



XIX CONGRESSO DE ZOOTECNIA

DIVERSIDADE NA PRODUÇÃO

Escola Superior Agrária
Instituto Politécnico de Viana do Castelo

16 – 18 ABRIL
2015

LIVRO DE ATAS



Instituto Politécnico de Viana do Castelo

Escola Superior
Agrária

**XIX CONGRESSO DE ZOOTECNIA
“DIVERSIDADE NA PRODUÇÃO”**

Ponte de Lima – 16 a 18 de abril de 2015

Livro de Atas

Edição: Associação Portuguesa de Engenheiros Zootécnicos

Edição Literária: José Pedro Pinto de Araújo

Joaquim Orlando Lima Cerqueira

Júlio César Oliveira Lopes



O Conteúdo desta publicação foi revisto pelos membros da Comissão Científica:

Alfredo Teixeira (ESA-IPB)	Jorge Oliveira (ESA-IPV)
Ana Sofia Santos (ECAV-UTAD)	José Carlos Almeida (ECAV-UTAD)
Antonio Iglesias (IBADER-USC)	José Manuel Lorenzo (CETECA)
António Mira (ICBAS-UP)	José Pedro Araújo (ESA-IPVC)
António Moitinho (ESA-IPCB)	Júlio Carvalheira (ICBAS-UP)
César Resch Zafra (CIAM)	Luísa Valente (ICBAS-UP)
Divanildo Outor Monteiro (ECAV-UTAD)	Nuno Carolino (INIAV, IP)
Fernando Delgado (ESA-IPC)	Paulo Rema (ECAV-UTAD)
Joaquim Lima Cerqueira (ESA-IPVC)	Vasco Cadavez (ESA-IPB)

Editor: Associação Portuguesa de Engenheiros Zootécnicos

Editores Literários: José Pedro Pinto de Araújo

Joaquim Orlando Lima Cerqueira

Júlio César Oliveira Lopes

Montagem: Júlio César Oliveira Lopes

ISBN: 978-989-96219-6-1 (Versão eletrónica em PDF)

Abril, 2015

CONTRIBUTO PARA O PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS FUNGICAS DA CRIAÇÃO DE ABELHAS MELÍFERAS

Pires^{1,2}, S., Durão², L., Karolos³, D., Vasilios³, P., Cadavez^{1,2}, V., Rodrigues^{1,2}, P.

¹Centro de Investigação de Montanha (CIMO) / ²Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal;

spires@ipb.pt;

³Technological Educational Institute of Larissa, Thessaly, Greece;

INTRODUÇÃO

Entre as várias doenças que podem afetar as colónias de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.), algumas são mais restritas à criação, outras podem lesar mais as abelhas adultas e, existem ainda, doenças que são comuns a ambas. A ascosferiose, causada por fungos (*Ascosphaera spp.*), é a doença fúngica mais frequente associada à criação de abelhas e já descrita em todos os países do mundo (Aronstein and Murray, 2010, Palacio, *et. al.* 2007). Em Portugal, é uma das doenças presentes, de forma endémica, nos últimos anos (pelo menos desde 2005) [Pires, 2008; Pires, *et. al.* 2009; DGAV, 2014]. Contrariamente, a Aspergilose, doença comum à criação e às abelhas adultas, causada por fungos do género *Aspergillus*, tais como, *Aspergillus flavus* e/ou *Aspergillus fumigatus* é raramente observada e ainda não está desvendado o seu impacto ao nível das colónias, consequentemente, é menosprezada e considerada de menor relevância económica para o setor apícola (Bailey, 1968, Gilliam and Vandenberg, 1988). Provavelmente por esta razão existem poucos relatos documentados focalizados sobre os aspetos epidemiológicos desta doença a nível mundial. A nível nacional, aparentemente também não são conhecidos estudos e, salienta-se a, não existência de dados sobre a sua presença (DGAV, 2014). Assim, este estudo pretende ser um contributo para a identificação, caracterização epidemiológica e etiopatogénica das doenças fúngicas da criação em Portugal.

