

PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE *Paenibacillus larvae*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis* e *Ascosphaera apis* EM AMOSTRAS DE MEL DO ESTADO DE SANTA CATARINA: DADOS PRELIMINARES.¹

Cleiciane Rita², Carina Ana Baretta³, Denise Nunes Araujo⁴.

¹ Vinculado ao projeto “Prevalência e identificação de *Paenibacillus larvae*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis* e *Ascosphaera apis* em amostras de mel do estado de Santa Catarina.”

² Acadêmico (a) do Curso de Zootecnia – CEO – Bolsista PROBIC/UDESC

³ Acadêmica do Curso de Zootecnia – CEO – Bolsista PET

⁴ Orientadora, Departamento de Zootecnia – CEO – Denise.araujo@udesc.com

Com a devastação das florestas em progresso, o uso de agrotóxicos e a queima discriminada, a apicultura brasileira enfrenta diversos problemas futuros, fato este que culminou com a entrada das abelhas para a lista de extinção. As abelhas são insetos essenciais no processo de polinização dos nossos alimentos portanto de extrema importância para a manutenção da vida humana, principalmente nos cultivos de maçã, eucalipto, laranja, café, guaraná, caju, dentre outros. Além destes fatores que ameaçam a extinção destes insetos, outra ameaça de igual importância são as doenças que acometem os enxames a citar *Paenibacillus larvae*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis* e *Ascosphaera apis*. O objetivo desse estudo foi identificar as doenças nas abelhas por meio da técnica *multiplex* de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Para o presente estudo houve a necessidade de estabelecer o controle positivo para a contraprova da presença ou ausência de doenças; para tal, foram avaliadas abelhas de enxame com diagnóstico prévio de *Nosema apis* para realizar a extração de DNA. A extração do DNA foi realizada em um segmento da abelha (tórax ou abdômen), adicionando em 500µl da solução de CTAB junto com 2µl de Mercaptoetanol, em seguida foi feito a homogeneização do material e colocado em banho-maria entre 55 e 65°C por um período de 14 a 16 horas (*overnight*). Após, foi realizado a centrifugação em microcentrifuga da marca *Eppendorf* a 14000 rpm por um minuto a 4°C, para a separação entre o resíduo e o tecido. O material separado foi transferido e em seguida foi adicionado uma fração de 250µl de fenol, 240µl de clorofórmio e 10µl de álcool isopropílico, a seguir foi centrifugado a 14000 rpm por cinco minutos a 4°C. Retirou-se o líquido sobrenadante e adicionou-se 500µl de álcool isopropílico, centrifugado novamente a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. Por fim, após retirar o líquido foi adicionado álcool 70% e centrifugado a 14000 rpm por três minutos, retirando o álcool através da inversão para a evaporação; por fim, foi adicionado 100µl de água ultrapura. Para a confirmação

do produto de extração, foi realizada a confirmação em gel de agarose a 0,8% com a adição de 5 µl de brometo de etídeo em buffer de TBE 1X (89mM Tris base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA). Foram pipetados 10µl da solução extraída junto com 1µl de *Blue Juice* 10X (Figura 1A). A corrida ocorreu durante aproximadamente 40 minutos a 120 volts; também foram pipetados 5µl de *ladder* (padrão) de 1kb para a identificação do tamanho do fragmento obtido. Ao final da corrida, foi realizada a captura de imagem digitalizada em transiluminador da marca Loccus Biotecnologia confirmando o sucesso da extração (Figura 1B). O DNA extraído foi submetido a reação de PCR utilizando um volume de 20µl composto por 10µL de PCR Supermix Invitrogen, 5µL de DNase, 1µL de amostra de DNA e 1µL de cada primer (*N. apis*). O PCR foi conduzido de acordo com a metodologia de Puker (2011), com os seguintes ciclos de desnaturação inicial de 94°C por 2min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, 58° por 30s e 72°C por 1min, e por fim a extensão final a 72°C por 5min. Cinco microlitros da reação de PCR foram submetidos a eletroforese de gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo, em buffer TBE 1X) e fotografados em transiluminador. Um marcador de 100pb foi utilizado para determinar o tamanho do fragmento. Não foram obtidos resultados positivos, mesmo com a identificação positiva da doença nas amostras utilizadas. Serão necessários novos testes para a obtenção do controle positivo para *Nosema apis*, para a condução dos testes via PCR.

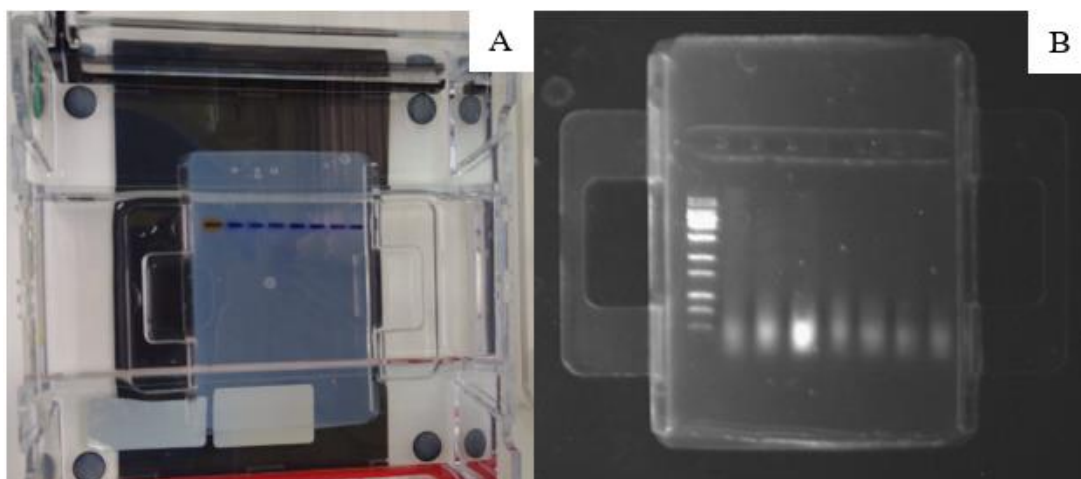


Figura 1. Placa de gel de agarose com o preenchimento dos poços com a extração de DNA (A); gel de agarose após corrida da extração com a sinalização da presença de DNA (B).