



3º RELATÓRIO ANUAL DE EXECUÇÃO DO PROJETO MITE

MITE- Varroa e vírus transmitidos: MonItorização
de muTações e dEenvolvimento de ferramentas
moleculares inovadoras

PROGRAMA APÍCOLA NACIONAL 2023-2027

Julho de 2025

Dora Henriques
dorasmh@ipb.pt

1. NOTA INTRODUTÓRIA

O projeto MITE (MITE- Varroa e vírus transmitidos: MonItorização de muTações e dEenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras) recebeu aprovação final no dia 16 de junho de 2023.

A entidade proponente deste projeto é a FENAPÍCOLA – Federação Nacional de Cooperativas Apícolas e de Produtores de Mel, FCRL e as entidades participantes são o Instituto Politécnico de Bragança e o Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (Espanha) que colabora intelectualmente no MITE, sem, no entanto, um orçamento atribuído. A coordenação da componente técnico-científica e interligação com as entidades participantes será da responsabilidade de Dora Henriques, coadjuvada por M. Alice Pinto (Instituto Politécnico de Bragança).

Em Portugal, à semelhança do resto da Europa, a varroose é considerada uma doença endémica, responsável por inúmeros prejuízos à apicultura (DGAV, 2022). Para apoiar os apicultores foi criado um programa sanitário apícola, onde se estabelecem medidas de sanidade veterinária para a defesa contra as doenças das abelhas, existindo uma seção apenas direcionada para a varroose designada por “plano de luta contra a varroose”.

A forma mais eficaz de controlar a varroa é através do uso de acaricidas sejam eles sintéticos ou orgânicos (e.g., à base de timol ou ácido oxálico). Os acaricidas sintéticos podem ser piretróides (tau-fluvalinato e flumetrina), formamidinas (amitraz) ou organofosfatos (cumafos) (Noël et al., 2020). Em Portugal não há nenhum medicamento homologado para tratamento da varroose que tenha como base o cumafos. A utilização intensiva e repetida dos acaricidas sintéticos tem levado ao aparecimento de resistências um pouco por todo o mundo (Mitton et al., 2022a). Existem vários mecanismos de resistência que podem estar relacionados com alterações no local de ação ou na quantidade de acaricida que chega ao local de ação através de mudanças na penetração, ativação ou destoxificação do composto (Vlogiannitis et al., 2021). A base molecular de alguns dos mecanismos de resistência da varroa aos piretróides (Benito-Murcia et al., 2022; González-Cabrera et al., 2013, 2016, 2018) e ao amitraz (Hernández-Rodríguez et al., 2021) foi descrita recentemente. Com base neste novo conhecimento, foram desenvolvidas ferramentas moleculares que permitem identificar a presença das mutações associadas à resistência, ou seja, verificar se determinada população de varroa é ou não resistente (González-Cabrera et al., 2016; Hernández-Rodríguez et al., 2021; Millán-Leiva et al., 2018). Essas ferramentas moleculares têm como base o assay TaqMan, uma técnica otimizada para estudar poucos variantes (SNPs) em muitos indivíduos (González-Cabrera et al., 2016). Foi também desenvolvida uma ferramenta de diagnóstico que tem como base a técnica PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Restrição de Fragmentos de DNA) (Millán-Leiva et al., 2018). A aplicação destas ferramentas na monitorização das populações de varroa permite determinar a larga escala e com elevada precisão qual a prevalência de resistência aos diferentes acaricidas, o que poderá ajudar na luta integrada contra a varroose. Porém, a aplicação destas ferramentas não está ao alcance dos técnicos de apicultura e apicultores porque requerem laboratórios moleculares especializados e normalmente os testes são caros.

Ao contrário do que acontece com a *Varroa destructor*, para os vírus não há nenhum tratamento disponível. Além disso, em Portugal continental, não é conhecida a distribuição e prevalência dos vírus mais importantes das abelhas, contrariamente aos Açores onde recentemente se fez uma monitorização em todas as ilhas, exceto Corvo, no âmbito do projeto BEEHAPPY (Lopes et al., 2024). Devido à estreita associação entre a *V. destructor* e o vírus Deformed Wing Virus (DWV), a luta integrada contra a varroose acaba por ter também efeito neste vírus. No entanto, é importante salientar que compreender a distribuição e disseminação das doenças é essencial ao desenvolvimento de estratégias adequadas ao controlo e contenção das doenças.

A deteção e quantificação dos vírus das abelhas é normalmente feita através da técnica qRT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real com Transcrição Reversa), similar à usada no diagnóstico de infeção por SARS-CoV-2, a qual requer um Laboratório de Biologia Molecular relativamente bem equipado. No contexto da pandemia, a empresa Portuguesa STAB Vida desenvolveu um teste inovador de identificação rápida do SARS-CoV-2, baseado na amplificação isotérmica de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Este teste, batizado Doctor Vida, foi rapidamente vendido e disseminado à escala mundial. A tecnologia Doctor Vida é baseada num equipamento portátil (cabe numa mão) e barato que permite a monitorização da curva de fluorescência em tempo real (semelhante à do termociclador em tempo real), a qual é controlada por uma *App* que pode ser instalada em qualquer smartphone. Esta técnica oferece um potencial enorme na deteção rápida das mutações ligadas à resistência da varroa aos acaricidas e fazer a deteção de vírus não requerendo um laboratório de biologia molecular.

Genericamente, neste projeto pretende-se verificar se existem em Portugal populações de varroa portadoras dos alelos que conferem resistência aos piretróides e ao amitraz, e em caso afirmativo estudar a sua distribuição geográfica. Pretende-se também modernizar o setor apícola ao desenvolver-se ferramentas moleculares inovadoras que possam ser facilmente usadas na luta integrada contra a varroose e concomitantemente contra os vírus associados como o DWV. Os objetivos específicos são os seguintes:

- I. Desenvolver uma ferramenta molecular inovadora com base na tecnologia Doctor Vida para detetar as mutações associadas à resistência da *V. destructor* aos piretróides e ao amitraz;
- II. Implementar o primeiro rastreio a nível nacional das mutações associadas à resistência da *V. destructor* aos piretróides e ao amitraz;
- III. Desenvolver uma ferramenta molecular inovadora com base na tecnologia Doctor Vida para detetar as diferentes variantes do DWV;
- IV. Implementar o primeiro rastreio em Portugal continental das variantes do DWV;
- V. Desenvolver uma ferramenta molecular inovadora com base na tecnologia Doctor Vida para detetar as mutações associadas à resistência da *V. destructor* aos piretróides e ao amitraz.

2. RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O projeto MITE foi dividido em sete atividades e 17 tarefas (Anexo I), a serem desenvolvidas ao longo de 53 meses.

Durante a sua execução, foram acrescentadas novas tarefas, conforme detalhado abaixo:

Tarefas Adicionadas ao Projeto:

1. Realização de amostragem de abelhas vivas e varroas em Portugal Continental (Extensão da Atividade A1).

Justificação:

Devido à dificuldade na angariação de apicultores e à fraca colaboração das associações apícolas, a amostragem prevista não foi realizada nos primeiros dois anos. Considerando a importância crítica das amostras para a continuação do projeto, optou-se por realizar a amostragem pessoalmente em todo o território continental. Para tal, foi contratada uma nova bolseira (Cláudia Rodrigues) e adicionadas despesas imprevistas, totalizando 1.889,18 € acima do orçamentado. Atualmente, dispomos de amostras suficientes de *V. destructor* para 315 colónias (número de colónias estipulado era de 250), porém apenas de 229 colónias de abelhas para estudo do DWV, sendo necessária nova amostragem na primavera para alcançar as 250 colónias prometidas e de forma a obter amostras dos distritos de Castelo Branco, Montalegre, Guarda e Lisboa.

2. Avaliação Clínica dos Apiários (Tarefa 1.3, Atividade A1).

Justificação:

Aproveitando os gastos adicionais com a amostragem, realizou-se também uma avaliação clínica dos apiários, que revelou que a varroa é a doença de maior prevalência em Portugal. Esta ação permitiu um diagnóstico mais detalhado e independente do estado sanitário das colmeias nacionais.

3. Desenvolvimento de uma aplicação (app) para avaliação clínica dos apiários (Tarefa 1.4, Atividade A1).

Justificação:

Foi desenvolvida uma aplicação, denominada ApiVet, com o objetivo de facilitar aos médicos veterinários e técnicos apícolas a realização e armazenamento de avaliações clínicas dos apiários. Após testes, esta app será disponibilizada no site da FENAPICOLA.

4. Testes de métodos de extração de DNA de *V. destructor* (Tarefa 1, Nova Atividade 1).

Justificação:

Embora diversos métodos estejam descritos na literatura, nem sempre se obtém uma quantidade suficiente de DNA, além da variabilidade de preços dos kits. Assim, foram testados diferentes métodos para garantir uma extração eficiente e economicamente viável.

5. Estudo da variabilidade dos genótipos associados com a resistência à acaricidas em *V. destructor* numa colónia (Tarefa 2, Nova Atividade 1)

Justificação:

O projeto inicialmente previa a análise de uma única varroa por colónia para inferir a presença dos alelos de resistência a acaricidas. Contudo,

tornou-se relevante verificar se uma varroa representa o pool genético da colónia e se é viável utilizar um conjunto de indivíduos numa mesma reação de PCR.

Divulgação e Comunicação Científica (Atividade A7):

Na atividade A7, o projeto foi apresentado em 3 eventos dirigidos a apicultores, essenciais para impulsionar a participação na amostragem. Adicionalmente foi realizada a seguinte comunicação científica:

- Participação em formato de póster no Congresso Nacional de Biologia Evolutiva (1 póster)
- Participação em formato poster no VI International Conference of the Portuguese Society of Genetics, Oeiras, Portugal (1 póster)
- Participação no congresso internacional 10th European Conference of Apidology (2 posters)
- Agendada apresentação no Congresso APIMONDIA, em setembro (1 póster)
- Publicação de 2 artigos na revista Voz do Campo, em agosto

Estado Atual do Projeto:

Até ao terceiro ano de execução, foram iniciadas 15 tarefas e concluídas 5. Este projeto também tem sido importante para a formação académica das pessoas listadas a seguir:

- Maíra Costa: Aluna de doutoramento na Universidade da Coruña. Tese: Monitorização de mutações da *Varroa destructor* e desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras (2023-2025);
- Marta Cristina Louzeiro Coelho. Estágio de licenciatura em Biologia e Biotecnologia. Instituto Politécnico de Bragança. Detecção das mutações associadas à resistência da *Varroa destructor* aos piretróides (06 de setembro de 2024);
- Nathalia Vitrio Monegaglia. Estágio de Iniciação Científica. Instituto Politécnico de Bragança. Desenvolvimento de primers para a monitorização das mutações associadas com a resistência da *Varroa destructor* ao amitraz (2024).
- João Victor M. Souto. Estágio Iniciação Científica. Instituto Politécnico de Bragança. Resistência da *Varroa destructor* ao Amitraz (2024).
- Jhennifer Viana Almeida. Estágio Iniciação Científica. Instituto Politécnico de Bragança. Desenvolvimento de primers para reações LAMP para detetar mutações associadas com a resistência da *V. destructor* aos piretróides em Portugal (2025).
- Sara Sánchez Silva. Estágio Iniciação Científica. Instituto Politécnico de Bragança. Desenvolvimento de primers para detetar uma nova mutação associada com a resistência da *V. destructor* ao amitraz em Portugal (2025).
- Lucas Barbosa Correia. Estágio Iniciação Científica. Instituto Politécnico de Bragança. Desenvolvimento de primers para reações LAMP para detetar mutações associadas com a resistência da *V. destructor* ao Amitraz em Portugal (2025).

- Alice Maria Pimenta Leal da Silva. Estágio Iniciação Científica. Instituto Politécnico de Bragança. Amostragem de abelhas para deteção de *Varroa destructor* e Deformed Wing Vírus (2025).
- Sarah de Oliveira Rodrigues. Estágio de licenciatura em Biologia e Biotecnologia. Instituto Politécnico de Bragança. Deteção do vírus das asas deformadas (Deformed wing vírus) em abelhas *Apis mellifera* em Portugal continental (2025).
- Cláudia Susana Alves Rodrigues. Estágio de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade do Porto. *Apis mellifera*: O estado sanitário das colónias em Portugal continental, a Varroose e o vírus das asas deformadas (2025)
- Mohamed Khalil Bejaoui. Tese de Mestrado em Engenharia Biotecnológica. Instituto Politécnico de Bragança. Development of a Molecular Tool to Detect Mutations Associated with *V. destructor* Resistance to Pyrethroids (Em curso)

Tabela 1. Atividades relativas ao terceiro ano do projeto MITE.

Atividade	Tarefas	Estado
A1. Preparação de um inquérito e amostragem	• Preparação de um inquérito • Contatar apicultores • Amostragem abelhas e <i>V. destructor</i> • Nova atividade: Avaliação Clínica Apiários • Desenvolvimento de uma ferramenta para a avaliação clínica dos apiários	• Concluída • Em execução • Em execução • Concluída • Em execução
Nova Atividade 1: Testar métodos de extração de DNA de <i>V. destructor</i>	• Testar métodos de extração de DNA de <i>V. destructor</i> • Nova atividade: Variabilidade individual da resistência à acaricida em <i>V. destructor</i> ao nível da colónia	• Concluída • Concluída
A2. Ferramenta molecular para detetar as mutações associadas à resistência da <i>V. destructor</i> aos piretróides	• Controlos positivos • Testar primers do gene VGSC • Desenvolvimento de uma ferramenta molecular	• Em execução • Concluída • Em execução
A3. Ferramenta molecular para detetar as mutações associadas à	• Controlos positivos • Testar primers do gene OctB2R • Desenvolvimento de uma ferramenta molecular	• Em execução • Em execução • Em execução

resistência da <i>V. destructor</i> ao amitraz		
A4. Monitorização a nível nacional das mutações da resistência da <i>V. destructor</i> aos piretróides e ao amitraz	Monitorização a nível nacional das mutações da resistência da <i>V. destructor</i> aos piretróides e ao amitraz.	Em execução
A5. Monitorização a nível nacional das variantes DWV-A e DWV-B	Monitorização a nível nacional de DWV	Em execução

3. ATIVIDADES REALIZADAS E RESULTADOS ALCANÇADOS

ATIVIDADE 1: PREPARAÇÃO DE UM INQUÉRITO E AMOSTRAGEM

TAREFA 1.1. PREPARAÇÃO DE UM INQUÉRITO ✓

O inquérito (Anexo II) para a amostragem da varroa foi preparado e cada apicultor que participa com amostras deve preenchê-lo. O inquérito tem como objetivo entender qual os tipos de apicultura praticam (convencional ou biológica), as estratégias adotadas para o controlo da varroa, que tipo de varrocidas são aplicados, bem como o número de tratamentos e aplicações, e se houve necessidade de aumentar as doses de tratamento nos últimos anos. Sendo a proteção de dados será assegurada.

No total, participaram 80 apicultores que responderam ao questionário e enviaram amostras de varroa. Além destes, seis pessoas responderam ao questionário mas não foram rececionadas amostras, enquanto quatro enviaram amostras mas não preencheram o questionário. Assim, o número total de participantes nesta iniciativa foi de 90 apicultores, dos quais oito são mulheres, 79 são homens e três são empresas ou associações. Cada pessoa podia responder mais do que uma vez ao questionário se fossem adotadas diferentes práticas apícolas (Figura 1). No final foram analisadas 96 respostas válidas ao questionário, cujos resultados serão divulgados brevemente na revista técnica do setor agrícola, Voz do Campo.

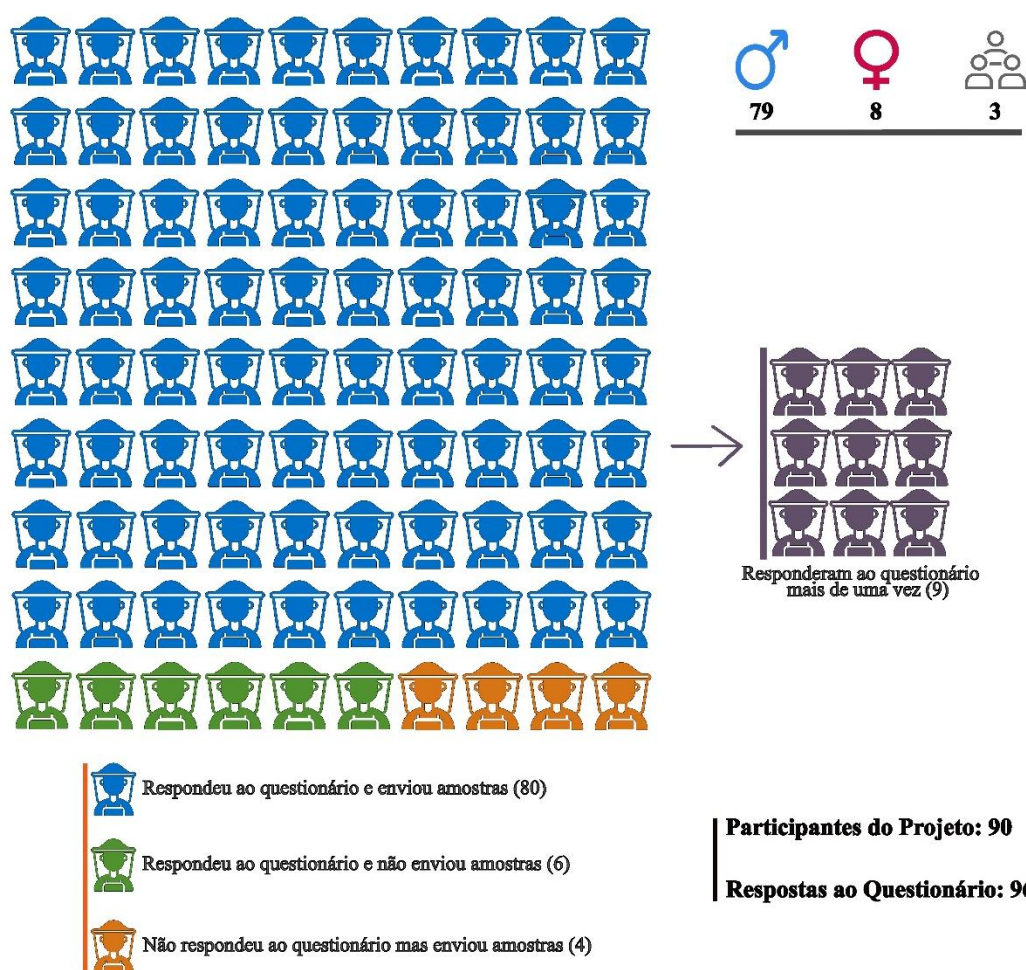


Figura 1. Distribuição dos apicultores participantes do projeto.

Das 96 respostas, conseguimos perceber como os apicultores estão a gerir os seus apiários para controlar a varroa. Na Figura 2, o gráfico mostra que a grande maioria pratica apicultura convencional (91), enquanto apenas um pequeno grupo faz apicultura biológica (5), refletindo o cenário atual da apicultura em Portugal. Ao lado, apresentam-se as várias estratégias de controlo da varroa usadas, sendo que a maioria utiliza varroicidas (93,62%), seguida da substituição regular de quadros e ceras (82,98%) e do desdobramento das colmeias (68,09%). Estes dados indicam que os apicultores combinam várias técnicas para tentar manter a varroa sob controlo, mostrando uma preocupação ativa com a saúde das suas colónias.

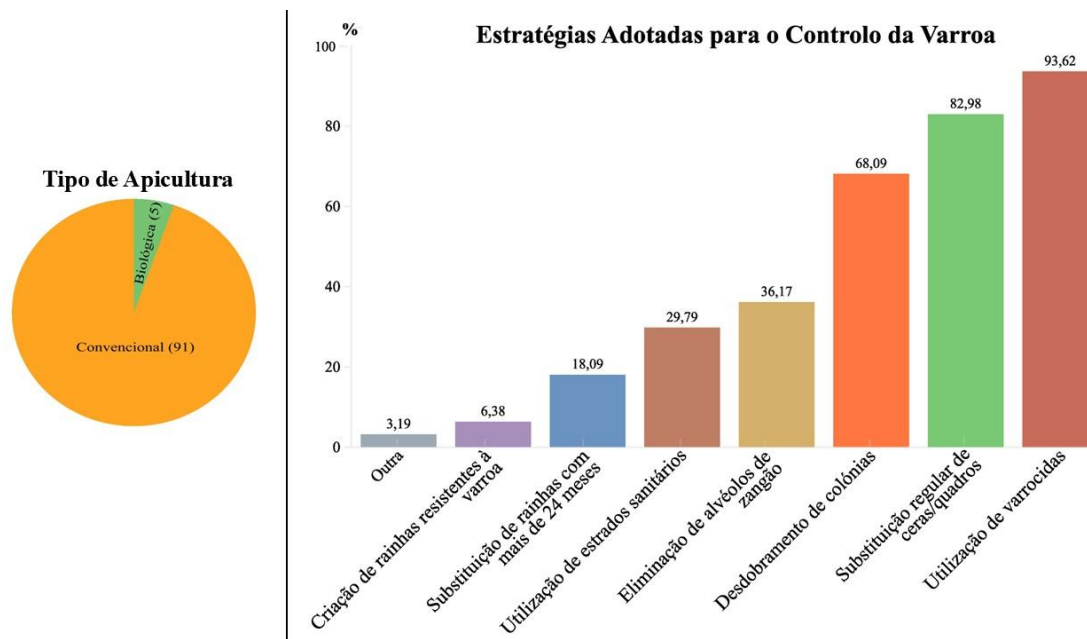


Figura 2. Tipo de apicultura praticada e estratégias adotadas para o controle da varroa, de acordo com as 96 respostas ao questionário.

Quanto ao número de tratamentos por ano, a maioria dos apicultores indicou que realiza três tratamentos, embora também haja um número relevante de respostas a apontar quatro ou mais, o que mostra um esforço contínuo no controle da varroa. Em relação à rotação de tratamentos, 56 apicultores afirmaram que fazem rotação, enquanto 40 disseram que não. Este dado mostra que ainda há espaço para reforçar a importância desta prática. Já no que toca ao tipo de rotação utilizada, o cenário mais comum é a rotação entre produtos orgânicos e sintéticos (40 respostas), seguida pelos que não fazem qualquer tipo de rotação (49). Estes resultados indicam que, apesar de haver margem para melhoria, muitos apicultores já adotam estratégias eficazes de controle (Figura 3).