MATERIAL E MÉTODOS

No Laboratório de Patologia Apícola da Escola Superior Agrária de Bragança (LPAESAB), homologado pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) desde o ano civil de 2006 para a realização do rastreio sanitário apícola a nível nacional, foram analisadas um total de 1009 amostras de criação. O estudo incidiu sobre as amostras de criação recolhidas por diferentes Associações e Cooperativas de Apicultores no ano civil de 2013, no âmbito do Programa Apícola Nacional vigente. As amostras correspondem a porções de favo contendo crias de abelhas (criação aberta e operculada), com dimensões ideais de 12cmX12cm, recolhidas de acordo com as normas elaboradas pela autoridade sanitária veterinária nacional.

A técnica de rotina utilizada no laboratório LPAESAB para o diagnóstico de ascosferiose, baseou-se na observação macroscópica da amostra, em condições de assepsia, com contagem (da criação afetada e sã, de ambos os lados da porção de favo) e identificação das larvas, pré-pupas e pupas afetadas que apresentam uma coloração branca ou cinza-escuro e aspeto mumificado (rígidas e secas) e posterior preparação microscópica para visualização dos ascocistos e esporos. De entre as amostras analisadas no LPAESAB, foram seleccionadas 19 amostras com diagnóstico positivo para Ascosferiose e 4 amostras com diagnóstico negativo. De cada amostra foram recolhidas 10 a 20 larvas (dependendo do número de larvas disponíveis), num total de 430 (152 larvas doentes e 278 aparentemente sãs). As larvas foram semeadas isoladamente em placa de Petri de 6 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0,1% de cloranfenicol, e incubadas a 30 °C durante 3 a 5 dias. Os fungos pertencentes aos géneros *Ascosphaera*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram isolados e identificados ao nível morfológico e molecular segundo métodos descritos (Aronstein & Murray, 2010; Rodrigues *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2012). A identificação morfológica baseou-se na observação microscópica das estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos. A identificação molecular dos isolados de *Ascosphaera* foi feita com base na amplificação e sequenciação do locus Scaffold300 (Jensen *et al.*, 2012) e a identificação dos isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* foi feita por amplificação e sequenciação da região ITS ou do gene da calmodulina (Rodrigues *et. al.*, 2011). Os isolados

de *Ascosphaera* spp. foram ainda classificados quanto ao grupo de compatibilidade vegetativa (*mating-type*) por cruzamento com as estirpes de referência ARSE7405 (MT+) e ARSEF7406 (MT-).

A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS (1995), mediante o Teste de Kruskal-Wallis e o nível de significância foi calculado mediante o Teste de Fisher.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização das análises anatomopatológicas, verificou-se que a maior percentagem de amostras correspondeu a resultados negativos (89,7%). As taxas de prevalência de ascosferiose mostram-se relativamente baixas (a taxa média mais elevada foi de 18,8%) nos apiários do território continental. Porém, os resultados deste estudo permitem ainda afirmar que esta infeção fúngica está presente em praticamente todos os distritos analisados no ano civil de 2013, exceto Évora, Guarda, Setúbal e Castelo Branco, nos quais pode estar subestimada devido ao baixo número de amostras recebidas e analisadas. A maior percentagem de casos positivos verifica-se nos distritos de Viseu (18,8%) e Coimbra (16,6%), embora em Aveiro, Vila Real se tenham obtido resultados semelhantes ($P \geq 0,05$). Contrariamente, a menor taxa de prevalência de ascosferiose regista-se ($P < 0,05$) nos distritos de Leiria, Santarém e Bragança (Quadro1). Estes resultados corroboram os obtidos em estudos anteriores, nos quais se constatou a presença desta doença em Portugal (Pires, 2008; Pires, *et al.* 2009; DGAV, 2014] e, indiciam aparentemente, um aumento do número de casos positivos nos últimos anos.

