Structure in the Floral Nectar of the Bee-Pollinated Forest Herb *Pulmonaria officinalis* L. *PLoS ONE*, 8 (3): e56917.
- Jefferson, J.M., Dolstad, H.A., Sivalingam, M.D., Snow, J.W. (2013). Barrier immune effectors are maintained during transition from nurse to forager in the honey bee. *PLoS ONE*, 8: e54097.
- Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S., Fudou, R. (2004). *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 2263–2267.
- Kacaniova, M., Chlebo, R., Kopernicky, M., Trakovicka, A. (2004). Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol.*, 49:169-171.
- Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends Microbiol.*, 17: 529–535.

- Killer, J., Dubná, S., Sedláček, J., Švec, P. (2014). *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64 (Pt 1):152-7.
- Kim, K.K., Lee, K.C., Lee, J.S. (2011). Reclassification of *Paenibacillus ginsengisoli* as a later heterotypic synonym of *Paenibacillus anaericanus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 2101–2106.
- Klaudiny, J., Albert, S., Bachanová, K., Kopernický, J., Simuth, J. (2005). Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 35: 11–22.
- Klunner, T., Preik-Steinhoff, H., Trenczek, T. (1994). Presentation and characterization of a possible binding factor for LPS in haemocyte membranes of *Galleria mellonella* and *Hyalophora cecropia*. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, 87: 284.
- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., Stehle, T., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.-M., Ferrandon, D., Rämetsch, M., Ezekowitz, R.A.B. (2005). Eater, a Transmembrane Protein Mediating Phagocytosis of Bacterial Pathogens in *Drosophila*. *Cell*, 123: 335–346.
- Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-71.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds) (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5<sup>th</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Science, vol. 1-3.
- Lachance, M.A., Bowles, J.M., Díaz, M.C.C., Janzen, D.H. (2001a). *Candida cleridarum*, *Candida tilneyi* and *Candida powelli*, three new yeast species isolated from insects associated with flowers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51:1201-1207.
- Lachance, M.A., Starmer, W.T., Rosa, C.A., Bowles, J.M., Barker, J.S.F. & Janzen, D.H. (2001b) Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Res.*, 1: 1-8.

- Lachance, M.A., Bowles, J.M., Starmer, W.T. (2003a). Geography and niche occupancy as determinants of yeast biodiversity: the yeast–insect–morning glory ecosystem of Kipuka Puauulu, Hawaii. *FEMS Yeast Res.* 4: 104–111.
- Lachance, M.A., J.M. Bowles and W.T. Starmer. (2003b). *Metschnikowia santaceciliae*, *Candida hawaiiiana*, and *Candida kipukae*, three new yeast species associated with insects of tropical morning glory. *FEMS Yeast Res.* 3: 97-103.
- Lachance, M.A., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J.W., Kurtzman, C.P. (2011a). *Candida* Berkhout (1923): *Candida oleophila* Montrocher (1967) in Kurtzman, C.P., Fell, J.W. e Boekhout, T. (eds) (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Science, 2: 1163.
- Lachance, M.A., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J.W., Kurtzman, C.P. (2011b). *Candida* Berkhout (1923): in Kurtzman, C.P., Fell, J.W. e Boekhout, T. (eds) (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Science, 2: 987-1278.
- Lachance, MA (2011c). *Metschnikowia* Kamienski (1899): *Metschnikowia reukaufii* Pitt & M.W. Miller (1968) in Kurtzman, C.P., Fell, J.W. e Boekhout, T. (eds) (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Science, 2: 611.
- Landell, M. (2006) Biodiversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos leveduriformes associados ao filoplano de bromélias no Parque de Itapuã-Viamão/RS. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 136p. [Dissertação de Mestrado].
- Lehrer, R.I. & Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.*, 11:23–27.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Ann. Rev. Immunol.*, 25: 697–743.

- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., Shao, Z. (2013). Phylogenetic Diversity of the *Bacillus pumilus* Group and the Marine Ecotype Revealed by Multilocus Sequence Analysis. *PLoS ONE*, 8(11): e80097.
- Lourenço, A.P. (2007). Genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas na resposta imune de *Apis mellifera*. Universidade Estadual de São Paulo. 182 p. [Tese de Doutorado].
- Marco Ventura, M., Turrone, F., Motherway, M.C., MacSharry, J., Sinderen, D. (2012). Host-microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. *Trends Microbiol.*, 20 (10): 467-476.
- Melo, W.G.P (2009). Distribuição Biogeográfica de Leveduras Associadas a exsudados de *Calophyllum brasiliense* (CLUSIACEAE), em áreas de ecótono da planície do Araguaia – TO. Universidade Federal do Tocantins, 86p. [Dissertação de Mestrado].
- Melo, W.G.P., Arcuri, S.L., Rodrigues, A., Morais, P.B., Meirelles, L.A., Pagnocca, F.C. (2014). *Starmerella aceti* f.a., sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant *Acromyrmex balzani*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64: 1428–1433.
- Michener, C. D. (2000). *Bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, p. 9.
- Mohr, K.I. & Tebbe, C.C. (2006) Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environ. Microbiol.*, 8: 258–272.
- Morais, P.B., Pagnocca, F.C., Rosa, C.A. (2006). Yeast Communities in Tropical Rain Forests in Brazil and other South American Ecosystems in Rosa, C., Péter, G. (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Berlin: Springer-Verlag, 461-484.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. (2000). Survival for immunity: the price of immune system activation for Bumblebee workers. *Science*, 290: 1166-1168.
- Munch, D. & Amdam, G.V. (2010). The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Lett.*, 584: 2496-2503.

- Nakamura, J. & Seeley, T.D (2006). The functional organization of resin work in honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 60: 339-349.
- Olaitan, P.B., Adeleke, O.E., Ola, I.O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7(3): 159-165.
- Olofsson, T.C. & Vásquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol.*, 57: 356-363.
- Olofsson, T.C., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, E., Vásquez, A. (2014). *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov., and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Int J Syst Evol Microbiol.* (doi: 10.1099/ij.s.0.059600-0-Epub ahead of print).
- Pain, J. & Maugenet, J. (1966). Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. *Ann. Abeille*, 9:209-236 apud Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol. Let.*, 155: 1-10.
- Pimentel, M.R.C., Antonini, Y., Martins, R.P., Lachance, M.A., Rosa, C.A. (2005) *Candida riodecencis* and *Candida cellae*, two new yeast species from *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Research*, 5, 875-879.
- Piulachs, M.D, Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.L.P., Bellés, X. (2003). The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(4): 459–465.
- Piulachs, M.D., Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simões, Z.L.P. , Bellés, X. (2003). The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect. Biochem. Mol. Biol*, 33: 459–465.

- Pozo, M.I., Herrera, C.M., Bazaga, P. (2011). Species richness of yeast communities in floral nectar of Southern Spanish Plants. *Microb. Ecol.*, 61: 82-91.
- Rada, V., Máchová, M., Huk, J., Marounek, M., Duskova, B. (1997). Microflora in the honeybee digestive tract: count, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie*, 28: 357-365.
- Raffiudin, R. & Crozier, R.H. (2007). Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 43:543–552.
- Resende, V.M.F., Vasilj, A., Santos K.S., Palma, M.S., Shevchenko, A. (2013). Proteome and phosphoproteome of Africanized and European honeybee venoms. *Proteomics*, 13: 2638–2648.
- Rosa, C.A. & Lachance, M.A. (1998). The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 1413–1417.
- Rosa, C.A., Viana, E., Martins, R.P., Antonini, Y. & Lachance, M.A. (1999) *Candida batistae*, a new yeast species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia*, 91: 428-433.
- Rosa, C.A., Lachance, M.A., Silva, J.O.C., Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Antonini, Y. & Martins, R.P. (2003) Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4: 271-275.
- Rosa, C.A. & Lachance, M.A. (2005) *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Lundiana*, 6 (supplement): 27-29.
- Rothenbuhler, W.C. (1964). Resistance to American Foulbrood in honey bees: I. differential survival of larvae of different genetic lines. *Am. Zool.*, 4: 111-123.

- Sabaté, D.C, Carrillo, L., Audisio, M.C (2009). Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Res. Microbiol.*, 160: 193e199.
- Saksinchai, S., Suzuki, M. Chantawannakul, P., Ohkuma, M., Lumyong, S. (2012). A novel ascosporegenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. *Fungal Divers.*, 52:123–139.
- Sampaio, J.P. (2011a). *Rhodotorula* Harrison (1928): *Rhodotorula acheniorum* (Buhagiar & J.A. Barnett) Rodrigues de Miranda (1975) in Kurtzman, C.P., Fell, J.W. e Boekhout, T (eds) (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Science, 3: 1885.
- Sampaio, J.P. (2011b). *Rhodotorula* Harrison (1928): *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorgensen) F.C. Harrison (1928) in Kurtzman, C.P., Fell, J.W. e Boekhout, T (eds) (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Science, 3: 1873-1928.
- Samuni-Blank, M., Izhaki, I., Laviad, S., Bar-Massada, A., Gerchman, Y., Halpern, N. (2014) The Role of Abiotic Environmental Conditions and Herbivory in Shaping Bacterial Community Composition in Floral Nectar. *PLoS ONE*, 9(6): e99107.
- Santos, F.A., Bastos, E.M.A.F., Moreira, E.S. (2003). Brazilian Propolis: Physicochemical Properties, Plant Origin and Antibacterial Activity on periodontopathogens. *Phytother. Res.*, 17: 285-289.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Consortium, F.B. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*, 109 (16): 6241-6246.
- Schwarz, R.S., & Evans, J.D. (2013). Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Dev. Comp. Immunol.*, 40: 300–310
- Siede, R., Meixner, M.D., Ralph Bächler, R. (2012). Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee. *J. Apicult. Res.*, 51(4): 320-328.