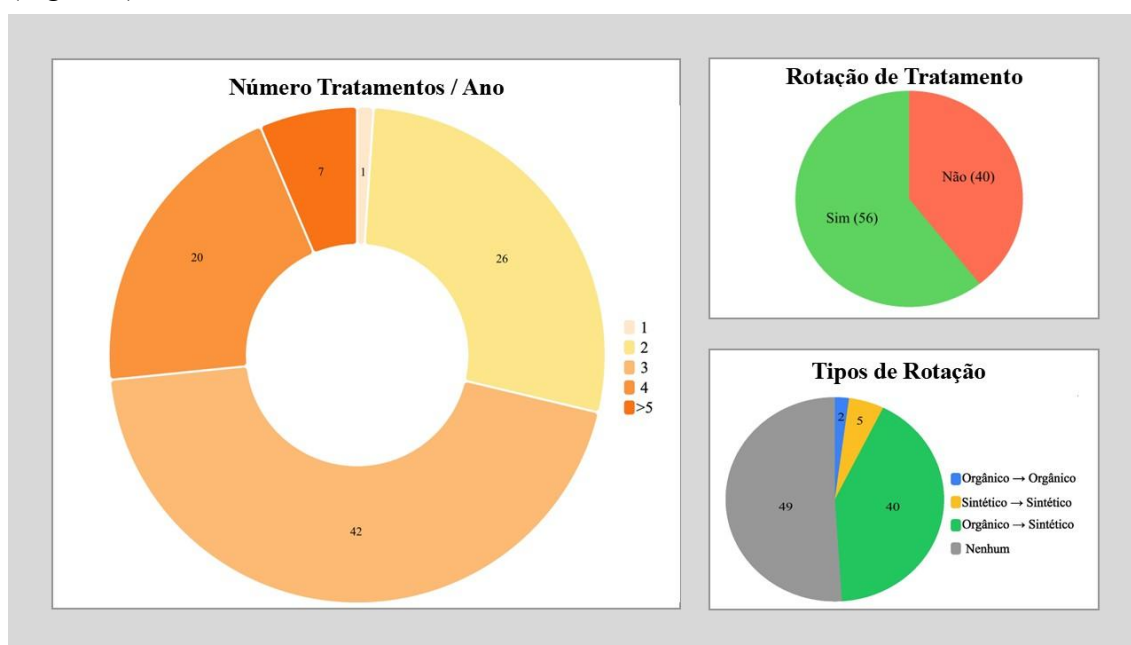


Figura 3. Distribuição das respostas dos apicultores (n=96) quanto ao número de tratamentos aplicados por ano, à prática de rotação de tratamentos e ao tipo de rotação utilizada.

Quanto às marcas de acaricidas mais utilizadas, divididas por tipo (amitraz, piretróides, entre outros), a grande maioria dos apicultores indicou o uso dos três produtos homologados em Portugal à base de amitraz — Apivar®, Amicel® e Apitraz® — representando, no total, 75% das respostas. Devido a essa forte preferência por produtos à base de amitraz, observou-se que 77% dos acaricidas utilizados são sintéticos, enquanto 23% são orgânicos. Além disso, 53 apicultores afirmaram que têm vindo a aumentar a dosagem dos tratamentos ao longo do tempo, o que pode estar relacionado com preocupações sobre a eficácia dos produtos ou sinais de resistência da varroa (Figura 4).

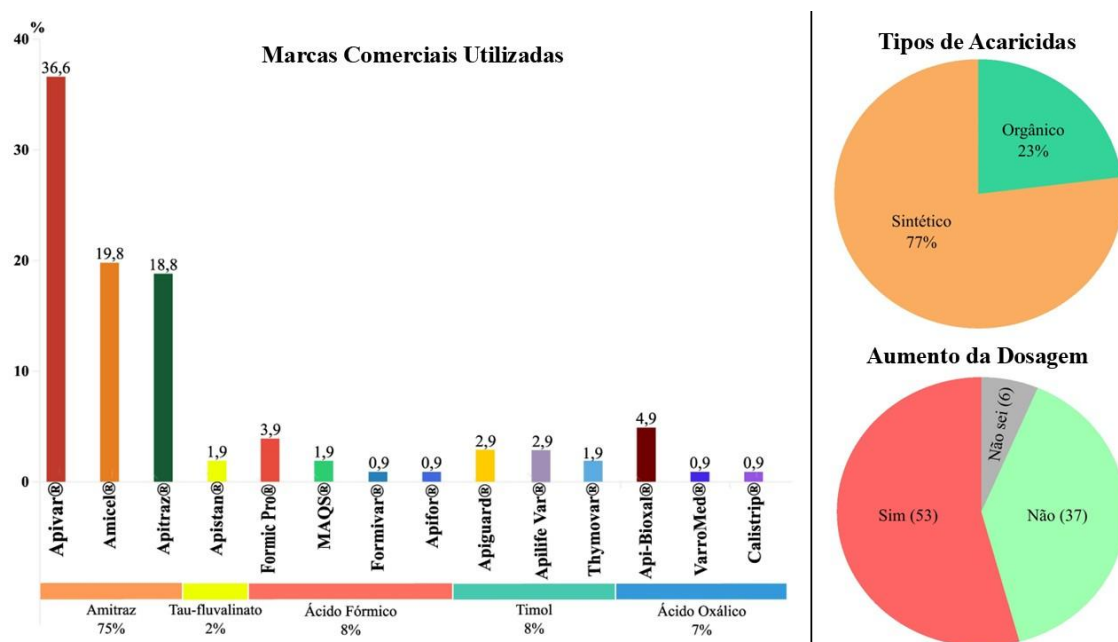


Figura 4. Produtos comerciais de varroicidas mais utilizados pelos apicultores (n=96), agrupados por tipo de substância ativa. A figura mostra também a percentagem de acaricidas sintéticos e orgânicos, e a proporção de apicultores que aumentaram a dosagem dos tratamentos ao longo do tempo.

TAREFA 1.2. CONTACTAR APICULTORES COM A COLABORAÇÃO DA FENAPÍCOLA

Apicultores distribuídos por todo o território nacional, que praticam diferentes tipos de apicultura (convencional ou em modo de produção biológica), estão a ser contactados.



Figura 5. Composição do kit para amostragem de varroas.



Por uma questão de facilidade, começou-se por solicitar amostras de varroas e, após obter os contatos dos apicultores e associações, proceder-se-á à amostragem de abelhas vivas. Foram contactadas 12 associações e 80 apicultores. Foram distribuídos mais de 500 kits, constituídos por 3 tubos de Eppendorf com álcool absoluto, etiquetas, parafilme, tudo num saco de plástico com envelopes pré-pagos do CTT e a morada do IPB (Figura 5). Os kits são entregues juntamente com um documento contendo instruções para a colheita de varroas (Anexo III).

TAREFA 1.3. AMOSTRAGEM

Para o estudo das resistências, devem ser amostradas varroas de 250 colónias distribuídas de norte a sul do país. Para a monitorização do DVW, serão amostradas obreiras de 250 colónias distribuídas igualmente de norte a sul do país.

Desde o início do projeto, já participaram 84 apicultores, que contribuíram com amostras provenientes de 154 apiários distribuídos por todo o território nacional (Figura 6). Desses participantes, 49 apicultores enviaram amostras de varroas diretamente para o Instituto Politécnico de Bragança (IPB), enquanto de 35 recolheram-se, as amostras durante visitas da equipa do projeto MITE aos apiários entre os meses de abril e maio de 2025, onde foram recolhidas abelhas vivas e criação de 75 apiários.

Ao incluir na amostragem favos operculados com criação, a equipa MITE conseguiu recolher simultaneamente amostras de varroas e de abelhas em 55 apiários, pertencentes a 36 apicultores e 3 empresas ou associações. Esta abordagem revelou-se particularmente eficaz, uma vez que muitas varroas se encontravam nos favos operculados — onde normalmente se reproduzem — permitindo assim a recolha direta das parasitas juntamente com as abelhas adultas no mesmo momento e local.

No total, foram recebidas amostras de varroas de 315 colónias e relativamente às abelhas, de 229 colónias. Todas as amostras de varroa foram identificadas com um código interno, conservadas em álcool absoluto e armazenadas a -20°C até à sua utilização. Quanto as amostras de abelhas foram também identificadas com o ID interno e armazenadas em -80°C para conservação de do RNA do vírus que se degrada muito mais facilmente que o DNA.

As localizações dos apiários amostrados podem ser visualizadas no mapa (Figura 6), onde os pontos correspondentes às amostras estão assinalados com cores distintas. Está prevista a realização de uma amostragem nas regiões de Castelo Branco, Guarda, Montalegre e Lisboa — áreas que, conforme se observa no mapa, ainda apresentam lacunas na recolha de amostras, tanto de abelhas como de varroas. Esta ação visa colmatar essas falhas e garantir uma melhor representatividade do território nacional.

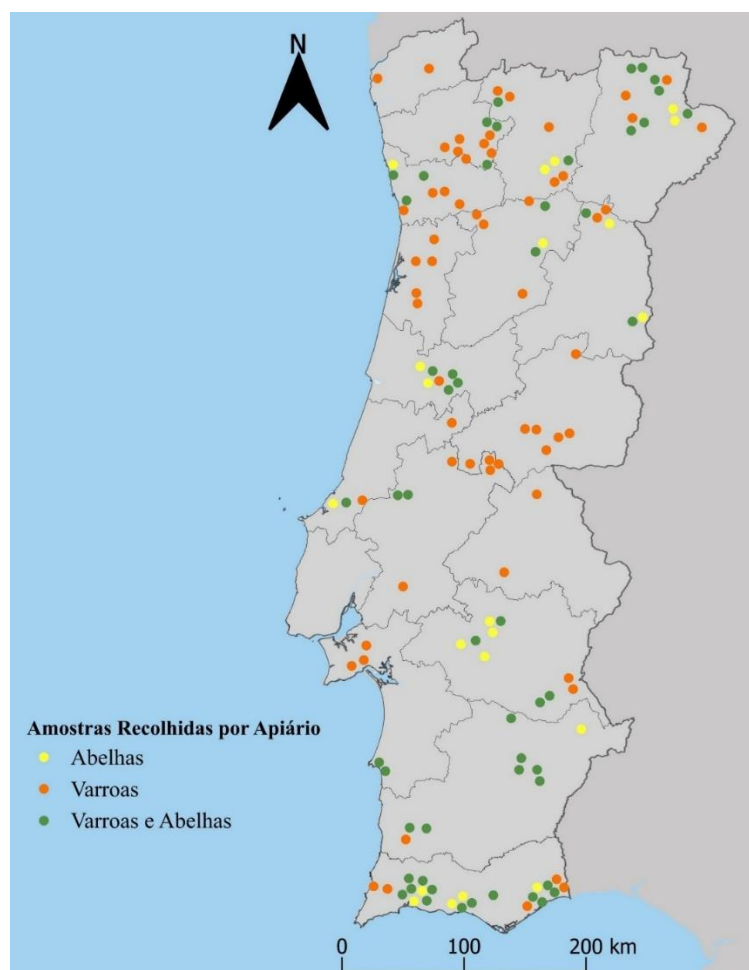


Figura 6. Mapa dos apiários amostrados em território nacional, indicando o tipo de amostras recolhidas: varroa, abelhas ou ambas.

Como referido no relatório anterior, uma das principais dificuldades na amostragem de varroas prende-se com o facto de, apesar do problema crescente associado à varroose, poucos apicultores realizarem testes para avaliar o nível de infestação. No entanto, ao sermos nós próprios a conduzir o processo de amostragem diretamente nos apiários — embora isso tenha representado um custo mais elevado — obtivemos um maior sucesso. Para além de termos conseguido recolher um número significativo de amostras num curto espaço de tempo, tanto de abelhas como de varroas no mesmo apiário, foi também possível garantir a preservação adequada das amostras para as análises subsequentes. Esta abordagem permitiu uma análise mais abrangente e integrada da situação sanitária dos apiários, com base nas duas amostras. Este sucesso é evidenciado pelo número de amostras já recolhidas, que ultrapassa os valores inicialmente definidos pelo projeto, no caso das varroas.

NOVA TAREFA 1.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA APIÁRIOS

Dando continuidade à estratégia de amostragem direta nos apiários, descrita no ponto anterior, foi possível realizar uma tarefa complementar de grande relevância: a avaliação clínica das colónias (Figura 7). Esta ação adicional permitiu registar e monitorizar o estado sanitário e produtivo das colónias de forma sistemática.



Figura 7. Realização do exame sanitário.

Para esse fim, foi desenvolvida uma Ficha de Avaliação Clínica, utilizada no terreno como instrumento padronizado de recolha de dados (ANEXO V). Esta ficha facilitou a obtenção de informações detalhadas sobre o estado geral das colónias, como sinais clínicos de patologias, força populacional, produção e condições da colmeia.

No total, foram avaliados 74 apiários com base neste exame sanitário e na aplicação da ficha. A maioria das explorações apícolas era dedicada à produção de mel (75,7%), com uma média de 50 colmeias por apiário, operando sobretudo em modo de produção convencional (96%). Apenas 14 explorações (19,8%) praticavam transumância.

Durante a anamnese, foram recolhidos dados sobre alterações observadas nas colónias, como mortalidade (pontual ou generalizada), alterações morfológicas e comportamentais, momento de início dos sinais, evolução ao longo do tempo, impacto na produção e medidas profiláticas eventualmente aplicadas. Também se questionou sobre a presença de apiários vizinhos não tratados e o uso local de pesticidas.

O historial clínico incluiu o registo de doenças anteriores, datas de ocorrência, tratamentos utilizados, medidas de controlo da varroose e suplementação alimentar, quando existente. Junto às colónias, foi realizado o exame clínico, com identificação dos principais predadores, pragas ou parasitas.

No que respeita à anamnese sanitária, foi referido que, em todos os apiários avaliados, se realizava profilaxia preventiva contra a varroose. Sendo a infestação por *V. destructor* foi frequentemente associada ao aparecimento secundário de traça-da-cera (*Galleria mellonella*) agravando o estado sanitário das colónias. Foram também identificados diversos predadores, como: Vespa Asiática (*Vespa velutina*), Vespa europeia (*Vespa crabro*), Vespa germânica (*Vespula germanica*) e o Abelharuco (*Merops apiaster*). Dentre estes, a espécie invasora *V. velutina* representa a maior ameaça, sua presença tem causado grande preocupação devido à sua agressividade, ao comportamento predatório direcionado principalmente às abelhas e à sua rápida expansão por diferentes regiões da Europa, com impactos significativos na apicultura e na biodiversidade (Sundseth, 2016).

De acordo com os apicultores, a varroose foi a doença mais prevalente, afetando 65,6% das explorações. Seguiram-se, noseemose (8,9%); loque americana (4,4%); ascosferiose (4,4%); loque europeia (1,1%). Importa destacar que, apesar de não constarem casos nos registos oficiais, foi relatada por um apicultor da região Sul a ocorrência de um caso de loque europeia em 2025, tendo as colmeias afetadas sido eliminadas de acordo com as diretrizes sanitárias (Figura 8.a).

Em todos os casos de varroose, foram implementados tratamentos específicos, sendo os mais utilizados os produtos comerciais Amicel® e Apivar®, ambos à base de amitraz. Registou-se ainda a aplicação de combinações terapêuticas e o uso de substâncias de base orgânica, como, ácido fórmico (Formic Pro®) e ácido oxálico (Api-Bioxal®) (Figura 8.b).

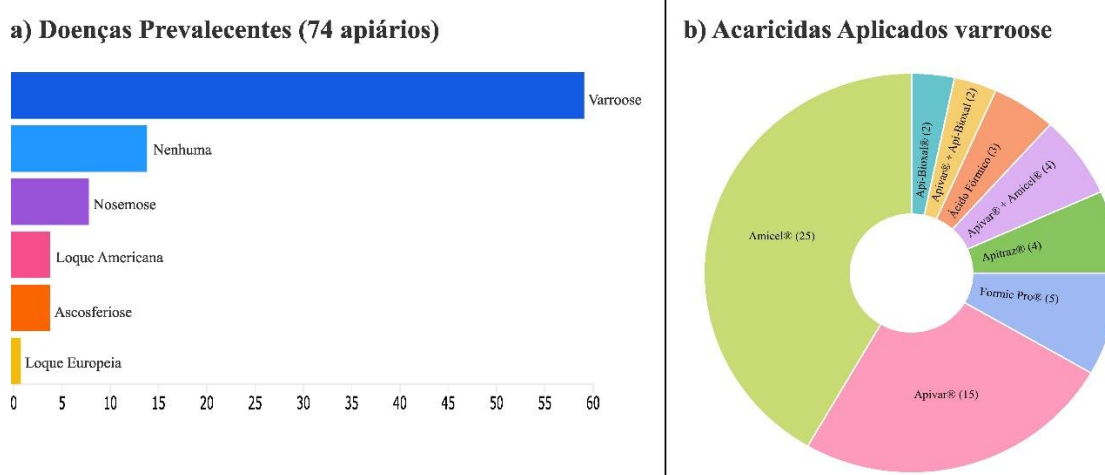


Figura 8. Prevalência de patologias apícolas e tratamentos aplicados nos 74 apiários avaliados: **(a)** Frequência das principais doenças apícolas identificadas com base nas respostas dos apicultores à ficha de avaliação clínica. Cada apiário pode apresentar uma ou mais patologias, simultaneamente ou ao longo do ano apícola. **(b)** Número de tratamentos realizados para controlo da varroose nos apiários avaliados.

O uso de fármacos foi frequentemente complementado por medidas zootécnicas, porém outras estratégias foram adotadas como a substituição de ceras que foi a prática mais comum, adotada em 76,4% dos apiários, seguida pelo desdobramento de colónias (61,1%) e pela substituição de rainhas com mais de 24 meses (38,9%). A utilização de estrados sanitários foi referida em 36,1% dos casos, enquanto a eliminação de alvéolos de zângão ocorreu em 30,6%. O enjaulamento temporário da rainha, com o objetivo de interromper a criação, foi mencionado por 13,9% dos apicultores, e a criação de rainhas resistentes à *V. destructor* por 16,7% (Figura 9).

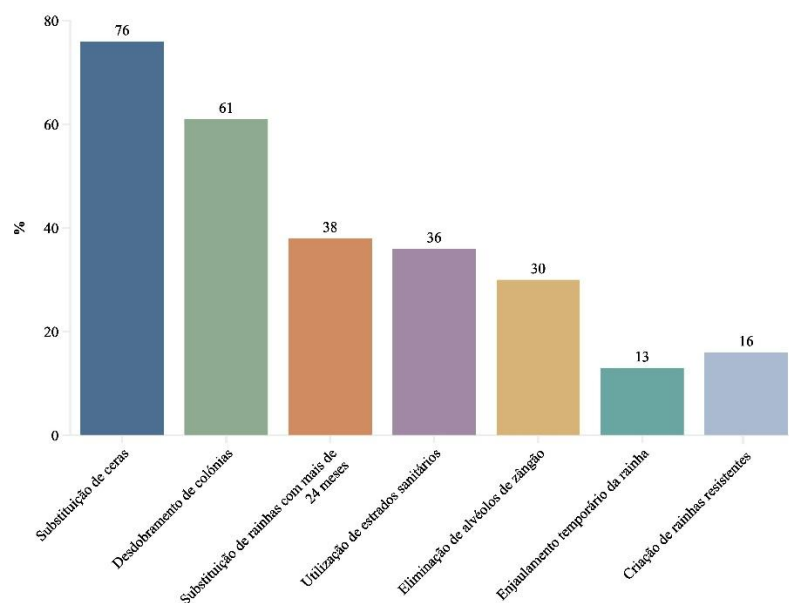


Figura 9. Estratégias adotadas para ajuda no controlo da varroose nos 74 apiários submetidos a avaliação clínica. Importa salientar que, em todos os casos, foi referida a utilização de fármacos como parte da estratégia de controlo.

As combinações de medidas mais frequentemente relatadas foram: (i) utilização de varrocidas associada à substituição regular de ceras (13,5%) e (ii) varrocidas combinados com substituição de rainhas com mais de 24 meses, substituição de ceras e eliminação de alvéolos de zangãos (21,6%). Estes dados refletem uma crescente preocupação com a eficácia terapêutica, a prevenção da resistência e a sustentabilidade sanitária das colónias.

O exame geral teve início com observação à distância, procurando sinais de pilhagem (roubo de mel por abelhas externas), enxameação, alterações no voo (como tremores ou dificuldade para voar), presença de abelhas mortas com pólen e queda em arco, manchas escuras na entrada da colmeia, serradura na tábua de voo, odores anómalos ou alterações morfológicas visíveis, como abelhas sem pelos, com distensão abdominal, negras e brilhantes ou com asas deformadas. Foram registados casos de enxameação (6,8%) e pilhagem (2,7%), além de sinais inespecíficos como abelhas mortas no exterior em forma de arco (13,5%), negras e brilhantes (8,1%) e com tremores ou dificuldade de voo (4,1% cada), indicativos de múltiplas causas subjacentes, desde fragilidade sanitária até stress ambiental.

No interior da colmeia, realizou-se a inspeção do ninho e das meias-alças para mel (*half-supers*), avaliando o vigor da colónia, o padrão de criação, o comportamento (defensivo ou higiénico), bem como a presença de opérculos perfurados, criação em mosaico e alterações larvares, como mumificação, variações de cor, decomposição ou aspeto filamentar. Também se verificou a presença de parasitas (varroa), tanto em abelhas adultas quanto na criação. Entre os sinais clínicos mais sugestivos de doença, a presença de varroa em abelhas adultas (44,6%) e na criação operculada (43,2%) foi a mais frequentemente reportada, seguida da criação em mosaico (37,8%) e de abelhas com asas deformadas e opérculos perfurados (28,4% cada), indicadores típicos de varroose, muitas vezes associada a coinfeções virais (Figura 10).



Figura 10. Sinais clínicos associados a *V. destructor* em colónias de *A. mellifera*. **a)** Abelha com a presença da varroa; **b)** Abelhas com asas deformas; **c)** Favo da criação com padrão em mosaico; **d)** Alvéolos com opérculos perfurados, presença de parasita.

Os métodos de diagnóstico classificam-se em diretos e indiretos. Entre os diretos, incluem-se a contagem de varroas foréticas em abelhas adultas, através da recolha de cerca de 200 abelhas, submetidas a agitação com álcool ou açúcar no dispositivo “Varroa Tester 3 em 1”, seguida de filtração e contagem dos ácaros (Figura 11a), e a inspeção da criação operculada, através da desoperculação dos alvéolos (Figuras 11b e c). No que diz respeito à contagem dos ácaros por desoperculação, o procedimento ainda está em andamento: até o momento, foi realizado em apenas 24 colónias, restando ainda a avaliação das 201 colónias restantes.