A análise do Quadro 2 permite constatar que a percentagem média de casos positivos detetados no LPAESAB revelou a presença desta infeção fúngica em todas as estações do ano. No entanto, deve-se salientar que, surpreendentemente, a prevalência mais elevada ($P < 0,05$) de casos positivos ocorreu no verão (14,9%) e que a menor prevalência ocorreu no inverno (6,0%). Estes dados sugerem que o verão foi uma das estações mais críticas, o que poderá ser associado, em parte, ao facto de, neste ano em concreto, esta ter sido uma estação muito atípica em termos de temperaturas. Consequentemente, algum stress térmico provocado pelo arrefecimento da criação poderá ter predisposto ao aparecimento da ascosferiose em alguns apiários da área em estudo. Contrariamente, a menor taxa de prevalência verificada no inverno pode estar associada ao facto de que, nesta estação, devido às baixas temperaturas, existe pouca criação nas colmeias/apiários de vários distritos do país. Paralelamente, revela alguma inadequação no planeamento de ações sanitárias (nomeadamente, colheita de amostras), devido a que, nesta estação do ano devemos evitar abrir as colmeias para prevenir, por exemplo, a predisposição da colónia para fatores de stress, respeitando assim, a temperatura de conforto térmico das abelhas adultas e da criação, quando existente.

Das 24 amostras analisadas por métodos culturais, apenas foram isolados fungos de larvas provenientes de amostras previamente diagnosticadas com ascosferiose, num total de 51 isolados de *Ascosphaera* e 5 *Aspergillus* (Quadro 3). Destes, 18 *Ascosphaera* e 2 *Aspergillus* resultaram da cultura de larvas aparentemente sãs. Todos os isolados do género *Ascosphaera* foram identificados como pertencendo à espécie patogénica *A. apis*. Apesar de as larvas analisadas não apresentarem sintomas de Aspergilose, foram isolados 4 *Aspergillus flavus*, o que confirma a existência deste fungo como contaminante de larvas, e portanto potencial causador de Aspergilose na criação.

A ascosferiose continua a ser uma das doenças da criação de abelhas que causa maior preocupação ao nível regional e nacional. As taxas de prevalência de ascosferiose mostram-se relativamente baixas. Porém, esta doença está presente em alguns apiários existentes em praticamente todos os distritos do território continental e foi constatada em todas as estações do ano. A aplicação de métodos culturais a algumas amostras permitiu validar a identificação da espécie *Ascosphaera apis* como a única patogénica para a criação e permitiu a identificação de quatro *Aspergillus flavus* e um *Aspergillus fumigatus*, confirmando a existência deste fungo como contaminante de larvas e, provavelmente, como um potencial causador de aspergilose na criação. O facto de a aspergilose ser uma infeção fúngica raramente observada e não ter sido confirmada como uma das doenças presentes em Portugal pode, eventualmente, originar a subestimação do seu diagnóstico, embora outras hipóteses possam ser formuladas, o que justifica a continuidade destes estudos.