- Silva-Filho, E.A., Santos, S.K.B., Resende, A.M., Morais, J.O.F., Morais Jr, M.A., Simões, D.A. (2005). Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88:13–23
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Belo Horizonte. Depósito Legal na Biblioteca Nacional, 253 p.
- Simone, M., Evans, J.D., Spivak, M. (2009). Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*, 63 (11): 3016–3022.
- Simone-Finstrom, M. & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41: 295–311.
- Simone-Finstrom, M.D. & Spivak, M. (2012). Increased Resin Collection after Parasite Challenge: A Case of Self-Medication in Honey Bees? *PLoS ONE*, 7(3): e34601.
- Snowdon, J.A. & Cliver, D. (1996). Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiol.*, 31: 1-26.
- Spivak, M. & Reuter, G.S. (2001). *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies select of hygienic behavior. *J. Econ. Entomol.*, 94: 326-331.
- Spivak, M., Masterman, R., Ross, R., Mesce, K.A. (2003). Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *J. Neurobiol.*, 55: 341–354.
- Starks, P.T., Blackie, C.A., Seeley, T.D. (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, 87(5): 229-31.
- Statzell-Tallman, A., Belloch, C., Fell, J.W. (2008). *Kwoniella mangroviensis* gen. nov., sp.nov. (Tremellales, Basidiomycota), a teleomorphic yeast from mangrove habitats in the Florida Everglades and Bahamas. *FEMS Yeast Res.*, 8 (1): 103-13.
- Sudhadham, M., Sihanonth, P., Sivichai, S., Chaiyarat, R., Dorrestein. G.M., Menken, S.B.J, Hoog, G.S. (2008). The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. *Stud. Mycol.*, 61: 145–155.

- Sugita, T., Takashima, M., Hamaroto, M., Budhaka, P., Nakase, T. (1997). *Bensingtonia sakaguchii* sp. nov. isolated from a leaf of *Bischofia javanica* in the Ogasawara Islands. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43: 231-235.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. (2013). MEGAS 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30:2725-2729.
- Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Nicoli, J.R., Antonini, Y., Martins, R.P., Lachance, M., Rosa, C.A. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 339-343.
- Togawa, R.C. and Brigido, M.M. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis in *1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology* - IcoBiCoBi 14th to 16th May 2003. Ribeirão Preto.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (ed) (2005). Procarotos: Domínios Bacteria e Archea in *Microbiologia*, 8<sup>a</sup> ed, Artmed: Porto Alegre, 304-320.
- Trindade, R.C., Resende, M.A., Silva, C.M., Rosa, C.A. (2002). Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Syst Appl Microbiol.*, 25 (2): 294-300.
- Vaishampayan, P., Miyashita, M., Ohnishi, A., Satomi, M., Rooney, A., Duc, M.T.L., Venkateswaran, K. (2009). Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura et al. 2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59: 1094–1099.
- Vannette RL, Gauthier M-PL, Fukami T. (2013). Nectar bacteria, but not yeast, weaken a plant–pollinator mutualism. *Proc. R. Soc. B.*, 280: 20122601.
- Vásquez, A., Forsgen, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T.C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, 7 (3): e33188.

- Vojvodic, S., Rehan, S.M., Anderson, K.E. (2013) Microbial Gut Diversity of Africanized and European Honey Bee Larval Instars. *PLoS ONE*, 8(8): e72106.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697–703.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N.H., Starks, P.T. (2009). Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annu. Rev. Entomol*, 54:405–23.
- Winston, M.L. (1987). The biology of honey bee. Harvard University Press, Cambridge apud Lourenço, A.P. (2007). Genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas na resposta imune de *Apis mellifera*. Universidade Estadual de São Paulo. 182 p. [Tese de Doutorado].