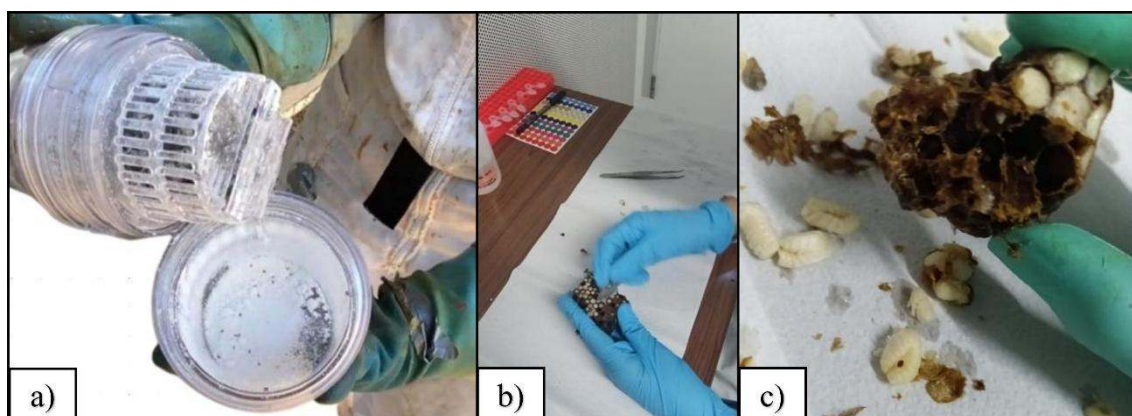


Figura 11. Métodos de diagnóstico laboratorial e de campo. **a)** Avaliação de varroa forética com o método do açúcar, com o dispositivo ‘Varroa 3 em 1’; **b)** Desoperculação de criação para avaliação da taxa de infestação; **c)** Secção de favo com alvéolos de zângão (maior dimensão) desoperculados manualmente;

Paralelamente, em colaboração com a Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Bragança, foi iniciada a criação de uma ferramenta digital de apoio à avaliação sanitária. A aplicação, denominada Apivet, foi desenvolvida no âmbito da unidade

curricular Estágio do Curso Técnico Superior Profissional em Desenvolvimento de Software, pelo aluno José Pinheiro.

A Apivet constitui uma aplicação digital inovadora que permite o registo estruturado de dados sanitários por colónia, incorporando funcionalidades como análise gráfica, registo temporal e integração em cloud, o que promove uma gestão sanitária mais eficiente, rastreável e colaborativa entre técnicos e apicultores. A aplicação encontra-se atualmente em fase de testes e ajustes finais, não estando ainda disponível para uso generalizado, mas representa um avanço significativo na digitalização e modernização da gestão sanitária apícola. No final será divulgada no site da FENAPICOLA.

NOVA ATIVIDADE 2: TESTAR MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *V. DESTRUCTOR* ✓

Os resultados obtidos no segundo ano indicaram que os métodos mais eficazes e ágeis para a extração de DNA foram o QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) e o sistema automatizado Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega). Ambos os kits foram utilizados conforme os protocolos recomendados pelos fabricantes, com pequenos ajustes descritos na Tabela 2.

Embora o kit da Promega ofereça maior rapidez no processo, seu custo é mais elevado em comparação ao da Qiagen. Assim, a escolha entre os kits tem sido feita com base na disponibilidade, priorizando-se o QIAamp® DNA Mini Kit, que foi responsável por aproximadamente 70% das extrações realizadas até o momento.

Tabela 2. Descrição dos kits comerciais de extração de DNA utilizados, com indicação dos protocolos de referência e dos ajustes específicos realizados para otimização do rendimento ou pureza do DNA.

Kit de Extração de DNA	Protocolo	Ajustes
QIAamp DNA Mini kit (Qiagen®, Hilden, DE)	DNA purification from tissues	Incubação: 1h a 65 °C 30 µl buffer Ae (repetir 2x com o mesmo buffer)
Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega)	PureFood GMO and Authentication Kit for Food, Feed and Seed Samples	300 µl CTAB buffer e 50 µl Elution buffer

TAREFA 2.1. DESENVOLVIMENTO DOS CONTROLOS POSITIVOS E POSTERIOR SÍNTESE ✓

A *V. destructor* tem um genoma de referência designado Vdes_3.0 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=varroa+destructor>). O genoma nuclear tem um tamanho de 368 Mbp e contém 12.829 genes. Atualmente, existem no Sequence Read Archive (SRA) informações de 1964 genomas de *V. destructor*, embora a maioria provenha da China.

Embora o projeto descreva que os controlos positivos do gene VGSC seriam desenvolvidos em primeiro lugar, devido à baixa representação de sequências da Europa e, em particular, de Portugal, essa tarefa será desenvolvida após a realização da Atividade 4 (Monitorização a nível nacional das mutações da resistência da *V. destructor* aos piretróides e ao amitraz). A vantagem de alterar a ordem dessas tarefas/atividades é que o estudo por sequenciação das amostras provenientes de várias

zonas do país mostrará quais os controlos positivos mais representativos para a população de Portugal.

TAREFA 2.2. TESTAR PRIMERS DO GENE VGSC PARA SEQUENCIAÇÃO

Conforme exposto no relatório anterior, a sequência do gene VGSC, com o número de acesso NW_019211458, foi retirada do GenBank, abrangendo as posições 14816088 a 14761024. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica na qual todos os primers utilizados para detetar a resistência da varroa aos piretróides foram alinhados com a sequência de referência usando o software MEGAX (Tamura et al., 2021).

No total, foram encontrados seis primers diferentes. Para a sequenciação de Sanger, o fragmento a ser amplificado não deve conter mais de 1500 pb. O preço é sempre o mesmo, independentemente do tamanho do fragmento que será amplificado; portanto, não é eficiente amplificar fragmentos pequenos. A amplificação de fragmentos maiores permite estudar a variação existente na população. Tendo em conta esses fatores, foram escolhidos os primers 1,273iF: 5'-AAGCCGCCATTGTTACCAGA-3' e 1,973iR: 5'-GCTGTTGTTACCGTGGAGCA-3', que amplificam um fragmento de 701 pb (. Esses primers também serão usados pelos parceiros do projeto do “Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CIAPA)”, o que permitirá comparar os dados obtidos em Portugal e Espanha.

Para amplificar a região de interesse, foi necessário a realização da PCR. Que após os testes de Taq polimerases ficou decidido a utilização da OneTaq® DNA Polymerase (New England - BioLabs) seguindo o protocolo do fabricante da tabela 3.

Tabela 3. Componentes da reação de PCR com volume final de 25 µL, foram realizados ajustes adicionais na concentração dos primers. Os dados foram obtidos e adaptados a partir do protocolo oficial da New England Biolabs (NEB) para a OneTaq® DNA Polymerase (M0480). <https://www.neb.com/en/protocols/2012/10/11/onetaqdnapolymers0480>

Componentes	25 µl (reação)	Concentração Final
5X OneTaq Standard Reaction Buffer*	5 µl	1X
10 mM dNTPs (#N0447)	0.5 µl	200 µM
10 µM Forward Primer	0.2 µl	0.2 µM
10 µM Reverse Primer	0.2 µl	0.2 µM
OneTaq® DNA Polymerase	0.125 µl	1.25 units/50 µl PCR**
Template DNA	2 µl	< 1,000 ng
Nuclease-free water	para 25 µl	

A amplificação foi efetuada num Thermal Cycler™ T100 (Bio-Rad) nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94 °C durante 30 segundos; seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, recozimento a 62,5 °C durante 60 segundos e extensão a 68 °C durante 60 segundos. Foi efetuada uma extensão final a 68 °C durante 5 minutos, seguida de uma retenção final a 4 °C por tempo indeterminado. O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%. A eletroforese foi realizada utilizando um tampão 1× Tris-Acetato-EDTA (TAE) contendo brometo de etídio (EtBr) e uma tensão constante de 85 V durante 45 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas por fluorescência sob radiação ultravioleta utilizando um transiluminador

ChemiDoc™ XRS+ com o software Image Lab™ da Bio-Rad (Hercules, Califórnia). A amplificação bem-sucedida foi confirmada pela presença de uma única banda de aproximadamente 701 pb (Figura 13).

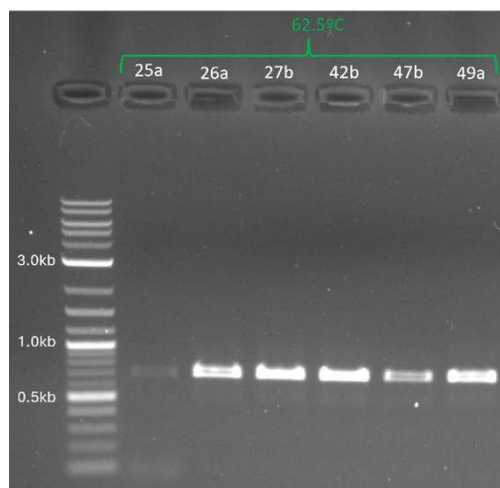


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de seis amostras amplificadas com os primers Piretroíde_1273F e Piretroíde_1973R, visando um fragmento de 701 pb. As reações foram realizadas com OneTaq DNA Polymerase, utilizando uma temperatura de recozimento de 62,5 °C durante 40 ciclos. A concentração do iniciador foi de 0,2 µL por reação. Os produtos da PCR foram separados num gel de agarose a 1% a 85 V durante 45 minutos. Foi utilizado um 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs).

Para a sequenciação de Sanger as amostras foram enviadas para a empresa Macrogen (Madri, Espanha), onde os resultados estão expostos mais detalhadamente na Tarefa 4. Mas podendo ser observado os picos da sequenciação na figura 14.

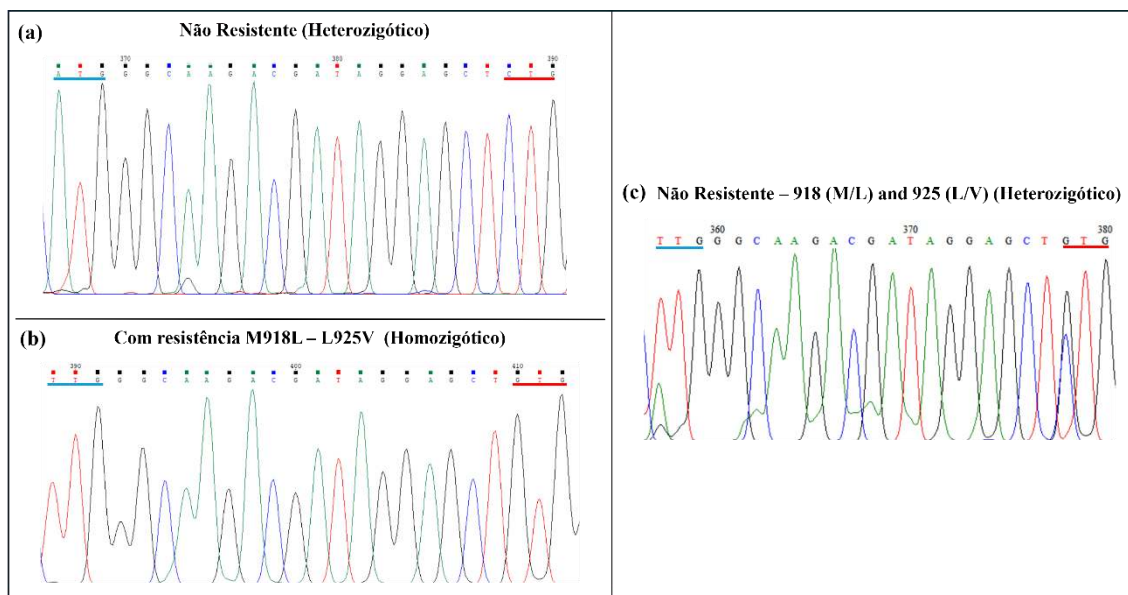


Figura 14. Exemplo de sequências obtidas do DNA da *Varroa destructor*, indicando a presença ou ausência de mutações associadas à resistência aos piretróides. **a)** mostra a sequência de um indivíduo **não resistente**, apresentando a sequência de nucleótidos esperada (sem mutação); **b)** corresponde a um indivíduo **resistente**, evidenciando uma **substituição de nucleótido** entre as posições **918 e 925**, resultando numa mutação em ambas as posições; **c)** corresponde em um indivíduo heterozigótico considerado **não resistente**, mas que apresenta alelos de resistência nas posições **918 (M/L)** e **925 (L/V)**.

TAREFA 2.3. VARIABILIDADE INDIVIDUAL DA RESISTÊNCIA À ACARICIDA EM VARROA DESTRUCTOR AO NÍVEL DA COLÓNIA ✓

Após a seleção do protocolo ideal, foram realizadas análises adicionais com cinco colónias provenientes de cinco locais distintos em Portugal. De cada colónia, foi extraído DNA individualmente de 10 ácaros varroa (tabela 4). Este procedimento teve como objetivo avaliar a variação nos resultados dentro da mesma colónia para determinar um número médio de ácaros por colónia que deve analisar para verificar se os alelos associados à resistência aos acaricidas estão ou não presentes.

Tabela 4. Informações individual de cada varroa por colónia com base na sua resistência aos piretróides e no seu estado de homozigótica ou heterozigótica.

Colónia	Resistente / Não Resistente	Homozigótico / Heterozigótico
9c	Não Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Sem resultado	*
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
11a	Não Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Sem resultado	*
	Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Heterozigótico (918 e 925)
	Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Heterozigótico (918 e 925)
	Resistente	Homozigótico
31a	Não Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Sem resultado	*
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Heterozigótico (918 e 925)
	Não Resistente	Heterozigótico (918 e 925)
	Não Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico

38a	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
	Resistente	Homozigótico
54c	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico
	Sem resultado	*
	Não Resistente	Homozigótico
	Não Resistente	Homozigótico

Ao nível da colónia, em Portugal, os níveis de resistência ao piretróide demonstraram elevada variabilidade, inclusive dentro da mesma colónia. Das amostras analisadas, 44% foram classificadas como resistentes, 48% como não resistentes, e 8% não foram elegíveis para classificação (sem resultado).

Destas, 9% apresentaram genótipos heterozigóticos (consideradas suscetíveis, sem resistência) e 91% genótipos homozigóticos (tanto resistentes como não resistentes). Apenas duas colónias apresentaram homogeneidade populacional: uma composta exclusivamente por indivíduos resistentes (38a) e outra por indivíduos não resistentes (54c). Três colónias (9c, 38a e 54c) eram compostas inteiramente por indivíduos homozigóticos, enquanto todas as outras apresentaram heterozigóticas nas duas posições nucleotídicas 918 (M/L) e 925 (L/V). Um estudo realizado em Espanha reportou resultados semelhantes, indicando que, quando os ácaros eram heterozigóticos na posição 918, também o eram na posição 925 (Millán-Leiva et al., 2021).

A análise individual de ácaros revelou-se fundamental para avaliar a homogeneidade genética dentro de cada colónia. Verificou-se que, com a análise de, pelo menos, cinco ácaros por colónia, já é possível obter uma indicação preliminar do grau de homogeneidade populacional. Em colónias onde se detetam perfis genéticos mistos ou resultados menos claros, poderá ser necessário aumentar o número de extrações individuais a partir da mesma colónia, de forma a melhorar a robustez da análise.

Com base nesses dados, foi selecionada uma amostra da colónia 54c (suscetível, sem mutações) e outra da colónia 38a (resistente, com mutações nas posições 918 e 925), ambas homozigóticas, com o objetivo de investigar a capacidade de deteção simultânea de ambas as variantes de resistência numa única sequência. Ambas as amostras foram

normalizadas para a mesma concentração de DNA, 1,5 ng/μL. As misturas dessas amostras homozigóticas (resistente e suscetível) foram submetidas a sequenciação Sanger em triplicado, garantindo a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

A análise permitiu detetar um padrão em todas as amostras heterozigótica onde em algumas das diluições mais concentradas da amostra não resistente (NR) ou resistente (R), foi observado esporadicamente um sinal heterozigótico em um dos triplicados. No entanto, a detecção consistente de um sinal heterozigótico em ambas a posição, em todos os triplicados, foi observada apenas na mistura de 5 μL (R) + 5 μL (NR) e na mistura ajustada de 7 μL (R) + 3 μL (NR) (Figura 15).

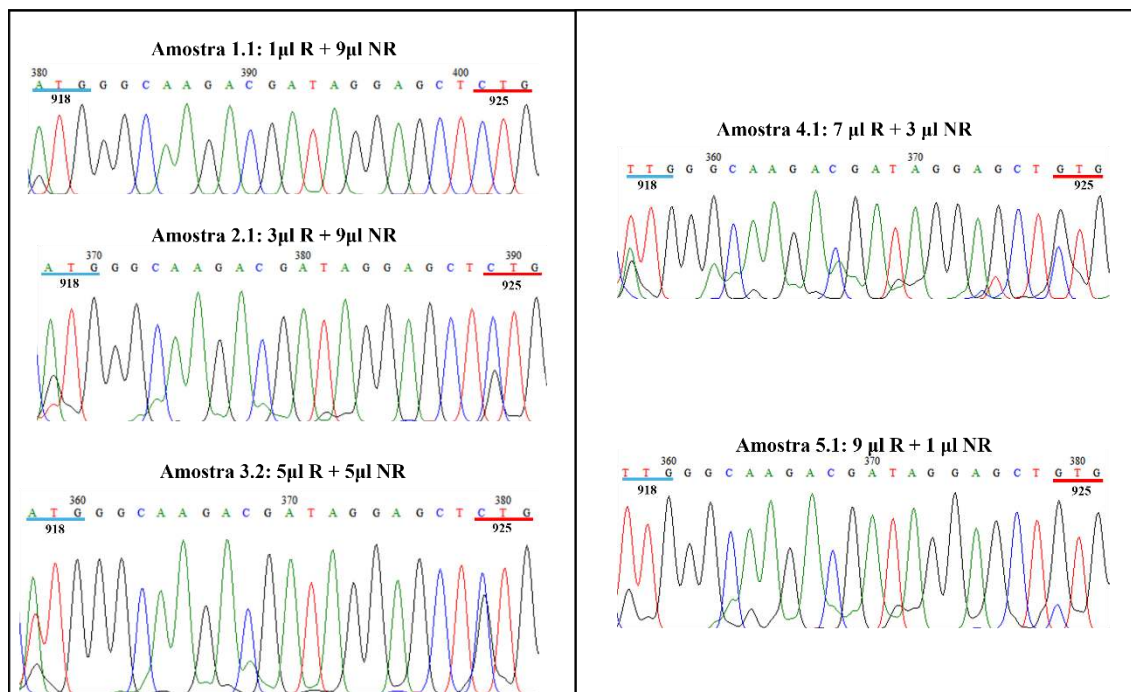


Figura 15. Padrão das diluições obtidas a partir das misturas das amostras homozigóticas das colónias 54c (suscetível) e 38a (resistente). A figura mostra a detecção da heterozigose em cada uma das diluições testadas.

Embora não seja possível distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos em amostras de DNA agrupadas (mistura de vários ácaros numa única amostra), conseguimos saber se o alelo está presente ou não na colónia.

TAREFA 2.4. DESENVOLVIMENTO DE UMA FERRAMENTA MOLECULAR QUE PERMITA DETETAR AS MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA DA *V. DESTRUCTOR* AOS PIRETRÓIDES

Nesta tarefa está a ser desenvolvida uma ferramenta molecular com base na tecnologia Doctor Vida, a qual utiliza LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), que permita distinguir as varroas resistentes ou suscetíveis.

Utilizamos como base, nesta tarefa, os dados da Tarefa 4. A partir das sequências analisadas, foi possível identificar o padrão das regiões conservadas, ou seja, aquelas que não apresentam variações. Esse processo é essencial para a construção dos primers, pois regiões altamente variáveis devem ser evitadas a fim de prevenir ligações inespecíficas e garantir a especificidade da amplificação.

Foram utilizados dois softwares para o desenho dos primers: NEB LAMP Primer Design Tool, versão 1.4.2 (New England Biolabs), e LAMP Designer, versão 1.16 (Premier Biosoft). A partir de cada ferramenta, foi selecionado um grupo de primers LAMP (totalizando dois grupos), compostos por primers internos e externos, além de primers do tipo loop (opcionais). Os primers foram projetados para aplicação na técnica de qPCR (Figura 16).

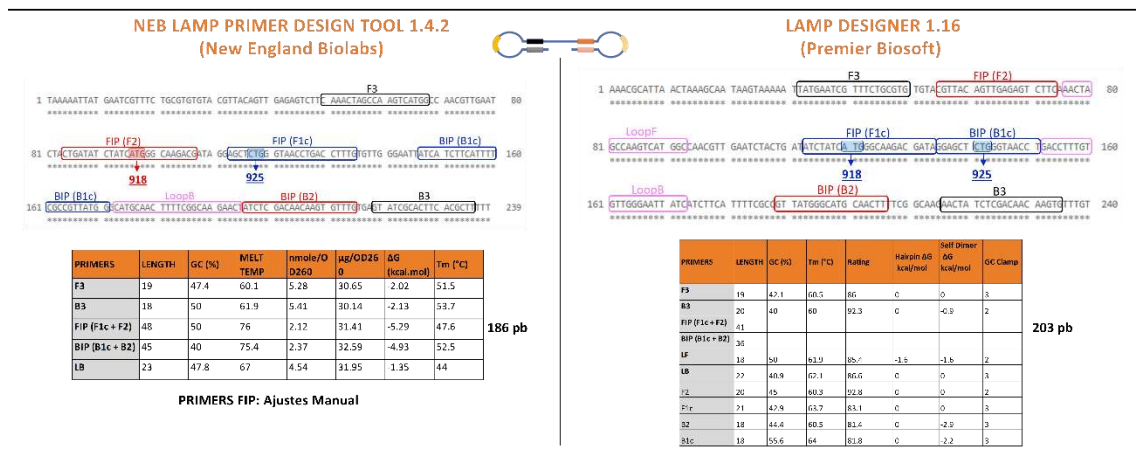


Figura 16. Grupos de primers LAMP selecionados de cada software para detecção das mutações associadas à resistência a piretróides nas posições 918 e 925 do DNA de *Varroa destructor* em populações de Portugal.

Para que a amplificação ocorra de forma eficiente, os primers externos F3 e B3 devem estar localizados fora da região que contém a mutação, garantindo a integridade do processo. Já os primers internos, FIP e BIP, devem estar posicionados nas regiões-alvo (posições 918 e 925), assegurando a detecção específica da mutação.

Estes primers apresentaram parâmetros dentro dos intervalos ideais, incluindo uma temperatura de fusão (T_m) entre 55–65°C, um teor de GC de 40–60% e valores de ΔG superiores a -5 kcal/mol, garantindo assim uma amplificação estável e eficiente (Tabela 1 e 2). Valores menos negativos indicam menor interação entre os primers, reduzindo esse risco. Dessa forma, foram escolhidos os primers com ΔG menos negativo, além de assegurar que os FIP e BIP estivessem posicionados dentro das regiões das mutações. O comprimento dos primers, uma vez que devem variar entre 18 e 30 nucleotídeos, garantindo assim uma ligação estável e uma amplificação eficiente. Por sua vez, a temperatura de fusão (T_m) deve estar entre 55°C e 65°C, garantindo valores de T_m semelhantes para os primers externos e internos, a fim de otimizar a eficiência da amplificação, uma vez que se a temperatura for menor que 55°C pode ocorrer uma ligação inespecífica (Colosimo, et al., 2025).