Referências bibliográficas

- Aronstein, K.A.; Murray, K.D., 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr Pathol*, 103: 520-529.
- Associação de Apicultores da Região de Leiria, 2010. <http://www.aarleiria.com/> Consultado em 05-02-2015.
- Bailey, L. 1968. Honey bee pathology. *Annu Rev Entomol*, 13: 191-200.
- Gilliam, M.; Vandenberg, J.D. (1997). Fungi. In: *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*.
- Jensen AB, Welker DL, Kryger P, James RR, 2012. Polymorphic DNA sequences of the fungal honey bee pathogen *Ascosphaera apis*. *FEMS Microbiology Letters* 330: 17-22
- Morse, R.A., Flottum, k. (Eds.), Cornell University Press, Ithaca, New York, U.S. 81-110pp.
- Palacio, M.A.; Peña, N.; Clement ;G.; Ruffinengo, S.; Escande, A., 2007. Short communication. Viability and pathogenicity of *Ascosphaera apis* preserved integral rice cultures. *Spanish J Apicult Res*, 5 (4) 481-489.
- Pires, S., 2008 - Sanidade apícola – diagnóstico de patologias apícolas. *O Apicultor Revista de Apicultura*, Nº 61 Julho/Setembro 2008, 9-10. ISSN: 0873-2981.
- Pires, Sância; Almeida, Armandina; Cadavez, Vasco; Valério, Maria José 2009 - Incidência das principais doenças de criação das abelhas melíferas no Nordeste Transmontano. In XVIII Congresso de Zootecnia e II Congresso Ibero-Americano de Zootecnia. Vila Real: UTAD, p. 379-381. ISBN 978-989-96219-1-6.
- GPP e MADRAP, 2010, Programa Apícola Nacional Triénio de 2011-2013, 2010. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Regional e das Pescas, Gabinete de Planeamento e Políticas, Lisboa, Portugal, 103.
- DGAV 2014, Programa Sanitário Apícola 2014. Ministério da Agricultura e do Mar, Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), Lisboa, Portugal, 14.
- Rodrigues P, Santos C, Venâncio A, LIMA N, 2011. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied Microbiology* 111: 877-892
- SAS Institute Inc., 1995. Users Guide, Version 6, Third Edition, Cary, NC. 582.

Quadro 1. Percentagem (%) de amostras positivas obtidas por distrito no ano civil de 2013

Distritos	Ascosferiose		
	N	(%)	n
Aveiro	64	15,6a	10
Braga	5	0,0	0
Bragança	376	8,0b	30
Coimbra	124	16,9a	21
Évora	5	0,0	0
Guarda	4	0,0	0
Leiria	124	6,5bc	8
Porto	10	10,0ac	1
Santarém	88	6,8b	6
Setúbal	1	0,0	0
Vila Real	175	12,6a	22
Viseu	32	18,8a	6
Castelo Branco	1	0,0	0

N, número total de amostras de criação analisadas. n, número de amostras positivas
a,b,c Na mesma coluna valores com diferentes anotações são significativamente diferentes (P<0,05).

Quadro 2. Percentagem (%) de amostras positivas obtidas entre as várias estações do ano

Estação do ano	Ascosteriose		
	N	(%)	n
Primavera	297	7,4bc	22
Verão	295	14,9a	44
Outono	218	11,9ac	26
Inverno	199	6,0b	12

N, número total de amostras de criação analisadas. n, número de amostras positivas
a,b,c Na mesma coluna valores com diferentes anotações são significativamente diferentes (P<0,05).

Quadro 3. Fungos isolados de amostras com diagnóstico positivo para Ascosteriose.

Espécie	# isolados	Estado sanitário da		“Mating-type”	
		Doente	Sã	+	-
<i>Ascosphaera apis</i>	51	33 (65%)	18 (35%)	33 (65%)	18 (35%)
<i>Aspergillus flavus</i>	4	2 (50%)	2 (50%)	n.a.	n.a.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1 (100%)	0 (0%)	n.a.	n.a.

CONTRIBUTION TO THE EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF MAIN HONEY BEE BROOD FUNGAL DISEASES

Abstract: The aim of this study was to determine the etiopathology and epidemiology of the honey bee brood diseases in Portugal. Honey bee brood samples were collected and analysed at the Laboratory of Honey Bee Pathology (LPAESAB) and Microbiology of IPB. Samples were processed for epidemiological characterization of fungal diseases of honey bee brood. In general, the prevalence of this fungal disease occurs along all the districts and seasons of the country. The diagnosis of chalkbrood were higher (P<0,05) during summer than in the winter. The chalkbrood is the major fungal diseases of the honey bee brood presenting the higher concerns at regional and national level. *Ascosphaera apis* has been isolated from dry mummies analyzed by cultural methods, validating the diagnostic methodology previously used. Besides *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* has been isolated too from dry mummies, but there is still much that remains to be discovered in order to understanding chalkbrood and stonebrood epidemiology and etiopathology that will lead to improve management strategies of these diseases.

Keywords: honey bee pathology, *chalkbrood*, *fungal diseases*, *stonebrood*