Os primers foram sintetizados pela empresa STABVIDA, tendo-se optado, numa fase inicial de testes, por primers com purificação standard (desalted). No entanto, após a validação dos primers, deverá ser considerada a utilização de primers com purificação por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), que, apesar do custo superior, é recomendada em contextos de diagnóstico molecular de alta sensibilidade e fiabilidade, como é o caso da detecção de mutações.

TAREFA 2.4. VALIDAÇÃO DA NOVA FERRAMENTA MOLECULAR BASEADA NO DOCTOR VIDA USANDO SEQUENCIAÇÃO DE SANGER

Os controlos negativos e positivos consistem em amostras reais de DNA provenientes da Tarefa 4, uma vez que estas já foram submetidas à sequenciação por Sanger, permitindo a confirmação prévia das suas características genéticas. Estas amostras foram utilizadas com o objetivo de validar os primers desenhados na Tarefa 2.3.

Para esta etapa, foram adquiridos os reagentes recomendados pela STABVIDA, uma vez que são os mesmos utilizados no equipamento DOCTOR VIDA. Dessa forma, manteve-se a consistência com o protocolo recomendado para cada reação com volume final de 25 μL (Tabela 5).

Tabela 5. Composição da reação de LAMP utilizando o Doctor Vida Universal LAMP Master Mix (StabVida), com volume final de 25 μL . Os primers foram adicionados nas concentrações indicadas, juntamente com corante fluorescente (LAMP dye 50X fornecido pela StabVida). A preparação segue as instruções do fabricante (Doctor Vida, 2025).

Componentes	Reação (25 μL)	Concentração Final
Universal LAMP Master Mix	15 μL	15 μL
LAMP dye	0,5 μL	1X
Primer F3 (50 μM)	0,1 μL	0,2 μM
Primer B3 (50 μM)	0,1 μL	0,2 μM
Primer FIP (50 μM)	0,8 μL	1,6 μM
Primer BIP (50 μM)	0,8 μL	1,6 μM
Primer LF (50 μM)	0,2 μL	0,4 μM
Primer LB (50 μM)	0,2 μL	0,4 μM
Nuclease free water	-	Para 20 μL
DNA	1 ou 2 μL	
Lysate	5 μL	5 μL

As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas no equipamento CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Ambos os grupos de primers foram testados a temperaturas isotérmicas entre 63 $^{\circ}\text{C}$ e 67 $^{\circ}\text{C}$, sendo que o controlo negativo foi incluído sistematicamente a 65 $^{\circ}\text{C}$, com o objetivo de avaliar o desempenho da amplificação. As reações foram preparadas utilizando uma mistura única de reação base, à qual o DNA foi posteriormente adicionado individualmente em tubos separados, conforme cada amostra.

As reações incluíram amostras previamente caracterizadas como resistentes e não resistentes, nas quais foram testados dois volumes de DNA (1 μL e 2 μL), com o intuito de avaliar o impacto da quantidade de DNA na sensibilidade da deteção e na formação das curvas de amplificação, para além da influência da temperatura.

Embora os dados do primeiro ensaio com um dos conjuntos de primers não tenham sido guardados, o teste foi posteriormente repetido com algumas amostras e o controlo negativo a 67 $^{\circ}\text{C}$, de forma a assegurar o registo e documentação dos resultados. Em todos os ensaios realizados, ambos os conjuntos de primers amplificaram todas as amostras com um mesmo padrão — incluindo o próprio controlo negativo. Como é sabido, a amplificação do controlo negativo não deveria ocorrer, o que sugere possíveis problemas como ligações inespecíficas dos primers ou contaminação. No entanto, tendo em conta que esta situação se verificou de forma consistente em todos os testes, é mais plausível que se trate de auto-hibridização dos primers (Figura 17).

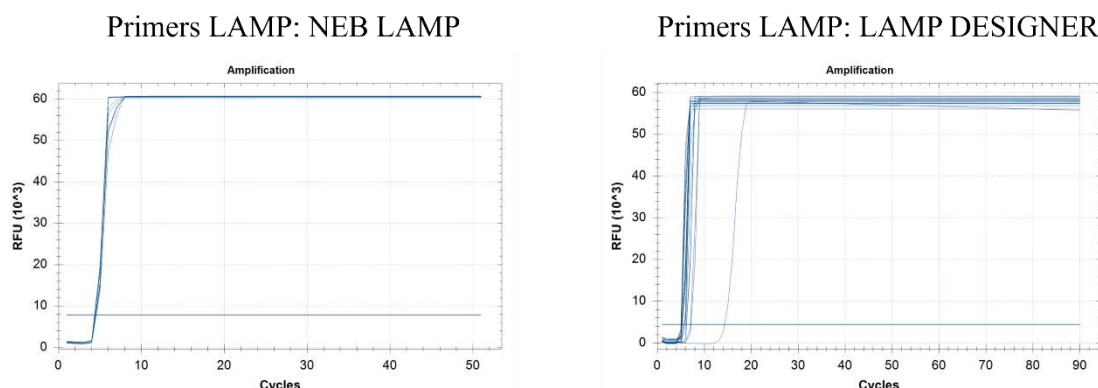


Figura 17. Curvas de amplificação obtidas por qPCR para os dois conjuntos de primers testados em amostras com e sem resistência, bem como no controle negativo. Observa-se amplificação consistente em todas as amostras, incluindo o controle negativo, indicando possível auto-hibridização dos primers ou amplificação inespecífica.

Para confirmação dos resultados, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 2%. A corrida eletroforética foi conduzida em tampão 1× Tris-Acetato-EDTA (TAE) contendo brometo de etídio (EtBr), com uma tensão constante de 85 V durante 60 minutos. As bandas foram visualizadas por fluorescência sob radiação ultravioleta, utilizando o transiluminador ChemiDoc™ XRS+ e o software Image Lab™ da Bio-Rad (Hercules, Califórnia). Foi confirmada a amplificação em todas as amostras, incluindo o controle positivo (Figura 18).

No mês de Agosto serão realizados novos testes com diferentes combinações de primers e se necessário irão desenhar-se novos primers.

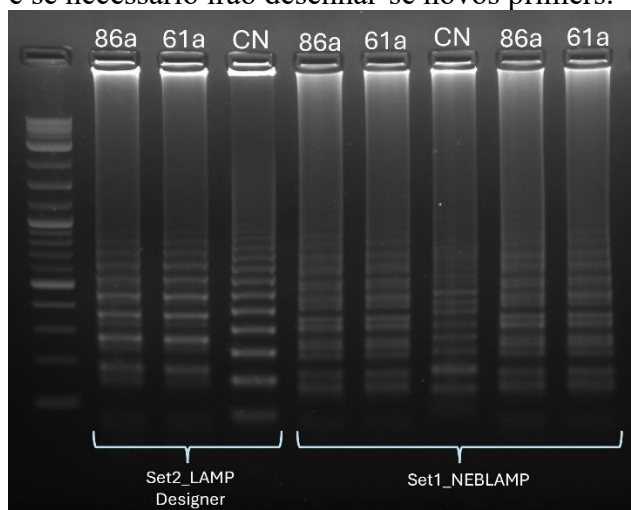


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose com os produtos amplificados de ambos os conjuntos de primers testados. Observa-se o padrão semelhante das bandas tanto nas amostras positivas como no controle negativo. Estes resultados confirmam os resultados da qPCR e evidenciam a necessidade de otimização adicional para evitar falsos positivos.

ATIVIDADE 3: DESENVOLVIMENTO DE UMA FERRAMENTA MOLECULAR PARA DETETAR AS MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA DA *V. DESTRUCTOR* AO AMITRAZ



TAREFA 3.1 DESENVOLVIMENTO DOS CONTROLOS POSITIVOS

Por favor, ver descrição da tarefa 2.1.



TAREFA 3.2 TESTAR OS PRIMERS DO GENE OCTB2R PARA SEQUENCIAÇÃO

A sequência do gene Oct β 2R foi obtida a partir do GenBank, com o número de acesso NW_019211458. Após uma revisão bibliográfica, verificou-se que ainda não existem primers descritos que permitam amplificar as mutações de resistência ao amitraz N87S e Y215H (Hernández-Rodríguez et al., 2022; Rinkevich et al., 2023).

No entanto, durante o desenvolvimento da presente investigação, foram identificadas mais duas novas mutações associadas à resistência ao amitraz: F290L, detetada em populações de ácaros em Espanha, e Y33F, identificada na Turquia (Hernández-Rodríguez et al., 2024; İnak et al., 2024).

Dado a proximidade entre as regiões codificantes das posições 215, 290 e 337, e considerando também a proximidade geográfica entre Portugal e Espanha, optou-se por desenhar dois pares distintos de primers: o primeiro direcionado exclusivamente à posição 87, e o segundo abrangendo as posições 215, 290 e 337.

Os novos primers foram desenvolvidos com a ferramenta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), onde foram inseridos o DNA-alvo da *V. destructor* do gene de referência octamine receptor beta-2R-like (acesso: XM_022808962.1) assegurando que os iniciadores amplifiquem de forma específica as regiões que contêm as mutações associadas à resistência ao amitraz.

A geração automática de pares de primers otimizados que devem cumprir os seguintes critérios específicos: (a) apresentar um comprimento entre 18 e 21 pb; (b) ter um teor de CG de aproximadamente 50%, com uma margem de variação de $\pm 10\%$; (c) exibir uma temperatura de fusão de 60°C , com uma tolerância de $\pm 3^{\circ}\text{C}$; (d) não formar homodímeros nem heterodímeros, evitando interações indesejadas que possam prejudicar a reação. Adicionalmente, é fundamental assegurar que a temperatura de fusão de “hairpins” seja inferior à temperatura de anelamento da reação de PCR, fixada a 50°C , e que o ΔG dos homodímeros seja superior a -9 kcal/mol, verificando ainda que os primers forward e reverse resultem em valores que indiquem uma ausência de formação de heterodímeros (Chicana, 2024).

Com base nestes dados, foram concebidos primers para a amplificação por PCR de dois fragmentos-alvo. O primeiro fragmento, com 468 pb, destina-se à deteção da mutação N87; o segundo, com 764 pb, abrange as mutações Y215, F290 e Y337 (Tabela 6).

Tabela 6. Primers desenhados para a *V. destructor* referente às mutações encontradas e relacionadas à resistência ao acaricida amitraz, utilizando o programa de concepção dos primers (Primer-BLAST).

Primers	Primer 1_N87	Primer 2_Y215; F290 e Y337
Forward	5' - CAAGTCGGTGGTGCTGATCT - 3'	5' - CACTCGAGTACCCGACGAAG - 3'
Reverse	3' - ACACACTCGTTCCGATGGTC - 5'	3' - AGCGGAATTGGCCTGTTGAA - 5'

Para amplificar a região de interesse, recorreu-se à reação de PCR, seguindo o mesmo protocolo de componentes descrito na Tarefa 2.2, conforme apresentado na Tabela 3.

No entanto, uma vez que os primers utilizados eram novos e não se conheciam as suas temperaturas ideais de anelamento, foi necessário realizar ensaios preliminares. Para o primeiro par de primers, cuja temperatura de anelamento recomendada pelo fabricante é de 60°C , testaram-se as temperaturas de 61°C , 62°C , 63°C e 64°C (Figura 19). Já

para o segundo par de primers, com recomendações distintas de temperatura — 63 °C para o primer forward e 58 °C para o primer reverse —, a PCR foi realizada às temperaturas de 63 °C, 64,5 °C, 65,5 °C e 66,2 °C (Figura 20), com o objetivo de avaliar o desempenho da amplificação sob diferentes condições térmicas.



Figura 19. PCR PRIMER AmitrazN87 com 468pb; Temperatura indicada primers: 60°C para o reverse e forward; annealing gradientes: 61°C, 62°C, 63°C e 64°C (Controlos negativos CN1: 61°C e CN2: 64°C) com 40x ciclos; Taq Polymerase: OneTaq DNA Polymerase; Concentração primer: 0,2uL/rx; Termociclador: 1; DNA ladder: 1kb Plus NewEngland.

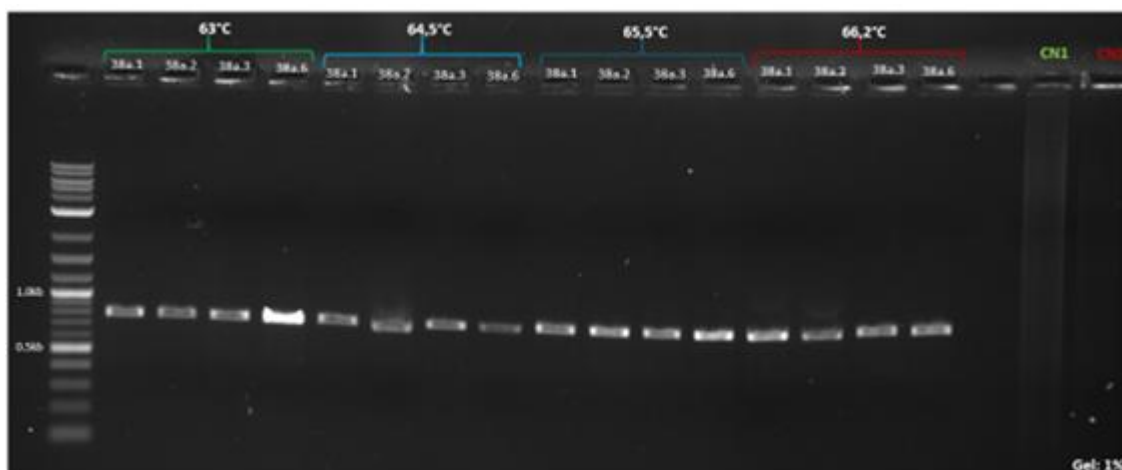


Figura 20. PCR PRIMER Amitraz215_290_337 com 764pb; Temperatura indicada primers: 63°C forward e 58°C reverse; annealing gradientes: 63°C, 64,5°C, 65,4°C e 66,2°C (Controlos negativos CN1: 63°C e CN2: 65,4°C) com 40x ciclos; Taq Polymerase: OneTaq DNA Polymerase; Concentração primer: 0,2uL/rx; Termociclador: 1; DNA ladder: 1kb Plus NewEngland.

Foram enviados para sequenciação de Sanger para a empresa Macrogen (Madri – Espanha), 16 amostras amplificadas com os primers para a mutação N87 (PCR PRIMER_1 AmitrazN87), com as temperaturas de anelamento de 62,5 °C e 63 °C, respetivamente. Apesar da presença de bandas visíveis em gel de agarose, nenhuma das amostras resultou em sequências válidas, sugerindo que, embora a amplificação tenha ocorrido, a qualidade ou especificidade do produto pode não ter sido adequada para a sequenciação.

Adicionalmente, foram enviadas para sequenciação de Sanger, 13 amostras amplificadas a 63 °C e 11 amostras a 65,5 °C, para as mutações Y215, F290 e Y337

(PCR PRIMER_2 Amitraz215_290_337). Neste caso, observou-se um melhor desempenho na temperatura de 63 °C, com obtenção de sequências de maior qualidade, o que levou ao envio de um número adicional de amostras amplificadas sob esta condição para sequenciação subsequente. Como mostrado na figura 21, observa-se que as sequências apresentam picos limpos e bem definidos, confirmando a qualidade do sequenciamento. Em todas as amostras analisadas, não foram detectados os alelos associados à resistência nas posições 215 (Y215) e 337 (Y337). No entanto curiosamente, dados preliminares indicam que 100% das amostras analisadas apresentam o alelo resistente na posição 290 (F290L), o que ainda está a ser investigado.

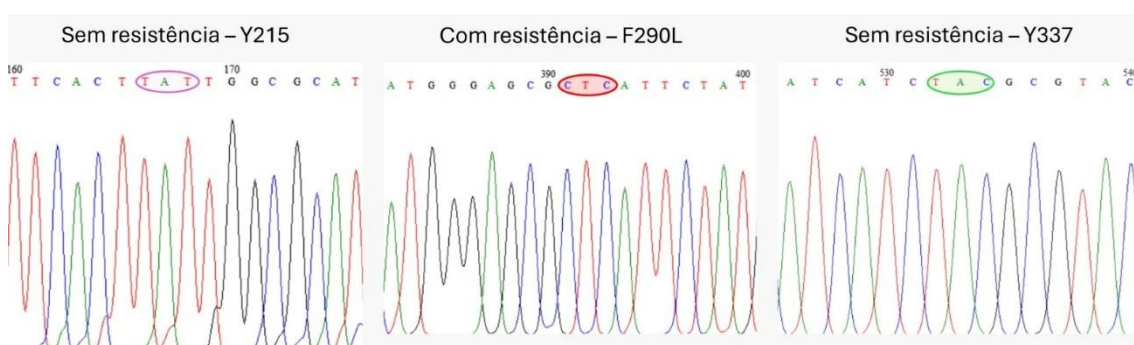


Figura 21. Gráficos das sequências de DNA mostrando as posições analisadas. As posições 215 (Y215) e 337 (Y337) não apresentam mutações, indicando ausência de resistência. No entanto, na posição F290, foi detetada uma mudança no DNA: em vez da sequência normal **TTC**, aparece **CTC**, o que está relacionado à resistência. Essa alteração (conhecida como F290L) foi encontrada em todas as amostras analisadas.

Importa salientar que todas as amostras foram provenientes da mesma reação de PCR, utilizando os mesmos reagentes e primers (para a respetiva mutação), sendo a temperatura de anelamento a única variável experimental entre os ensaios. Essa padronização foi realizada intencionalmente para garantir que quaisquer diferenças nos resultados observados fossem atribuídas exclusivamente à variação da temperatura, evitando interferências causadas por outros fatores experimentais.

TAREFA 3.3 DESENVOLVIMENTO DE UMA FERRAMENTA MOLECULAR QUE PERMITA DETETAR AS MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA DA *V. DESTRUCTOR* AO AMITRAZ

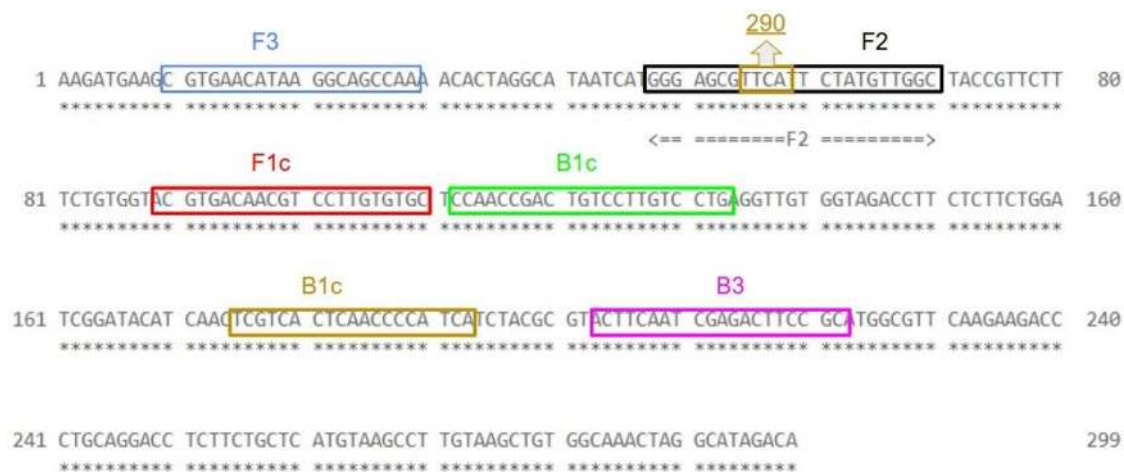
Nesta tarefa, está em desenvolvimento uma ferramenta molecular baseada na tecnologia Doctor Vida, que utiliza a metodologia LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification). O objetivo principal é distinguir entre populações de *Varroa destructor* resistentes e suscetíveis ao amitraz.

Com base nos dados gerados na Tarefa 3.2, foram analisadas regiões genéticas previamente associadas à resistência, com o intuito de identificar áreas conservadas e verificar a presença de mutações específicas detetadas em Portugal. Estas regiões são particularmente adequadas para o desenho de primers LAMP. O software utilizado para o desenho dos primers foi o NEB LAMP seguindo os mesmos critérios da tarefa 2.4.

Apesar de os primers já terem sido desenhados e verificados (Figura 22), é importante sublinhar que, caso todas as amostras sejam resistentes, a continuidade desta tarefa

poderá ser posta em causa, uma vez que não será possível distinguir entre varroas suscetíveis e resistentes.

Por esta razão, os primers ainda não foram testados em laboratório, dado que, neste momento, nos encontramos a investigar um caso específico de resistência associado à mutação F290, relacionada com a ação do amitraz. Todas as amostras analisadas até agora apresentaram 100% de positividade para esta mutação, o que levanta hipóteses relevantes sobre a possível fixação desta mutação na população portuguesa de varroa



ID:1	dimer dG: -2.13							
	5' pos	3' pos	len	Tm	5' dG	3' dG	% GC	(required oligos are orange)
F3	10	29	20	60.41	-5.35	-5.75	50	CGTGAACATAAGGCAGCCAA
B3	203	222	20	59.48	-6.54	-4.41	50	GCGGAAGTCTCGATTGAAGT
FIP			45					GCACACAAGGACGTTGTCACGT GGGAGCGTTCATTCTATGTIGGC
BIP			41					CCAACCGACTGTCCTTGTCCGTG TGATGGGGTTGAGTGACGA
F2	48	70	23	63.68	-6.54	-6.01	52	GGGAGCGTTCATTCTATGTTGGC
F1c	89	110	22	65.51	-6.06	-5.74	55	GCACACAAGGACGTTGTCACGT
B2	175	193	19	60.08	-4.91	-5.60	53	TGATGGGGTTGAGTGACGA
B1c	112	133	22	64.75	-5.61	-5.35	59	CCAACCGACTGTCCTTGTCCGTG

Figura 22. Quadro esquemático representando o desenho e os parâmetros dos primers obtidos por meio da ferramenta NEB LAMP Designer. São apresentados os primers externos (F3 e B3), internos (FIP e BIP, compostos por F2/B2 e F1c/B1c), bem como suas respectivas localizações na sequência-alvo. Os valores de Tm, ΔG e conteúdo GC indicam que os primers estão dentro dos intervalos ideais para a reação de LAMP. Destaca-se a posição 290 da sequência, onde os nucleotídeos "TTC" alteram-se para "CTC" quando ocorre a resistência.

ATIVIDADE 4: MONITORIZAÇÃO A NÍVEL NACIONAL DAS MUTAÇÕES DA RESISTÊNCIA DA *V. DESTRUCTOR* AOS PIRETRÓIDES E AO AMITRAZ



Apesar de esta tarefa estar inicialmente proposta para ser realizada no terceiro ano do projeto, ela já foi iniciada no segundo ano do projeto, devido aos seguintes fatores: (a) a necessidade de informar os apicultores sobre se suas colónias são suscetíveis ou resistentes aos acaricidas baseados em piretróides e amitraz, promovendo assim o desenvolvimento de estratégias adequadas para o controlo e contenção da varroose; (b) para termos uma representação nacional da variabilidade existente, facilitando assim as Tarefas 2.1, 2.3, 3.1 e 3.3.

Para a monitorização das mutações de resistência de *Varroa destructor* aos piretróides, foram já obtidos resultados de 245 amostras, provenientes de 226 colónias pertencentes a 82 apiários. Estas amostras foram submetidas à sequenciação de Sanger. No entanto,

não foi possível analisar 20 dessas amostras, uma vez que apresentaram problemas significativos: algumas não produziram qualquer sequência, enquanto outras revelaram níveis elevados de ruído ao longo da sequência. Estas amostras foram reencaminhadas para uma segunda ronda de sequenciação e, adicionalmente, foi extraída uma nova varroa da mesma amostra/colônia para repetir o processo. Apesar dessas tentativas, os resultados mantiveram-se inconclusivos, indicando um problema na qualidade original da amostra, possivelmente devido à degradação do DNA por diversos fatores ocorridos antes da chegada ao laboratório.

O mecanismo molecular de resistência da varroa aos piretróides é bem conhecido e está associado principalmente a uma mudança de um aminoácido na posição 925 do VGSC, onde normalmente se encontra uma leucina (L). Nesta posição existem descritos três alelos que conferem resistência aos piretróides, onde a leucina é substituída por uma valina (L925V), isoleucina (L925I), ou metionina (L925M) (Benito-Murcia et al., 2022; González-Cabrera et al., 2013, 2016, 2018; Millán-Leiva et al., 2021). O alelo L925V tem sido detetado nas populações Europeias (González-Cabrera et al., 2013, 2018; Millán-Leiva et al., 2021) enquanto os alelos L925I e L925M são característicos das populações dos EUA (González-Cabrera et al., 2016).

Uma nova mutação na posição 918 do VGSC, que está associada à resistência aos piretróides em artrópodes, foi descrita numa população da Comunidade Valenciana em Espanha (Benito-Murcia et al., 2022; Dong et al., 2014; Millán-Leiva et al., 2021; Rinkevich et al., 2013). Nessa população, o aminoácido metionina presente normalmente na posição 918 foi substituído por uma leucina (M918L) (Benito-Murcia et al., 2022; Millán-Leiva et al., 2021). Esta mutação aparece sempre em conjunto com a mutação L925V e pensa-se que pode levar uma maior resistência aos piretróides (Benito-Murcia et al., 2022; Millán-Leiva et al., 2021).

Das 245 amostras analisadas, 20 (8%) não apresentaram resultados válidos. Das restantes, 107 amostras (43,7%) revelaram a presença simultânea da mutação L925V — típica da Europa (González-Cabrera et al., 2013, 2018; Millán-Leiva et al., 2021) — e da mutação M918L, inicialmente identificada na Comunidade Valenciana, Espanha (Benito-Murcia et al., 2022). Apenas uma amostra (0,4%) apresentou isoladamente a mutação L925V e outra (0,4%) revelou a mutação L925M, esta última originalmente descrita nos Estados Unidos (González-Cabrera et al., 2013, 2018). Por outro lado, 116 amostras (47,3%) não apresentaram qualquer mutação associada à resistência aos piretróides, sendo, portanto, consideradas suscetíveis onde 3,4% dessas são heterozigóticas.

No entanto, quando se analisa a situação ao nível dos 82 apiários, observa-se um cenário distinto. Dois apiários (2,4%) não forneceram qualquer resultado, devido à falha em todas as amostras enviadas. Outros dois (2,4%) aguardam ainda a análise de amostras adicionais para que seja possível chegar a uma conclusão. Entre os apiários com resultados disponíveis, 21 (25,6%) apresentaram apenas amostras resistentes, 28 (34,1%) revelaram apenas amostras suscetíveis e 29 apiários (35,3%) apresentaram uma mistura de colônias resistentes e suscetíveis, evidenciando a coexistência de diferentes perfis genéticos de *V. destructor* dentro do mesmo apiário (Figura 23). Ainda serão analisadas mais amostras, com o objetivo de abranger de forma mais equilibrada todo o território nacional. Verifica-se, até ao momento, uma menor representatividade de amostras provenientes do sul do país, mas essa lacuna deverá ser colmatada em breve com as amostras recentemente recolhidas.

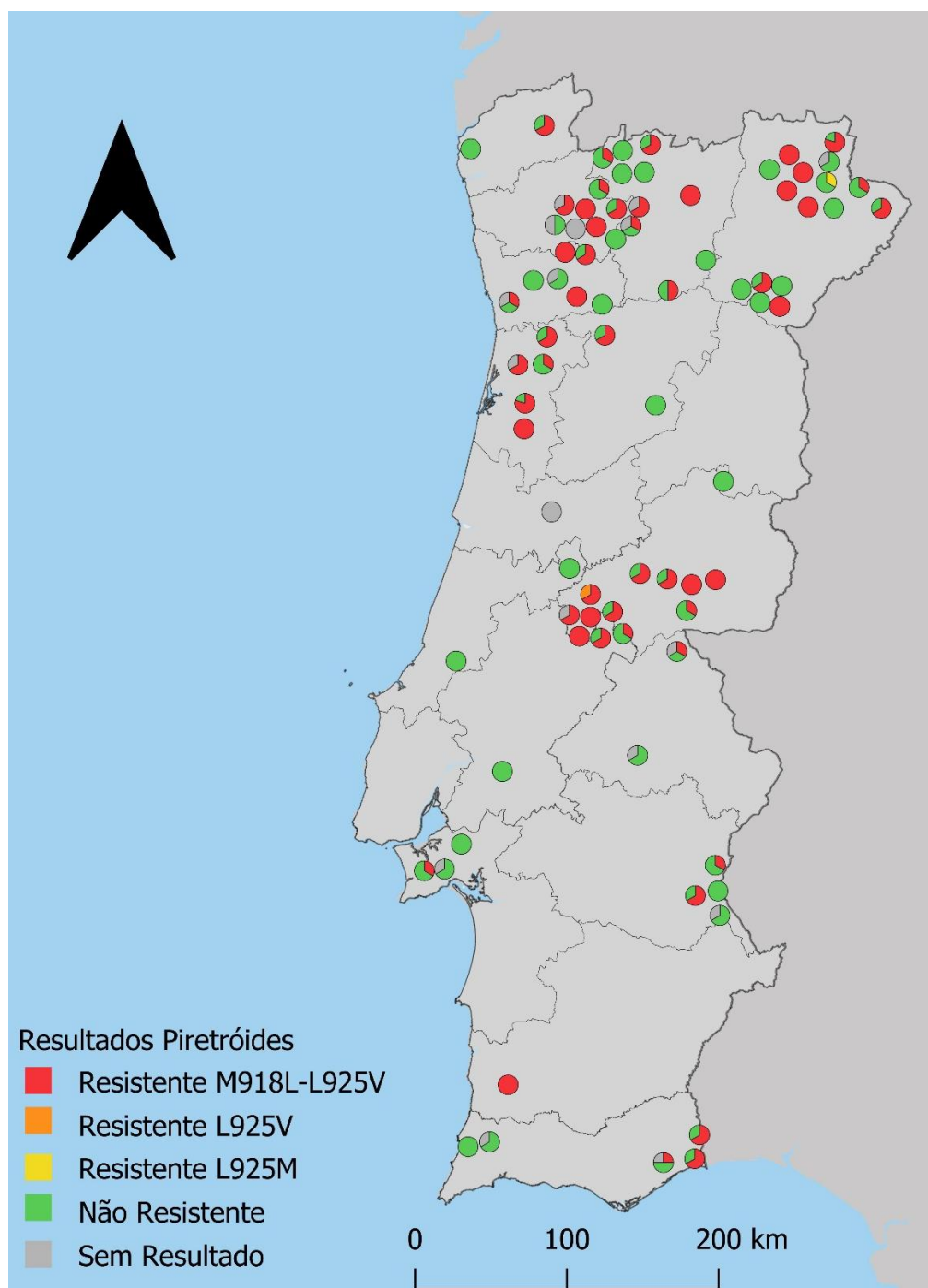


Figura 23. Distribuição geográfica das mutações associadas à resistência de *Varroa destructor* aos piretróides por apiário.

ATIVIDADE 5: MONITORIZAÇÃO A NÍVEL NACIONAL DAS MUTAÇÕES DO DWV



Apesar de esta atividade estar originalmente prevista para o quinto ano do projeto, sua execução foi antecipada neste ano devido a alguns fatores: (a) a disponibilidade das amostras após a etapa de campo realizada pela equipe MITE junto aos apicultores; e (b) como as amostras de abelhas estavam armazenadas a -80 °C no laboratório, optamos por iniciar as análises com antecedência. Essa decisão visou não apenas otimizar o uso do espaço de armazenamento, que também é compartilhado com o restante do grupo, mas

também adiantar uma etapa que já estava planejada, contribuindo para uma melhor organização do projeto.

Conforme referido na Tarefa 1.3 e ilustrado no mapa da Figura 6, foram recolhidas amostras de 75 apiários, totalizando 229 amostras. Cada amostra corresponde a uma colônia, tendo sido coletadas junto ao apiário, com abelhas vivas, e imediatamente armazenadas em gelo seco. Posteriormente, no laboratório, as amostras foram mantidas a -80 °C para evitar a degradação do RNA.

TAREFA 5.1. EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA foi realizada em 169 amostras de abelhas, precedida por uma etapa de maceração. Para isso, trinta abelhas adultas fêmeas foram transferidas para um saco estéril com filtro (BA6040(R)), ao qual foram adicionados 6 mL de água DEPC fria (água tratada com dietilpirocarbonato, utilizada para inativar RNases, enzimas que degradam o RNA). A escolha de 30 indivíduos baseou-se em protocolos padronizados para diagnósticos moleculares, como PCR e RT-qPCR, sendo esse número considerado suficiente para representar a carga viral da colônia e permitir a detecção de patógenos sem a necessidade de amostragem de todos os indivíduos (Dietemann et al., 2013).

A maceração foi realizada no equipamento VWR® Star-Blender® Digital, a 300 rpm por 60 segundos, seguida de uma pausa de 30 segundos e nova maceração por mais 30 segundos. Todas as etapas foram conduzidas sobre gelo. O líquido homogêneo obtido foi, então, transferido para um tubo estéril de 5 mL para posterior processamento.

Para a extração de RNA, transferiram-se 500 µL do macerado para um tubo de 2 mL contendo esferas de zircônia de 3 mm (Specanalítica). A esse tubo, foram adicionados 800 µL do tampão de lise de RNA Monarch. A homogeneização mecânica foi realizada utilizando o homogeneizador Precellys evolution (Bertin Technologies), com o protocolo de 6200 rpm por 5 segundos, repetido três vezes. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 2 minutos a $16.000 \times g$ para a precipitação dos detritos celulares. As seguintes etapas foram realizadas utilizando o kit de extração de RNA Monarch total RNA miniprep, (New England, Biolabs).

TAREFA 5.2. PREPARAÇÃO DE CDNA

A concentração do RNA foi medida com espectrofotômetro (NanoDrop SpectroSTAR nano BMG Labtech, BMG LABTECH's comprehensive software), e foram feitas diluições para obtenção de uma concentração final de 250 ng/µL, utilizando a água livre de nucleases.

O kit iScript foi utilizado para a síntese de cDNA. Para reações de 10 µL, utilizaram-se 4,0 µL de RNA, 2,00 µL do tampão 5× iScript, 0,50 µL de iScript e 3,50 µL de água livre de nucleases. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador (Bio Rad T100 thermal cycler) com a tampa aquecida a 105 °C, utilizando a seguinte programação: 5 minutos a 25 °C para a etapa de priming, 20 minutos a 46 °C para a transcrição reversa e 1 minuto a 95 °C para a inativação da transcriptase reversa, sendo opcional a etapa final de manutenção a 4 °C para manter a amostra em conservação durante um determinado período. A partir do cDNA total obtido, foram preparadas alíquotas diluídas na proporção 1:10, usando 2 µL de cDNA e 18 µL de água, em tiras de PCR. A alíquota e o cDNA stock foram armazenadas a -20 °C.

TAREFA 5.3. REAÇÕES EM TEMPO REAL (QPCR)

Previamente, 49 amostras já foram analisadas por qPCR. As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas utilizando o equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Cada reação tinha como volume final 10 μ L e era constituída por: 1 μ L de primer forward (5 μ M), 1 μ L de primer reverse (5 μ M), 5 μ L de SYBR Green (Universal SYBR Green Supermix 2X; BioRad, CA, USA) e 3 μ L de cDNA previamente diluído 1:10.

Dois conjuntos de primers foram utilizados. O primeiro teve como alvo o gene RPL8, um gene constitutivo de *Apis mellifera*, aplicado em cada amostra com o objetivo de confirmar a eficiência da extração do RNA e da síntese do cDNA antes da análise viral, uma vez que esse gene é expresso de forma constante em todas as células (Lopes et al., 2024). O segundo conjunto teve como alvo o vírus DWV, utilizando primers específicos para o gene da proteína RNA-dependente RNA-polimerase (RdRp). Os primers estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Primers utilizados para detecção e quantificação de DWV (forward e reverse) e RPL8 (forward e reverse).

Primers	Sequência dos primers	Tamanho fragmento	Referência
DWV- F	5'- TACTAGTGCTGGTTTTCCTTT -3'	210pb	Lopes et al., 2024
DWV-R	5'- CAAGTATCCTTCAACAATC -3'		
RPL8- F	5'- TGGATGTTCAACAGGGTTCATA -3'	121pb	Evans, 2006
RPL8-R	5'- CTGGTGGTGGACGTATTGATAA-3'		

A programação térmica aplicada para o DWV é específica, tendo sido anteriormente otimizada, incluiu uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 30 s, seguida de 40 ciclos de amplificação com: desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 56 °C por 20 s e extensão a 60 °C por 30 s, com leitura de fluorescência ao final de cada ciclo. Em seguida, foi realizada a curva de dissociação para confirmar a especificidade do produto amplificado, iniciando com 15 s a 95 °C, seguido de incubação a 65 °C por 1 minuto. Após essa etapa, a temperatura foi aumentada gradualmente em incrementos de 0,5 °C a cada 5 s até atingir 95 °C, com leitura de fluorescência a cada incremento (Figura 24).

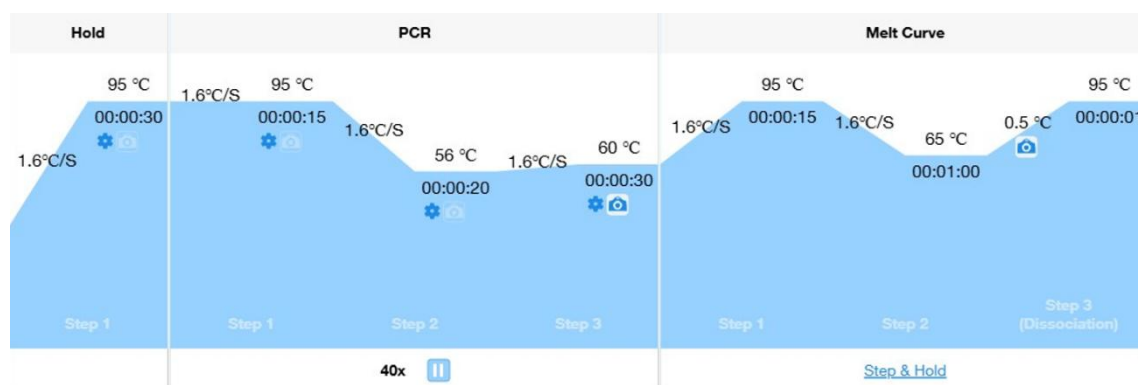


Figura 24. Representação gráfica da programação térmica utilizada no ensaio de RT-qPCR para detecção do DWV. O gráfico apresenta as etapas de desnaturação, anelamento e curva de dissociação, com indicação das temperaturas (eixo Y, °C) e ciclos/tempo (eixo X).

O protocolo térmico utilizado para o gene RPL8 apresenta diferenças, em relação ao DWV, apenas nos parâmetros de temperatura e duração de cada etapa (Figura 25).



Figura 25. Programação térmica aplicada ao gene RPL8 durante o ensaio de RT-qPCR. O gráfico apresenta as etapas de desnaturação, anelamento, extensão e dissociação. O eixo X indica o tempo/ciclos e o eixo Y, a temperatura (°C).

Todas as amostras foram analisadas em duplicado tanto para o RPL8 como para o DWV. A repetição é recomendada para aumentar a precisão e confiabilidade dos resultados, permitindo identificar e minimizar erros, estimar a variabilidade dos dados e confirmar se os resultados obtidos são consistentes (Schurr et al., 2019). A disposição das amostras no equipamento QuantStudio 5 RealTime PCR System (Thermo Fisher Scientific) para a análise do DWV está exemplificada na figura 26. A primeira análise, denominada qPCR01, teve 32 poços (com os controlos positivos e negativos), e a segunda análise (qPCR02) com 96 poços e os respetivos controlos.



Figura 26. Configuração da placa de RT-qPCR, com disposição das amostras em duplicado e dos controlos positivo e negativo no primeiro e segundo ensaio (qPCR 01 e qPCR 02, respetivamente).

TAREFA 5.4. AMPLIFICAÇÃO RPL8 E DWV

Todas as amostras em teste mostraram ser positivas para o gene RPL8 com ciclos de amplificação entre 08-35 validando a extração de RNA e a síntese de cDNA. A amplificação do DWV neste ensaio encontra-se ilustrada na Figura 27 (a).

As curvas-padrão para análise viral foram estabelecidas a partir de plasmídeos recombinantes adquiridos dos serviços de síntese de genes da NZYTech Genes & Enzymes Company, Lisboa, Portugal. A quantificação absoluta de cada vírus foi calculada utilizando uma curva-padrão duplicada contendo sete pontos de calibração constituídos por diluições de 10 vezes de um padrão de referência específico para o ensaio em questão e de concentração conhecida, variando de 10^1 a 10^7 cópias/ μ L de modelo (Lopes et al., 2024). A amplificação do DWV foi observada entre os ciclos 0 e 35, com base na curva padrão (Figura 28). Todas as amostras foram consideradas positivas se apresentassem amplificação antes do último ponto da curva padrão,

evidenciando um aumento exponencial na curva de amplificação e exibindo um perfil de fusão compatível com a temperatura de fusão dos controles positivos.

Os gráficos de amplificação obtidos representam o acúmulo de produto fluorescente ao longo do ensaio de qPCR, sendo gerados a partir do sinal fluorescente de cada amostra, representado graficamente em função do número de ciclos. Em análises de qPCR, quanto mais tardia é a amplificação (ou seja, quanto maior o número de ciclos necessário para ultrapassar o limiar de detecção), menor é a fiabilidade dos resultados, uma vez que aumentam as chances de ruído de fundo, amplificações inespecíficas ou produtos não desejados. A amplificação do DWV neste ensaio encontra-se ilustrada na Figura 27 (b).

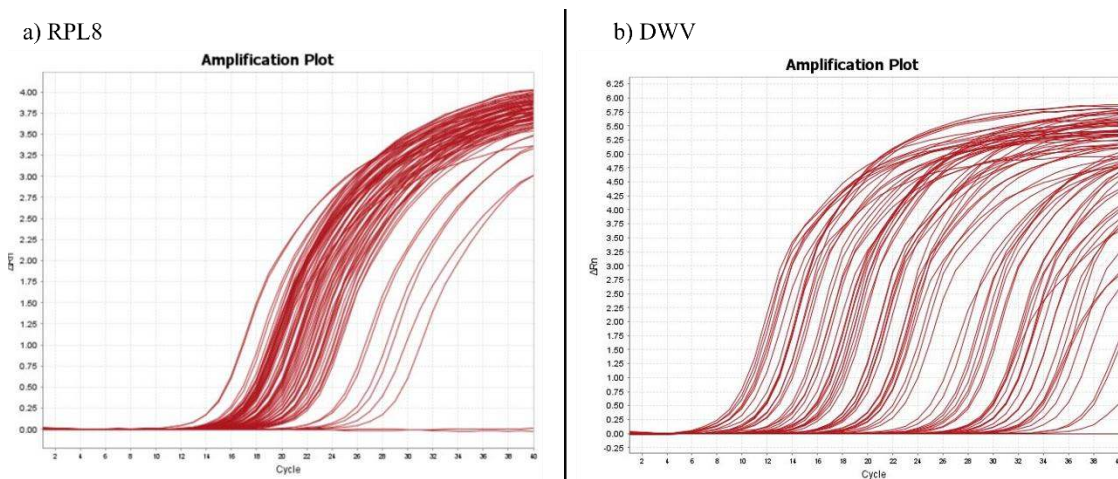


Figura 27. Curvas de amplificação do (a) RPL8 e (b) DWV obtidas nas reações de RT-qPCR. O eixo Y representa os valores de ΔRn , calculados pela subtração entre a fluorescência normalizada da amostra (Rn) e a do controlo de fundo. O eixo X indica o número de ciclos de amplificação.

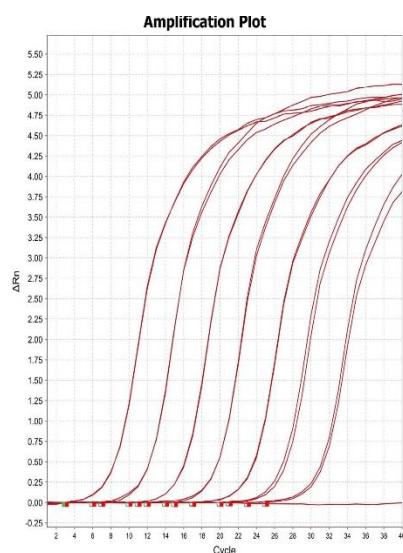


Figura 28. Curva padrão da amplificação do DWV, realizada em duplicata. A curva é composta por sete pontos de calibração, provenientes de diluições seriadas do controlo positivo. O eixo Y representa os valores de ΔRn , calculados pela subtração entre a fluorescência normalizada da amostra (Rn) e a do controlo de fundo. O eixo X indica o número de ciclos de amplificação.

TAREFA 5.4.1 CURVA DE DISSOCIAÇÃO

A curva de dissociação envolve o aumento gradual da temperatura enquanto se verifica a fluorescência, que muda à medida que o material genético se desnatura. Amostras

negativas e com pouca carga viral produzem baixa fluorescência, resultando em curvas pouco definidas ou inexistentes, já as amostras positivas, especialmente aquelas com carga viral moderada a alta, apresentam maior intensidade de fluorescência (Ruijter et al., 2019), o que permite a geração de curvas de dissociação bem definidas e compatíveis com o DWV ($77^{\circ}\text{C} < T_m < 81^{\circ}\text{C}$) e RPL8 ($T_m = 78^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). A curva de dissociação do RPL8 e DWV é evidenciada na figura 29.

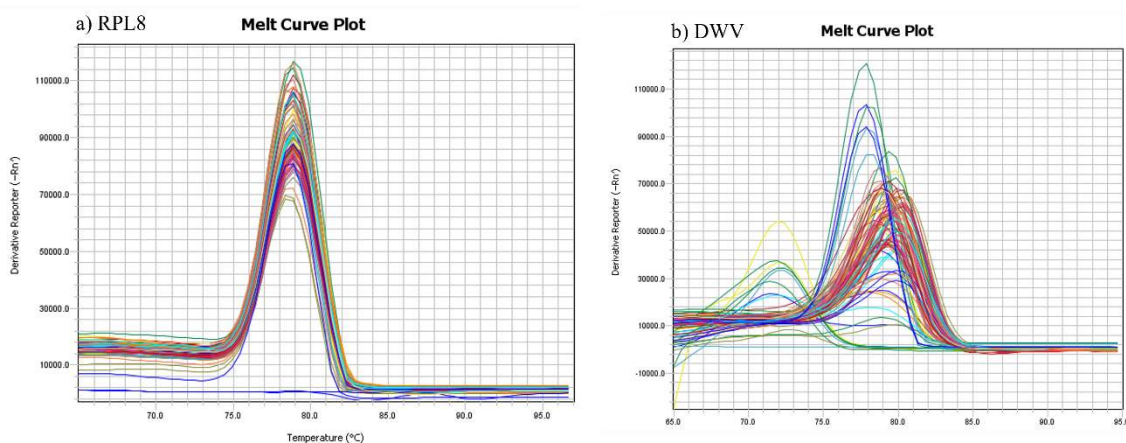


Figura 29. Curvas de dissociação geradas a partir dos ensaios de RT-qPCR para detecção do (a) RPL8 e (b) DWV, com o eixo Y representando o derivative reporter ($-dF/dT$) e o eixo X a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Um fator importante a considerar na interpretação das curvas de dissociação é a possível presença de diferentes variantes do DWV. A variante DWV-A é geralmente associada a uma temperatura de dissociação (T_m) mais elevada, resultando em picos mais altos e definidos na curva. Por outro lado, a variante DWV-B apresenta T_m mais baixa e, consequentemente, picos ligeiramente deslocados para a esquerda no gráfico (Martin et al., 2012). A distinção entre as variantes DWV-B e C, contudo, é mais complexa, uma vez que estas podem partilhar T_m semelhantes, tornando a diferenciação apenas por curva de melting inconclusiva (Kevill et al., 2017).

Em relação a temperatura de dissociação do produto de PCR, quando o produto amplificado é específico, a curva mostra um pico definido no gráfico de derivada de fluorescência ($-dF/dT$). Se há pouco ou nenhum produto amplificado, esse pico será muito baixo ou ausente. No gráfico de T_m1 , é possível observar que os desvios da média de T_m correspondem à amostras com baixa carga viral, ou consideradas negativas (Figura 30).

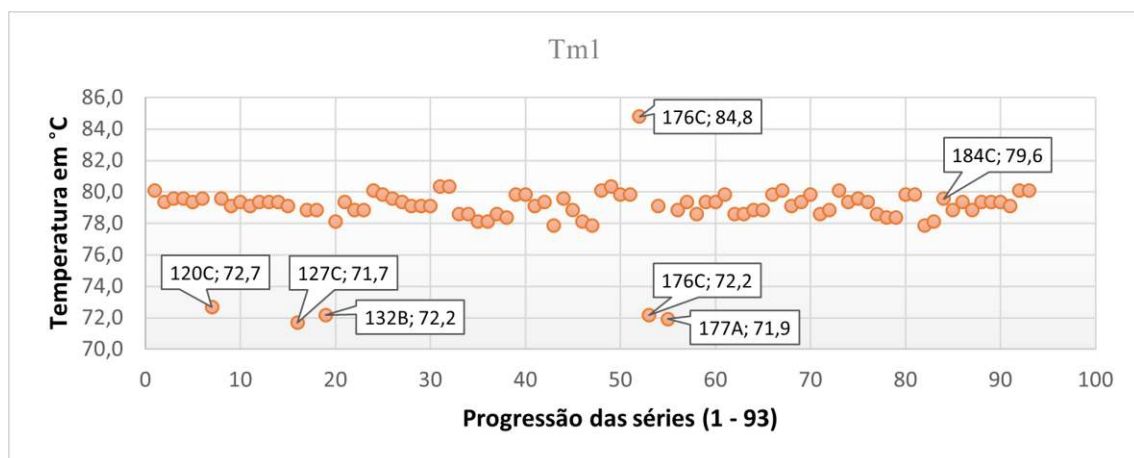


Figura 30. Temperatura de dissociação (eixo Y) para as 49 amostras analisadas (eixo X). As amostras com maior dispersão nos valores — 120C, 127C, 132B, 176C, 177A e 184C — estão destacadas no gráfico.

As amostras que se encontram com maior dispersão no gráfico, identificadas como: 120C, 127C, 132B, e 177A, são marcadas como negativas, pois, apenas um dos duplicados amplificou e revelou a T_m específica, sendo que a outra réplica mostrou estar fora do padrão de referência de 77 °C - 80 °C. Este resultado sugere que algum fator pode ter interferido gerando inespecificidade. Na amostra 176C ambos os duplicados ($T_m = 84,788$ °C e 72,174 °C) mostraram curvas de dissociação inespecíficas, sendo classificadas como negativas. No caso da amostra 184C, embora o C_t esteja no intervalo esperado para ser considerada positiva, a sua curva de dissociação apresenta um padrão anormal. Entretanto, é válido apontar que, mesmo com baixa carga viral, ainda pode existir vestígios do vírus na amostra, mas em carga diminuída.

TAREFA 5.4.2 ANÁLISE GEOGRÁFICA: PREVALÊNCIA E CARGA VIRAL DWV

Das 49 amostras analisadas, 6 (12,2%) apresentaram resultado negativo para a presença do vírus, enquanto as demais 43 (87,8%) indicaram positividade para o *Deformed Wing Virus* (DWV), evidenciando uma elevada prevalência viral nas regiões amostradas de Portugal. Dez amostras (20,4%) foram identificadas exclusivamente como pertencentes à variante DWV-A. Outras 26 amostras (53%) revelaram perfis de curva de dissociação intermediários entre as variantes DWV-A e DWV-B, sugerindo uma possível recombinação genética entre essas duas variantes (Sircoulomb et al., 2025). Além disso, 7 amostras (14%) apresentaram perfis compatíveis com as variantes DWV-B ou DWV-C — sendo mais provável que se trate da DWV-B, uma vez que esta é a mais frequentemente detetada, enquanto a DWV-C é considerada rara (Mordecai et al., 2016). Para a identificação precisa desses últimos casos, recomenda-se a realização de abordagens complementares, como a sequenciação dos produtos amplificados. A figura 31 apresenta o mapa com a distribuição geográfica das amostras positivas, discriminando as variantes virais detetadas em cada localidade analisada.

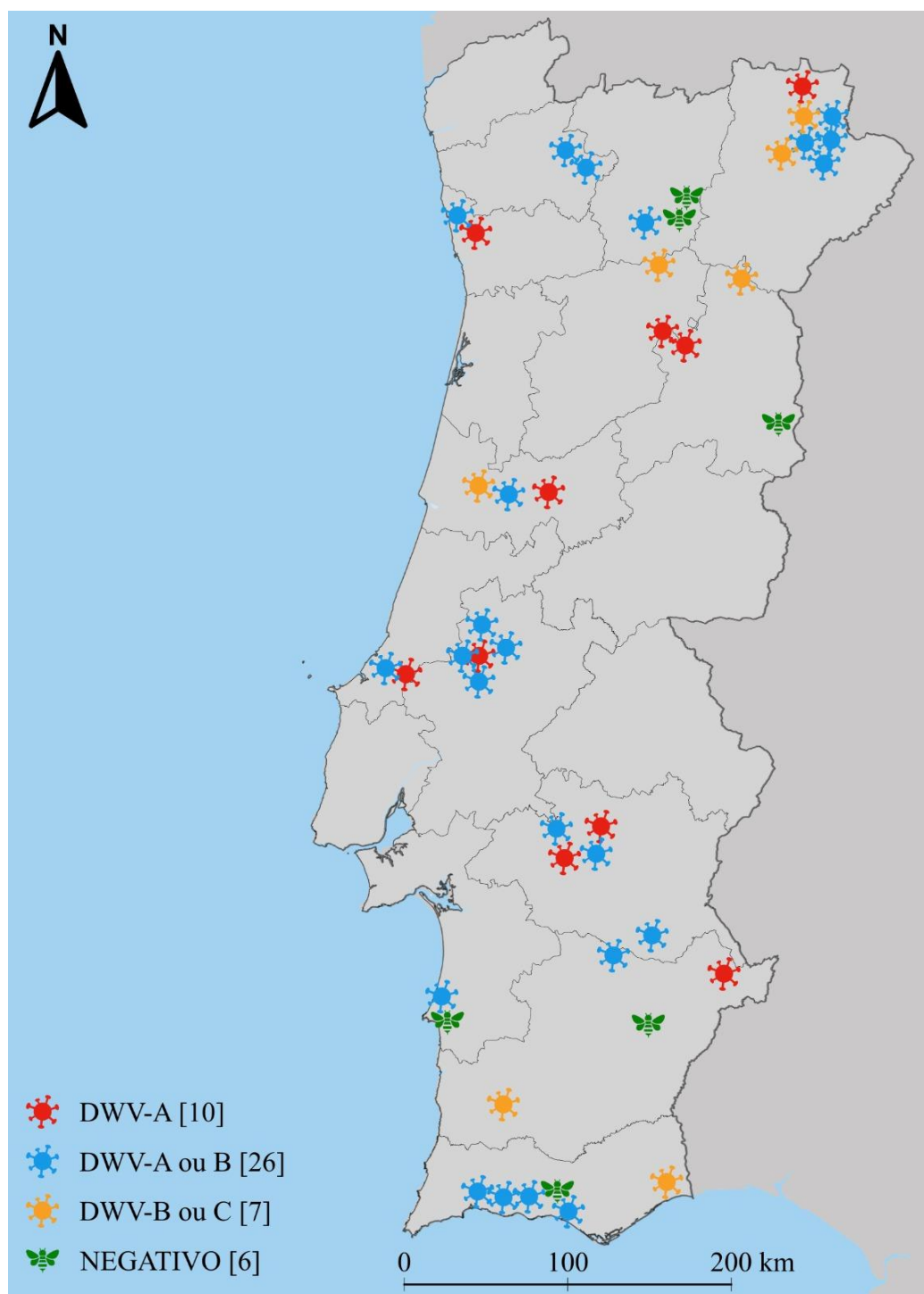


Figura 31. Mapa com a distribuição geográfica das amostras positivas, discriminando as variantes virais detetadas em cada localidade.

Adicionalmente, as amostras foram, então, classificadas em três categorias — alta, média e baixa — com base nos valores de Ct (Cycle threshold) conforme apresentado na Tabela 8. Os valores de Ct correspondem ao número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência ultrapasse o limiar de detecção durante a PCR em tempo real, indicando a presença do material genético alvo (Oswald, 2023). Valores do limiar de ciclo (Ct) que não são referenciados a uma curva padrão não podem ser interpretados como valores quantitativos absolutos (Vogels et al. 2020). Por esse motivo, utilizámos como referência a curva padrão apresentada na Figura 28. Neste estudo, as amostras

com valores de Ct superiores a 33 foram consideradas negativas, tendo em conta outras circunstâncias experimentais.

Os valores DWV foram convertidos em cópias DWV/reação utilizando uma série de diluições de 7 etapas e 10 vezes de padrões de referência externos e, posteriormente, em cópias/abelha utilizando os vários fatores de diluição incorridos durante a extração de RNA e síntese de cDNA (Lopes et al., 2024).

Tabela 8. Classificação dos valores de Ct (Cycle threshold).

Categoria	Ct médio e nº cópias/abelha	Descrição
Alto	5 – 15 ($>10^8$)	Amplificação detetada precocemente (alta carga viral)
Médio	15 – 25 ($10^5 - 10^8$)	Amplificação com deteção moderada (carga viral moderada)
Baixo	25 – 35 ($10^2 - 10^4$)	Amplificação tardia (baixa carga viral)

Das 17 amostras provenientes da região Sul, três foram negativas. Entre as 14 amostras positivas, observou-se uma predominância de carga viral alta (N=6), seguida da carga viral baixa (N=5). Na região Centro, das 18 amostras analisadas, uma foi negativa, sendo a maioria das restantes classificadas com carga viral média (N=10).

Relativamente à região Norte, das 14 amostras analisadas, duas foram negativas. Entre as 12 amostras positivas, verificou-se uma distribuição equilibrada entre as categorias de carga viral alta e média (N=5 cada), sendo que apenas duas amostras apresentaram valores de Ct compatíveis com carga viral baixa. A Figura 32 apresenta a distribuição da carga viral nas amostras positivas das regiões Norte, Sul e Centro.

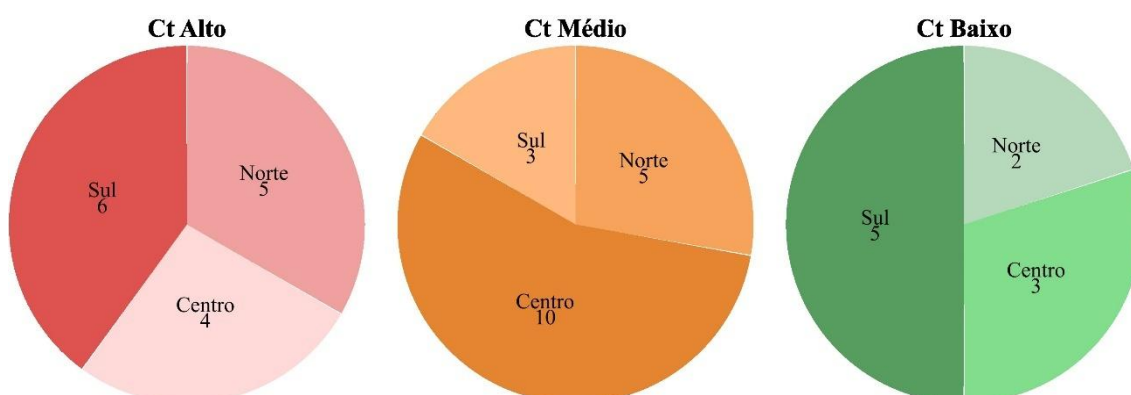


Figura 32. Gráficos das cargas virais alta, média e baixa em correlação com as regiões Sul, Centro e Norte de Portugal.

Por fim, o DWV está presente nas três regiões descritas em Portugal continental, sendo distribuído em 12 dos 13 distritos analisados e com alta, média e baixa carga viral. Com a prevalência de 87,76% em toda a amostragem, é possível evidenciar que há presença do vírus nas regiões geográficas analisadas, com diferentes cargas virais. A região central demonstrou ter a maior prevalência e a maioria das amostras com carga viral média, ademais, a região Sul e Norte também salientaram alta e média carga viral com dispersão relativamente homogênea entre os distritos. Contudo, somente o distrito de Vila Real demonstrou ser o único classificado como negativo, sendo necessário analisar um maior número de colónias para compreender a verdadeira realidade epidemiológica no distrito.

Os níveis elevados e intermédios de carga viral, bem como a elevada frequência de amostras positivas observadas em diferentes regiões e distritos de Portugal continental,

poderão estar associados à presença do ácaro *V. destructor* e à disseminação de variantes com maior capacidade replicativa e transmissibilidade, como o caso do DWV-B.

No entanto, estes fatores não são os únicos a considerar, uma vez que permanece uma parte significativa das amostras por analisar. Para uma confirmação mais rigorosa dos resultados, torna-se essencial concluir a extração e a análise das amostras remanescentes.

ATIVIDADE 6: COMUNICAÇÃO E DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Atividades de comunicação e divulgação realizadas no terceiro ano do projeto:

- Resumo e apresentação em formato poster: Costa, M. et al. (2024). Resistance of *Varroa destructor* to pyrethroids: A preliminary analysis in Portugal. EURBEE 2024: 10th European Conference of Apidology, 16-19 setembro, Tallinn, Estónia.
- Resumo e apresentação em formato poster: Costa, M. et al. (2024). Challenges in varroosis control: Preliminary investigation of amitraz resistance in *Varroa destructor* in Portugal. EURBEE 2024: 10th European Conference of Apidology, 16-19 setembro, Tallinn, Estónia.
- Participação no convívio dos Apicultores promovido pelo Cantinho das Abelhas (28/09/2024).
- Participação no workshop “Preparação das colmeias” promovido pela Macmel (5/10/2024)
- Participação do XXII Fórum Nacional de Apicultura (15-17/11/2024)
- Resumo e apresentação em formato poster: Costa, M., Yadró, C., Lopes, A. R., Quaresma, A., Rodrigues, C., Pinto, M. A., & Henriques, D. S. M. (2024). Distribution of alleles linked to pyrethroid and amitraz resistance in *Varroa destructor* across Portugal. XX ENBE, Vila do Conde, Portugal.
- Resumo e apresentação em formato poster: Costa, M., Yadró, C., Lopes, A. R., Bejaoui, M. K., Almeida, J., Correia, L. B., Sánchez, S., et al. (2025). Development of LAMP primers for the detection of pyrethroid resistance mutations in *Varroa destructor*. VI International Conference of the Portuguese Society of Genetics, Oeiras, Portugal.
- Costa, M., Rodrigues, C. A., Silva, A. M. P. L., Yadró, C. A., Lopes, A. R., Pérez-Pérez, A., Martín-Hernández, R., Higes, M., Valério, M. J., Capela, N., Pinto, M. A., & Henriques, D. (ano). Resultados do questionário efetuado no âmbito do projeto Mite: Monitorização nacional da varroa e saúde das abelhas em Portugal. Revista Voz do Campo. Submetido para publicação.
- Rodrigues, C. A., Costa, M., Yadró, C., Lopes, A. R., Li, F., Pinto, M. A., & Henriques, D. (ano). Luta contra a Varroose: Base molecular da resistência



da varroa aos acaricidas sintéticos. Revista Voz do Campo. Submetido para publicação.

ATIVIDADE 7: GESTÃO E ACOMPANHAMENTO DO PROJETO

Esta tarefa será da responsabilidade da entidade gestora, Fenapícola, e pretende assegurar uma gestão financeira eficaz do projeto em que os objetivos sejam cumpridos de acordo com o calendário estabelecido.

ANEXO II-INQUÉRITO

Questionário disponível em:

<https://forms.gle/9rQEbZNMnJf94mFT6>



Questionário MITE

Caro(a) apicultor(a),

Este questionário está inserido no âmbito do projeto MITE- Varroa e vírus transmitidos: Monitorização de mutações e desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras, financiado pelo Programa Apícola Nacional.

Desde já agradecemos a sua participação neste questionário, que tem como objetivo perceber as medidas de controlo de varroose usadas pelos apicultores.

O preenchimento do questionário demorará sensivelmente 5 minutos.

Este questionário respeita a liberdade de escolha de cada participante. Trata-se de um inquérito de participação voluntária, podendo o participante deixá-lo sem qualquer consequência.

No que respeita ao tratamento de dados, é cumprido o estipulado no Regulamento Geral de Proteção de Dados (RGPD), estando assegurada a segurança, proteção, anonimato e confidencialidade de todos os dados facultados pelos participantes. Os dados serão apenas acedidos pelos investigadores do estudo e os resultados serão apresentados de forma agregada e anónima.

Caso tenha alguma dúvida, poderá entrar em contacto pelo email dorasmh@ipb.pt (Investigadora Dora Henriques, Centro de Investigação de Montanha), apinto@ipb.pt (Professora Doutora M. Alice Pinto, Instituto Politécnico de Bragança) e/ou a federação Fenapícola (fenapicola@confagri.pt).

Agradecemos a sua disponibilidade! Muito Obrigado!

1. Ao participar neste questionário aceito o tratamento e análise estatística dos dados que forneci de forma voluntária.

☐ Sim

☐ Não

2. Aceita participar no projeto MITE? Se sim, o projeto requer a amostragem de pelo menos 5 varroas/colónia de 3 colónias do seu apiário.

☐ Sim

☐ Não

1. Informação sobre o Apicultor

1. Nome e Apelido *

2. Nomeie o local (concelho) onde está localizado o(s) apiário(s) amostrado(s) *
e/ou insira as coordenadas geográficas aproximadas das colónias amostras.
Esta informação é crucial para a análise espacial dos dados.

3. Que tipo de apicultura pratica? *

Escolher apenas uma opção

☐

Convencional

☐

Em modo de produção biológico

Medidas de controlo

4. Que medidas de controlo da varroa utiliza? *

Pode escolher mais do que uma opção

☐

Utilização de varrocidas

☐

Substituição de rainhas com mais de 24 meses

☐

Substituição regular de ceras/quadros

☐

Utilização de estrados sanitários

☐

Desdobramento de colónias

☐

Eliminação de alvéolos de zangão

☐

Interrupção da criação (enjaulamento da rainha)

☐

Criação de rainhas resistentes à varroa

☐

Outra

4a. Se respondeu outro à questão anterior (questão 4). Por favor, indique qual.

5. Que medicamento(s) veterinário(s) usa para combater a varroa? **Pode escolher mais do que uma opção.*

- ☐ Amicel (Amitraz)
- ☐ API-Bioxal (Ácido Oxálico)
- ☐ APIFOR (Ácido Fórmico)
- ☐ APIGUARD (Timol)
- ☐ APILIFE (Timol)
- ☐ Apistan (Tau-Fluvalinato)
- ☐ Apitraz (Amitraz)
- ☐ Apivar (Amitraz)
- ☐ Dany's BienenWoh (Ácido oxálico)
- ☐ FORMIVAR (Ácido fórmico)
- ☐ MAQS Ácido fórmico
- ☐ Oxuvar (Ácido oxálico)
- ☐ Oxybee (Ácido oxálico)
- ☐ Polyvar (Flumetrina)
- ☐ THYMOVAR (Timol)
- ☐ VarroMed (Ácido fórmico e Ácido oxálico)
- ☐ Outro

5a. Se respondeu outro à questão anterior (questão 5). Por favor, indique qual.

6. Quantos tratamentos faz por ano? **Escolher apenas uma opção*

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ 4
- ☐ ≥ 5

7. Quando efetuou o último tratamento? *

Exemplo: 7 janeiro 2019

8. Qual o último tratamento que aplicou? **Pode escolher mais do que uma opção*

- ☐ Amicel (Amitraz)
- ☐ API-Bioxal (Ácido Oxálico)
- ☐ APIFOR (Ácido Fórmico)
- ☐ APIGUARD (Timol)
- ☐ APILIFE (Timol)
- ☐ Apistan (Tau-Fluvalinato)
- ☐ Apitraz (Amitraz)
- ☐ Apivar (Amitraz)
- ☐ Dany's BienenWoh (Ácido oxálico)
- ☐ FORMIVAR (Ácido fórmico)
- ☐ MAQS Ácido fórmico
- ☐ Oxuvar (Ácido oxálico)
- ☐ Oxybee (Ácido oxálico)
- ☐ Polyvar (Flumetrina)
- ☐ THYMOVAR (Timol)
- ☐ VarroMed (Ácido fórmico e Ácido oxálico)
- ☐ Outro

8a. Se respondeu outro à questão anterior (questão 8). Por favor, indique qual.

9. Faz rotação de tratamentos? **Escolha apenas uma opção*

- ☐ Sim
- ☐ Não

9a. Que tipo de rotação faz?*Pode escolher mais do que uma opção*

- ☐ Alternância entre tratamentos sintéticos e orgânicos (por exemplo Apivar e timol)
- ☐ Alternância entre tratamentos orgânicos (por exemplo ácido oxálico e timol)
- ☐ Alternância entre tratamentos sintéticos (por exemplo Apivar e Apistan)

10. Tem aumentado as doses ou número de tratamentos nos últimos anos? **Escolher apenas uma opção*

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sei

ANEXO III-INSTRUÇÕES PARA COLHEITA DE VARROAS



MITE- Varroa e vírus transmitidos: Monitorização de mutações e desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras

Instruções para colheita de varroas

Agradecemos sua participação no projeto MITE. Sua contribuição é fundamental para o sucesso desta iniciativa. Caso esteja disposto a participar, siga as etapas abaixo para a correta colheita e envio das amostras.

Deve amostrar 3 colónias por apiário e em cada colónia 5 varroas.

Materiais fornecidos no kit de amostragem:

- Sacos de plástico
- Tubos eppendorf com álcool absoluto
- Etiquetas
- Parafilme
- Envelope para enviar as amostras.

Instruções:

1. Colha pelo menos 5 varroas de cada colónia. Pode usar a técnica que preferir tal como o “easycheck”, retirar as varroas dos favos de zangão ou utilizar o teste do açúcar.
2. Colocar as varroas de cada colónia em tubos Eppendorfs fornecidos. Cada tubo Eppendorf deverá ter varroas de uma única colónia.
3. Verifique se os tubos estão devidamente fechados, aplique parafilme para garantir a vedação e coloque-os nos sacos fornecidos.
4. Preencher a(s) etiqueta(s) fornecida(s) a **LÁPIS** e colocar no saco. Deve preencher uma etiqueta por apiário.
5. Enviar o envelope para o IPB (Os portes já estão pagos)
6. Preencher o inquérito <https://forms.gle/xg7V4jPrLaSJ4QfU9>

Obrigada pela sua participação, alguma dúvida contacte: Dora Henriques (937 402 880).

ANEXO IV-ROLL-UP



Varroa e vírus transmitidos:
Monitorização de muTações
e dEenvolvimento de
ferramentas moleculares inovadoras







Monitorização molecular do
Vírus das Asas Deformadas (VAD)



Desenvolvimento de
Ferramentas Moleculares
para identificação da
resistência aos acaricidas e VAD



Rastreio nacional das mutações
associadas à resistência aos piretróides
e amitraz





Contatos:
Dora Henriques
E-mail: dorasmh@ipb.pt
M. Alice Pinto
E-mail: apinto@ipb.pt
Fenapícola
E-mail: fenapicola@confagri.pt

Projeto Financiado por:
Programa Apícola Nacional 2023-2027




Centro de
Investigação
de Montanha



ipb INSTITUTO POLITÉCNICO
DE BRAGANÇA



ANEXO V- FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Ficha de Avaliação Clínica

Exame Sanitário Veterinário Apícola

Data:

Médico Veterinário responsável:

OMV n.º membro:

Resenha: Identificação do animal

Informação Apiário			
ID exploração:		Tipo produção:	
Apicultor responsável:		ID apicultor:	
		Contacto:	
Finalidade		Geleia Real	
		Mel	
		Própolis	
		Pólen	
		Outro:	
Transumância	Sim	Última localização:	
	Não	Localização do apiário:	
Data instalação:			
Tipo Floração:			
Total Colmeias:		Data e instalação último exame:	
		Data instalação últimas alças:	
		Data último desdobramento:	
		Data última extração:	

Informação Colmeia	
ID:	
Data registo:	
N.º Colmeia:	
Origem exame/ Desdobramento:	
N.º meia-alças:	
Data instalação última meia-alça:	

Informação Rainha			
Data introdução no apiário:			
Origem/Tipo de ninho:			
Qualidade postural:	Postura a partir dos quadros:	Centrais	
		Laterais	
	Ocupação dos favos:	Integral	
		Parcial	
Última substituição da Abelha-rainha			



Anamnese:

Queixa principal			
Problema identificado:		Algumas abelhas mortas	Sim
			Não
		Mortalidade geral	Colmeia
			Apiário
		Alteração aspeto	
		Alteração comportamental	
Outro:			
Existe maior incidência em determinada época do ano?	Sim		Ceras: Data da última substituição:
	Não		
Início do problema:		Brusco/Repentino	
		Gradual e evolutivo	
Progressão:		Positiva (resolução)	
		Negativa (pioria)	
Produção:		Sem alteração	
		C/ quebra na produção	
Costuma aplicar preventivamente produtos na colmeia?		Sim	
		Não	
Possibilidade de existência de apiários não tratados na vizinhança:		Sim	
		Não	
Possibilidade de uso de fito-fármacos ou outros tratamentos químicos na vizinhança:		Sim	
		Não	
Presença de predadores:		Vespa (<i>Vespula vulgaris</i> , <i>Vespa velutina</i> , <i>Vespa crabro</i> ,...)	
		Aves (<i>andorinha</i> , <i>abelharuco</i> , <i>bútio vespeiro</i> ,...)	
		Répteis e Batráquios (<i>Lagartos</i> , <i>sapos</i> , ...)	
		Outro:	
Presença de pragas e parasitas:	Piolhos	<i>Braula coeca</i>	
	Ácaros	<i>Varroa destructor</i>	
		<i>Tropilaelaps spp</i>	
	Traça da cera	Maior: <i>Galleria mellonella</i>	
		Menor: <i>Achroia grisella</i>	
		Outro:	

Observações:



Histórico clínico:

Passado médico:			Data da última ocorrência:	Último tratamento aplicado:
Doenças anteriores:	Loque Americana(<i>Paenibacillus larvae</i>)			Tratamento não permitido na U.E
	Loque Europeia (<i>Melissococcus plutonius</i>)			
	Acarapisose (<i>Acarapis woodi</i>)			
	Varroose (<i>Varroa destructor</i>)			
	Aethinose (<i>Aethina tumida</i>)			
	Tropilaelapsose (<i>Tropilaelaps sp.</i>)			
	Ascoseriose (<i>Ascospaera apis</i>)			
	Nosemose	<i>Nosema apis</i>		
		<i>Nosema ceranae</i>		
Outro:				
Está a administrar algum medicamento atualmente?			Sim	Qual:
				Finalidade:
			Não	
Está a administrar algum produto atualmente? (Hive alive, Apifit, Nozevit, BeeStrong, promobee, apimida, apicar plus, levedura de cerveja, micro-soja, Neonosapiol, Neoapiciclina, Apiherb, Apigo, Mico-stop, superbee, entre outros)			Sim	Qual:
				Finalidade:
			Não	
Fez desdobramento/movimento da colmeia?			Sim	Procedência:
			Não	
Ambiente				
Alimentação				

Outros dados relevantes/ Observações:



Exame geral:

Inspeção por Observação à Distância (Ambiente de origem)				
Voo das Abelhas:	Normal			
	Anormal	Dificuldade em iniciar voo		
		Presença de tremores		
		Alteração da rota de voo		
		Outro:		
Exterior da colmeia:	Normal			
	Anormal	Nº anormalmente alto de abelhas mortas à frente da colmeia	‘Queda em Arco’	
			Abelhas mortas, c/ pólen nas patas traseiras	
			Abelhas com distensão abdominal	
		Algumas abelhas mortas morfologicamente alteradas	Brilhantes, negras e s/ pêlo	
			Obreiras pequenas c/asas ratadas ou deformadas	
		Manchas de cor escura no exterior da colmeia		
		Larvas mumificadas/engessadas à entrada da colmeia		
		Múmias brancas/pretas na tábua de voo e em frente a colmeia		
		‘Serradura’ de cera na tábua de voo		
	Outro:			

Inspeção por Observação do interior da Colmeia			
Vigor da População		Morfologia das Abelhas	
Nº quadros c/ criação		Normal	
Nº quadros c/ abelhas		Anormal	Abelhas brilhantes, negras, s/pêlo
			Abelhas c/ asas deformadas e/ou atrofiadas
			Abelhas c/ abdómen pequeno
			Abelhas mortas c/ cabeça emergida e língua de fora
			Presença de parasitas
			Larvas mumificadas brancas
			Criação “manchada”/em mosaico/dispersa
			Larvas de cor amarelada a acastanhada
			Larvas viscosas, filantes
			Outro:
Comportamento da Colónia			
Normal			
Comportamento Higiénico	Presente		
	Ausente		
Anormal	Movimento lento		
	Desorganizadas, defensivas e irritadas		
	Tremores		
	Opérculos perfurados		
	Criação em mosaico		



Exames complementares de diagnóstico:

Diagnóstico presuntivo		Doença Endémica em Portugal	D.D.O
Loque Americana (Bactéria)		X	X
Loque Europeia (Bactéria)			X
Ascosferiose (fungo)		X	X
Varroose (ácaro)		X	X
Acarapisose (ácaro)		X	X
Nosemose (fungo)		X	X
Morte por Vespa			
Aethinose por <i>Aethina tumida</i>			X
Tropilaelaps por <i>Tropilaelaps sp</i>			
Outro:			

Colheita de Amostras para Diagnóstico Laboratorial				
Data de Colheita:		Data de Expedição:		
Meio de transporte utilizado:				
Laboratório:	Laboratório de Sanidade Animal DRAP Centro- Lirião			
	Laboratório de Patologia Apícola do INIAV - Lisboa			
	Laboratório de Patologia Apícola da Escola Superior Agrária de Bragança			
	Outro:			
Diagnóstico de doenças específicas das abelhas adultas			Sim	
			Não	
Diagnóstico de doenças específicas da criação			Sim	
			Não	

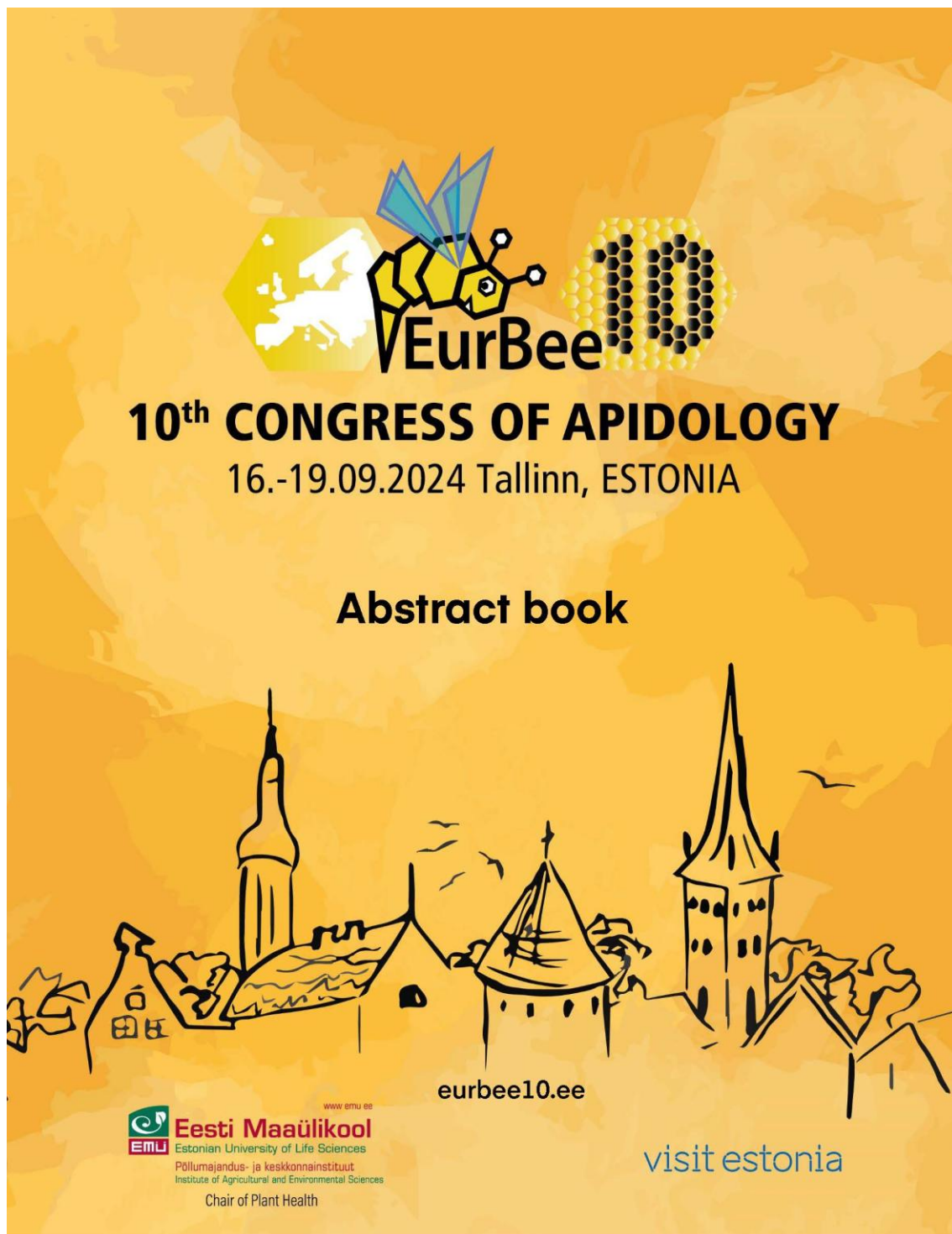
Abelhas adultas (Colher cerca de 50 a 70 abelhas de cada colónia, vivas ou mortas recentemente)		Nº Caixas:	
Favos com Criação (Enviar um fragmento de favo com criação de abelhas, larvas e opérculos, com cerca de 12x12cm)		Nº Caixas:	
Cartolinas		Nº Cartolinas:	

Material Congelado		Obs.:
Material Refrigerado		



Importante:

- Sempre que ocorram alterações significativas superiores a 20% do número de colmeias, o apicultor deverá fazer a declaração de alterações à declaração de existências, no prazo máximo de 10 dias úteis após a sua ocorrência.
- As declarações de alterações deverão ser efetuadas a partir de alterações superiores ou iguais a 20 colónias do efetivo.
- Destruição de todas as colónias dos apiários em que seja diagnosticada doença considerada exótica no território nacional, com adoção de medidas de destruição, desinfeção e de vigilância adequadas à erradicação do agente etiológico.
- O n.º de colónias de onde deverão ser colhidas as abelhas deve seguir o referido: De 1 a 5 colónias por apiário: 2 colónias; 6 a 10 colónias por apiário: 5 colónias; 11 a 20 colónias por apiário: 6 colónias; 21 a 60 colónias por apiário: 9 colónias; 61 a 100 colónias por apiário: 10 colónias.
- Caso não seja possível o imediato envio das amostras para o laboratório, estas devem ser refrigeradas (2-8°C) até 78 horas após a colheita. Caso o período seja superior devem ser congeladas.



CHALLENGES IN VARROOSIS CONTROL: PRELIMINARY INVESTIGATION OF AMITRAZ RESISTANCE IN VARROA DESTRUCTOR IN PORTUGAL

Maíra Costa^{1,2}, Ana R. Lopes^{1,2}, Carlos Ariel Yadró García^{1,2}, Mariana Lousada Gonçalves³, Liliana Coelho³, Sância Afonso Pires^{1,2,3}, M. Alice Pinto^{1,2}, Dora Henriques^{1,2}

¹Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

²Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

³Laboratório de Patologia Apícola da ESAB-Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

Abstract

Varroosis is a disease caused by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, identified as one of the most significant global threats to the honey bee (*Apis mellifera*). The most effective control of this mite is through synthetic or organic acaricides. However, the excessive and repeated use of synthetic acaricides has led to the development of resistance. Amitraz is a synthetic pesticide commonly used in the control of *V. destructor*, but resistance to this compound has been observed. Previous studies observed a substitution of asparagine by serine at position 87 (N87S) of the Octβ2R gene, associated with amitraz resistance in France, and a substitution of tyrosine by histidine at position 215 (Y215H), associated with amitraz resistance in the USA. Building upon this knowledge, we aim to implement the first screening in Portugal for mutations associated with *V. destructor* resistance to amitraz. Unlike several European countries and the USA, Portugal lacks information regarding gene variation implicated in *V. destructor* resistance to amitraz, as well as allelic frequencies and their geographical distribution. To investigate the resistance mechanism, primers were developed to amplify the two known target regions of amitraz in *V. destructor*. DNA was extracted from individual female varroa mites using a commercial extraction kit, and the obtained DNA was PCR-amplified with the developed primers, followed by Sanger sequencing. With the knowledge obtained, we hope to assist beekeepers in selecting the most suitable acaricide to manage *V. destructor* in their apiaries and gain a deeper understanding of amitraz resistance in Portugal.

Project "MITE- Varroa e vírus transmitidos: Monitorização de mutações e desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras" is funded by National Beekeeping Programme 2023-2027. FCT provided financial support by national funds (FCT/MCTES) to CIMO (UIDB/00690/2020 and UIDP/00690/2020) and SusTEC (LA/P/0007/2021).

Challenges in Varroosis Control: Preliminary Investigation of Amitraz Resistance in *Varroa destructor* in Portugal



Maira Costa^{1,2}, Ana R. Lopes¹, Carlos Ariel Yadró García², Mariana Lousada Gonçalves¹, Liliana Coelho¹, Sânciã Afonso Pires^{1,3}, M. Alice Pinto², Dora Henriques^{1,2}

¹Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal.

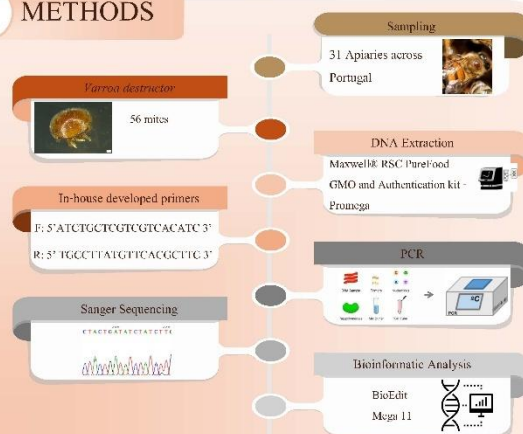
²Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal.

³Laboratório de Patologia Apícola da ESAH-Escola Superior Agrária de Hragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

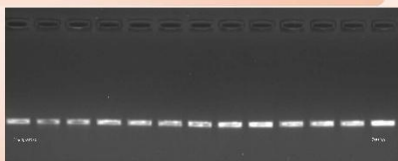
1 INTRODUCTION

Varroosis, caused by the mite *Varroa destructor*, is a major threat to honey bees, typically managed with acaricides like amitraz. However, resistance to amitraz has emerged, linked to mutations in gene $Ocl\beta 2R$. In France, a substitution of asparagine at position 87 by serine (N87S) is associated with amitraz resistance, while the substitution of tyrosine by histidine at position 215 (Y215H) is linked to resistance in the USA (Hernández-Rodríguez et al., 2021). This study aims to screen for amitraz resistance mutations in *V. destructor* populations in Portugal for the first time. By analyzing DNA from individual mites using PCR and Sanger sequencing, we seek to map the frequency and distribution of resistance-associated alleles.

2 METHODS



3 RESULTS



PCR amplifications were visualized by gel electrophoresis prior to sequencing. The in-house designed primers amplified a 700bp sequence spanning the regions associated with amitraz resistance (N87 and Y215). The mutations associated with amitraz resistance in France (N87S) and in the USA and (Y215H) were not detected in Portugal.



4 CONCLUSION

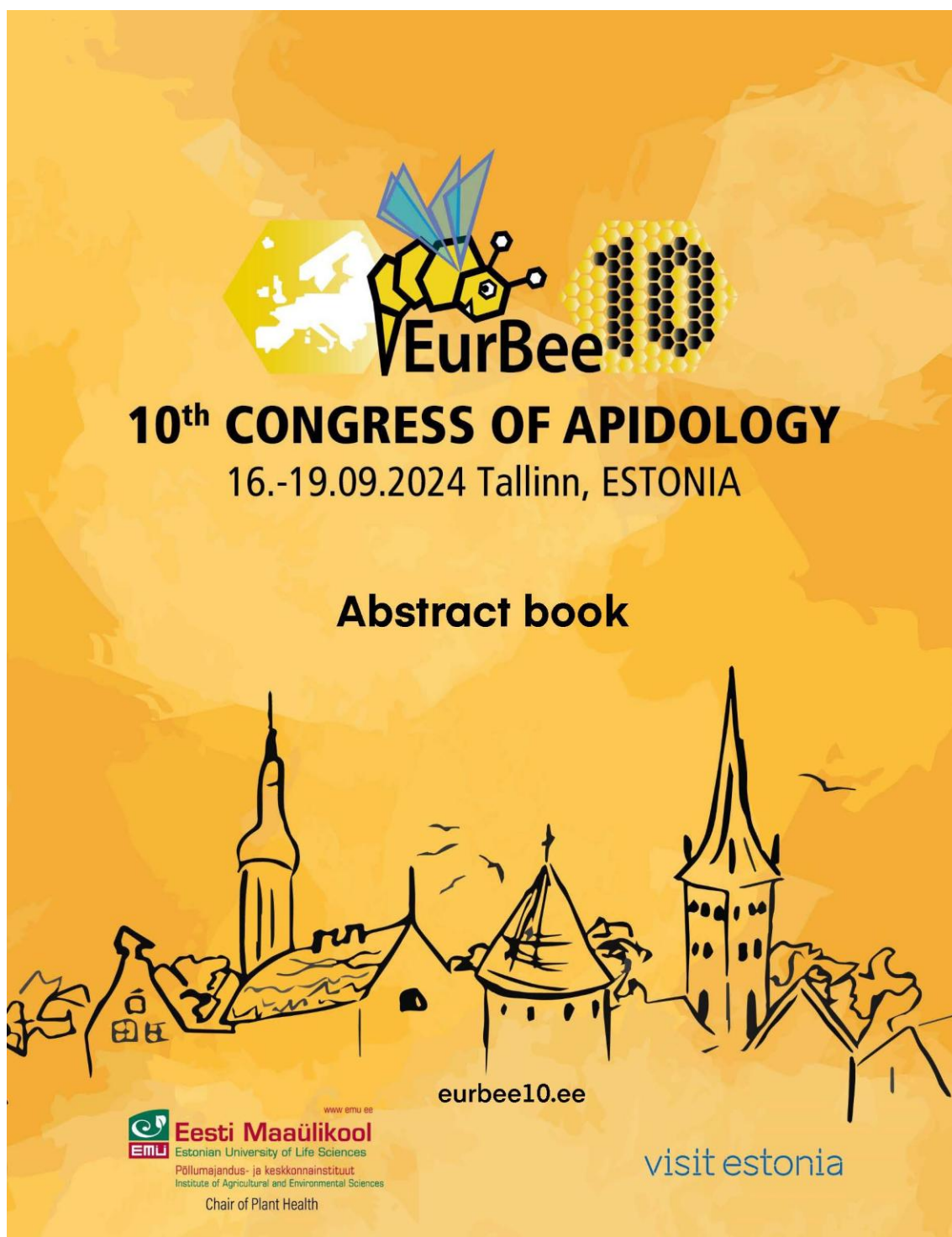
The designed primers yielded consistent results in both gel electrophoresis and Sanger sequencing. None of the sampled apiaries showed signs of resistance at positions N87 or Y215. However, a larger sample size will be required to draw definitive and robust conclusions

5 REFERENCES

Hernández-Rodríguez, C.S., Moreno-Martí, S., Alamejía, G. et al. Resistance to amitraz in the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* is associated with mutations in the β -adrenergic-like octopamine receptor. *J Pest Sci* 95, 1119–1195 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01471-3>
Rindевич, F.D., Moreno-Martí, S., Hernández-Rodríguez, C.S. and González-Cabrera, J. (2023). Confirmation of the Y215H mutation in the $Ocl\beta 2R$ octopamine receptor in *Varroa destructor* is associated with contemporary cases of amitraz resistance in the United States. *Pest Manag Sci*, 79: 2840–2845. <https://doi.org/10.1002/ps.2461>



ACKNOWLEDGEMENTS: Funding: Project “MITE- Varroa e virus transmitidos: Monitorização de muTações e dEenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras” with funding from the program Apícola Nacional 2023-2017. FCT provided financial support by national funds (FCT/MCTES) to CIMO (UIDB/00690/2020 and UIDP/00690/2020) and SusTEC (LA/P/0007/2021).



RESISTANCE OF VARROA DESTRUCTOR TO PYRETHROIDS: A PRELIMINARY ANALYSIS IN PORTUGAL

Maíra Costa^{1,2}, Ana R. Lopes^{1,2}, Carlos Ariel Yadró García^{1,2}, Marta Coelho^{1,2}, Raquel Martín-Hernández^{3,4}, Mariano Higes^{3,4}, Sância Afonso Pires^{1,5}, M. Alice Pinto^{1,2}, Dora Henriques^{1,2}

¹Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

²Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

³Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Laboratorio de Patología Apícola, Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), 19180 Marchamalo, Spain

⁴Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT-FEDER), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, 02006 Albacete, Spain

⁵Laboratório de Patologia Apícola da ESAB-Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal

Abstract

Infestations of *Varroa destructor* are closely associated with colony collapse in the honey bee (*Apis mellifera*). Currently, three classes of acaricidal compounds are utilized to combat these infestations: pyrethroids (fluvalinate and flumethrin), organophosphates (coumaphos) and formamidines (amitraz). The first cases of *V. destructor* resistance to pyrethroids were reported in Italy, followed by numerous instances of resistant populations worldwide. The molecular mechanism of *V. destructor* resistance to pyrethroids is well understood and primarily linked to an amino acid change at position 925, where a leucine (L) is typically found. At this position, three alleles have been described that confer resistance to pyrethroids, where leucine is substituted by valine (L925V), isoleucine (L925I), or methionine (L925M). A novel mutation at position 918 was described in a population from Spain, where the amino acid methionine, normally found at position 918, was replaced by leucine (M918L). In Portugal, gene variation associated with pyrethroid resistance remains unknown. To investigate this mechanism in *V. destructor* populations from Portuguese apiaries, DNA was extracted from individual mites. This DNA was PCR-amplified using the primers 273-IF_VD (5'-AAGCCGCCATTGTTACCAGA-3') and 1973-IR_VD (5'-CTGTTGTTACCGTGAGCA-3') and subjected to Sanger sequencing. The expected outcome is that mutations are found in Portugal at both positions 925 and 918, due to its geographical proximity to Spain. These results will contribute to the Portuguese beekeeping sector by facilitating the development of strategies for handling *V. destructor* resistance.

Project "MITE- Varroa e vírus transmitidos: Monitorização de mutações e desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras" is funded by National Beekeeping Programme 2023-2027.

Resistance of *Varroa destructor* to Pyrethroids: A Preliminary Analysis in Portugal

Maira Costa^{1,2}, Ana R. Lopes^{1,2}, Carlos Ariel Yadró García^{1,2}, Marta Coelho^{1,2}, Raquel Martín-Hernández^{3,4}, Mariano Higes^{3,4}, Sância Afonso Pires^{1,2}, M. Alice Pinto^{1,2}, Dora Henriques^{1,2}

¹Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal.

²Laboratório Associado para a Sustentabilidade e Tecnologia em Regiões de Montanha (SusTEC), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal.

³Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Laboratorio de Parasitología Apícola, Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), 19180 Merchán, Spain.

⁴Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT-EFDER), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, 02006 Albacete, Spain.

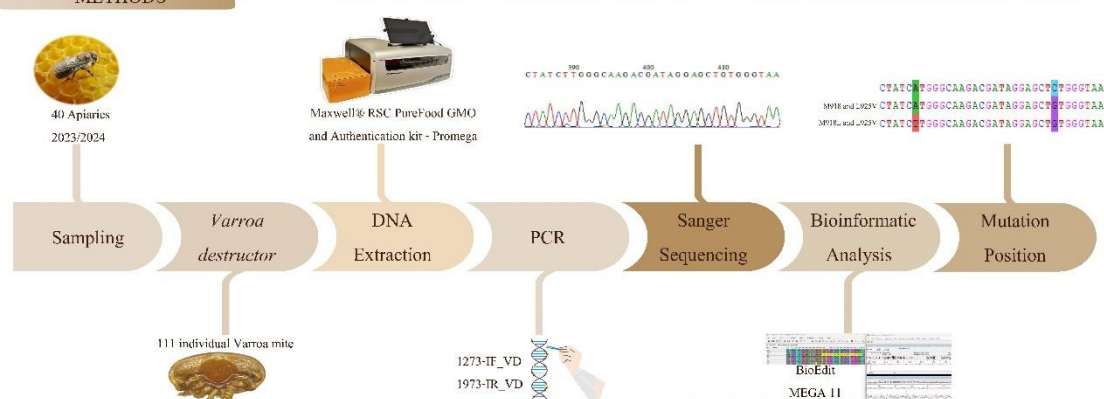
⁵Laboratório de Parasitologia Apícola do ESAB, Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal.



INTRODUCTION

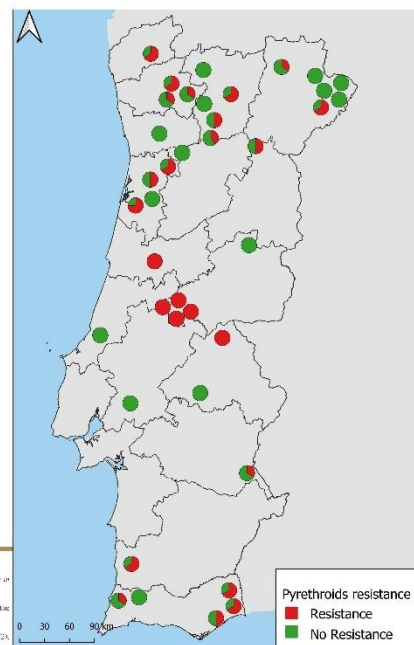
Varroa destructor is closely associated with colony collapse in *Apis mellifera*. Currently, pyrethroids, organophosphates, and formamidines are used to control these mites. Resistance to pyrethroids, first reported in Italy, is linked to mutations at positions 925 (L925V, L925I, L925M) and 918 (M918L) of the voltage-gated sodium channel (VGSC) gene. The aim of this work is to study the presence and distribution of VGSC gene alleles associated with pyrethroid resistance.

METHODS



RESULTS AND DISCUSSION

- 42% of the *Varroa* mites show at least one mutation associated with pyrethroid resistance. This value is lower than that reported by Li et al. (2024), who genotyped 94 samples from 2019 and found that 47% of the mites exhibited mutations correlated with resistance.
- No geographical pattern was observed in the distribution of genotypes associated with pyrethroid resistance.
- Among the mites carrying alleles associated with pyrethroid resistance, all presented the L925V mutation, and 95% of them also exhibited the M918L mutation. All samples with the M918L mutation were associated with the L925V mutation, consistent with results observed in the Valencian Community, Spain (Benito-Murcia et al., 2022).
- 32% of the analyzed samples were heterozygous.



REFERENCES: Benito-Murcia, M., Martín-Hernández, R., Martín, A., Ruelas, C., & Higes, M. (2022). Study of pyrethroid resistance mutations in populations of *Varroa destructor* across Spain. *Research in Veterinary Science*, 202, 24. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.07.002>.

Benito-Murcia, M., Martín, A., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2022). Mutations associated with pyrethroid resistance in *Varroa destructor*: a paradigm of honey bees and its spread across the Iberian Peninsula. *Parasitology*, 152(1), 1-10. <https://doi.org/10.1017/S0022268922000001>.

Li, F., Sánchez, J., Pineda, H., Xu, Y., & Rötter, R. (2024). *Varroa destructor* in Portugal: an epidemiological assessment of pyrethroid resistance status. *Journal of Apicultural Research*, 63(2), 217-230. <https://doi.org/10.1080/00218596.2022.2105615>.

ACKNOWLEDGMENTS: Funding: Project "MITE-Varroa e vírus: rumos da investigação científica e desenvolvimento de estratégias de controlo das doenças das abelhas" n.º 0, funding from the Portuguese Ministry of Agriculture, Rural Development and Fisheries (MARE) and the Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education (MCTES) to CIMO (UIDB/00690/2020 and UIDP/00690/2020) and SusTEC (LA-P-0005-2021).



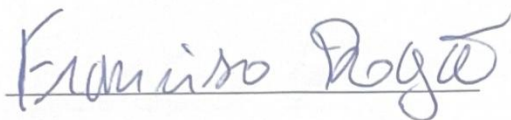
ANEXO VIII- FORMAÇÃO MACMEL



Certificado de Participação

Declaro, para os devidos efeitos, que Dora Sofia Martins Henriques e Maíra Costa participaram na formação “Preparação de Colmeias para o Inverno”, realizada nos dias 4 e 5 de outubro de 2024. No dia 4, foi apresentada uma palestra online sobre o projeto MITE e, no dia 5, pela manhã, foi realizada uma demonstração prática sobre a verificação dos níveis de infestação de varroa em abelhas adultas e criação. Durante a tarde, houve uma sessão teórico-prática sobre formas de monitorização e controle da varroa.

Macedo de Cavaleiros, 5 de outubro de 2024



Francisco Rogão

ANEXO IX- RESUMO E PÓSTER XX ENBE



19 – 20 December 2024
BIOPOLIS | Vila do Conde, Portugal

ABSTRACT BOOK



Poster 8

Distribution of Alleles Linked to Pyrethroid and Amitraz Resistance in *Varroa destructor* across Portugal

Costa, M.¹; Yadró, CA.¹; Lopes, AR.¹; Quaresma, A.¹; Rodrigues, C.¹; Pinto, MA.¹; Henriques, D.¹

(1) CIMO, LA SusTEC, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

Varroa destructor, an ectoparasitic mite of honey bees (*Apis mellifera*), is a significant threat to apiculture by causing varroosis and transmitting dangerous viruses such as the deformed wings virus. This mite can be controlled by the use of synthetic or organic acaricides. Currently, in Portugal, two classes of synthetic compounds are used: pyrethroids (fluvalinate and flumethrin), and formamidines (amitraz). However, excessive and repeated use of acaricides has led to resistance in mite populations. Resistance to pyrethroids is primarily associated with mutations in the voltage-gated sodium channel gene, and involves an amino acid change at position 925, where a leucine (L) is found in the wild type. At this position, three alleles have been described that confer *Varroa* resistance to pyrethroids, where leucine is replaced by valine (L925V), isoleucine (L925I), or methionine (L925M). A novel mutation at position 918 was described in a population in the Valencian Community in Spain, where the amino acid methionine, generally found at position 918, was replaced by leucine (M918L). For amitraz, resistance is linked to mutations in the Oct β 2R gene, involving a substitution of asparagine by serine at position 87 (N87S), found in France, and a substitution of tyrosine by histidine at position 215 (Y215H), found in the USA. However, the distribution of these resistance-associated alleles remains unexplored in Portugal. To address this gap, we sampled *Varroa* mites from honey bee colonies from different locations in Portugal, and used a PCR assay with mutation-specific primers, followed by Sanger sequencing of the amplicons. The results confirmed pyrethroid resistance alleles at positions 925 and 918 in the Portuguese populations. In contrast, amitraz-resistance alleles remained undetected, although this result should be interpreted with caution as the sample size was reduced. These findings represent a step forward for understanding the status of *Varroa* resistance in Portugal, providing baseline data for the development of more effective, region-specific management strategies. Further research with larger sample sizes is essential to confirm these preliminary observations.

Acknowledgements: This work was supported by the project "MITE- *Varroa* e vírus transmitidos: Monitorização de mutações e desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras" funded by National Beekeeping Programme 2023-2027, FCT/MCTES (PIDDAC): CIMO, UIDB/00690/2020 (DOI: 10.54499/UIDB/00690/2020) and UIDP/00690/2020 (DOI: 10.54499/UIDP/00690/2020); and SusTEC, LA/P/0007/2020 (DOI: 10.54499/LA/P/0007/2020).

Distribution of Alleles Linked to Pyrethroid and Amitraz Resistance in *Varroa destructor* across Portugal

Maíra Costa¹, Carlos Ariel Yadró García¹, Ana R. Lopes¹, Andreia Quaresma², Cláudia Rodrigues², M. Alice Pinto^{1,2}, Dora Henriques^{1,2}

¹CIMO, I.A SusTEC, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal.

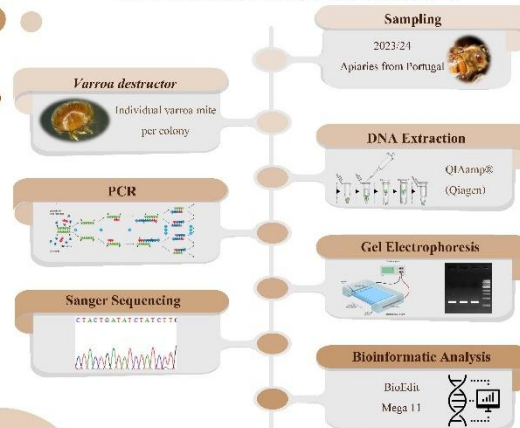
INTRODUCTION

Varroa destructor, an ectoparasitic mite of honey bees (*Apis mellifera*), is a significant threat to apiculture by causing varroosis and transmitting viruses such as the deformed wings virus. This mite can be controlled by the use of synthetic or organic acaricides. However, excessive and repeated use of acaricides has led to resistance in mite populations.

Resistance to pyrethroids, first reported in Italy, is linked to mutations at positions 925 (L925V, L925I, L925M) and 918 (M918L) of the voltage-gated sodium channel (VGSC) gene. For amitraz, resistance is linked to mutations in the Oct β 2R gene, involving a substitution of asparagine by serine at position 87 (N87S), found in France, and a substitution of tyrosine by histidine at position 215 (Y215H), found in the USA.

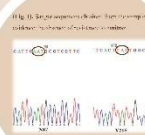
This study aims to screen for pyrethroid and amitraz resistance mutations in *V. destructor* populations in Portugal for the first time.

MATERIAL AND METHODS



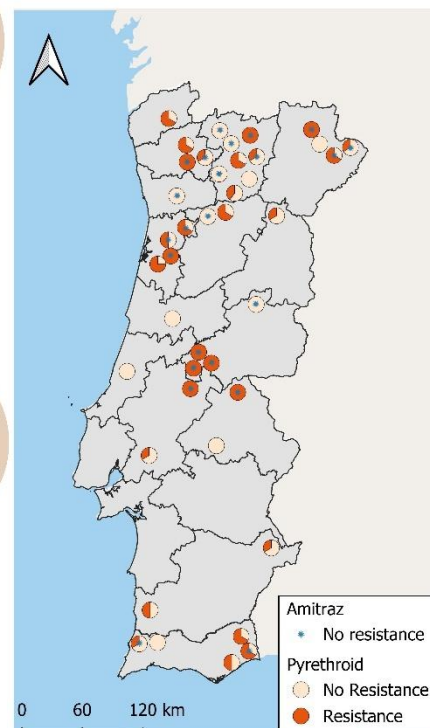
RESULTS AND DISCUSSION

- The samples showed that 46% of the *Varroa* mites exhibited resistance to pyrethroids. No geographical pattern was identified between resistant and non-resistant populations, with mutations at positions 925 and 918 detected in different regions of the country.
- No geographical pattern was observed in the distribution of genotypes associated with pyrethroids resistance.
- The substitution of A by G at position 88 results in the N87S mutation, whereas the substitution of T by C at position 471 results in the Y215H mutation (Fig. 1). However, no mutations were detected in the samples from Portugal.



CONCLUSION

Among the pyrethroid resistant, all presented the L925V mutation, and of them also exhibited the M918L mutation. All samples with the M918L mutation were associated with the L925V mutation, consistent with results observed in the Valencian community, Spain, in 2021. None of the sampled apiaries showed signs of resistance at mutation N87 or Y215. However, a larger sample size will be required to draw a definitive and robust conclusion.



REFERENCE: Hernández-Rodríguez, C.S., Moreno-Martí, S., Almeida, G. et al. Resistance to amitraz in the parasitic honey bee mite *Varroa destructor* is associated with mutations in the β -adrenergic-like octopamine receptor. *J Pest Sci* 95, 1179–1195 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01471-3>; Rinkevich, F.D., Moreno-Martí, S., Hernández-Rodríguez, C.S. and González-Cabrera, J. (2023). Confirmation of the Y215H mutation in the β 2-octopamine receptor in *Varroa destructor* is associated with contemporary cases of amitraz resistance in the United States. *Post Manag Sci*, 79: 2840-2845. <https://doi.org/10.1002/ps.7461>

ACKNOWLEDGEMENTS: Funding: Project "MITE- Varroa e virus transmissíveis: Monitorização de mutações e desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras" with funding from the program Apícola Nacional 2023-2017. FCT provided financial support by national funds (FCT/MCTES) to CIMO (UIDB/00690/2020 and UIDP/00690/2020) and SusTEC (LA/P/0007/2021).

Organized by:



itqb nova

Instituto de Tecnologia
Química e Biológica
Universidade NOVA de Lisboa

SPG Conference

International Conference of the Portuguese Society of Genetics



5-6 June 2025, Oeiras



Poster 38

Development of LAMP Primers for the Detection of Pyrethroid Resistance Mutations in *Varroa destructor*

Maíra Costa¹, Carlos A. Yadró¹, Ana R. Lopes¹, Mohamed Khalil Bejaoui¹, Jhennifer Almeida¹, Lucas Barbosa Correia¹, Sara Sánchez¹, Fernanda Li¹, M. Alice Pinto¹, Dora Henriques¹

¹CIMO, LA SusTEC, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal.

E-mail: fernandalil@ipb.pt

Varroa destructor is one of the main threats to *Apis mellifera* L., directly affecting colony health and contributing to their global decline. Control of this mite is traditionally achieved using acaricides, with pyrethroids such as tau-fluvalinate and flumethrin being the most used, acting on voltage-gated sodium channels (VGSC). However, the intensive use of these compounds by beekeepers has led to the emergence of resistance, associated with mutations at residues 918 and 925 of the VGSC gene [1]. Traditional methods for detecting these mutations, such as PCR, TaqMan and RT-PCR, are effective but require expensive laboratory equipment. In this context, Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a promising alternative, offering rapid and cost-effective detection without the need for thermal cycling [2]. LAMP is based on the use of a set of four to six primers, including two inner primers (FIP and BIP), two outer primers (F3 and B3), and optionally two loop primers (LoopF and LoopB), which are introduced to accelerate the amplification reaction [3]. This study aimed to develop specific LAMP primers, using the NEB LAMP software, for the detection of the main mutations associated with *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in Portugal. The predictive efficiency, specificity, and thermodynamic properties of the designed primers were assessed using BLAST, eLAMP, and OligoAnalyzer tools, considering qPCR parameters. This work successfully identified specific primer sets, including loop primers, for the detection of the mutation at position 925, which may be used in future experimental validations for rapid diagnostic applications.

References

1. GONZÁLEZ-CABRERA, J. et al. Novel mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Varroa destructor* populations from the Southeastern USA. PLoS ONE, San Francisco, v. 11, n. 5, e0155332, May 2016.
2. RANZANI, L. et al. Development of a portable LAMP-based device for real-time pathogen detection. Advanced Engineering Materials, Weinheim, v. 24, n. 12, p. 1–9, Nov. 2022.
3. PTITSYN, K. G. et al. Lamp Primer Designing Software: The Overview. Biomedical Chemistry: Research and Methods, [s.l.], Oct. 2024.



DEVELOPMENT OF LAMP PRIMERS FOR THE DETECTION OF PYRETHROID

RESISTANCE MUTATIONS IN *VARROA DESTRUCTOR*

MAÍRA COSTA, CARLOS A. YADRÓ, ANA R. LOPES, MOHAMED KHALIL BEJAOU, JHENNIFER ALMEIDA, LUCAS BARBOSA CORREIA, SARA SÁNCHEZ, FERNANDA LI, M. ALICE PINTO, DORA HENRIQUES

CIMO, LA SUSTEC, INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA, CAMPUS DE SANTA APOLÓNIA, 5300-253 BRAGANÇA, PORTUGAL

INTRODUCTION

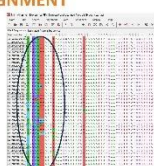
Varroa destructor is a major threat to *Apis mellifera*, contributing to colony losses worldwide. Resistance to pyrethroid acaricides has emerged due to mutations in the VGSC gene, particularly at position 918 and 925. Traditional methods to detect these mutations are effective but require expensive equipment. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a rapid, low-cost alternative that operates without thermal cycling and uses a specific set of primers.

OBJECTIVE

Development specific LAMP primers, using the NEB LAMP Primer Design Tool (New England Biolabs) and LAMP DESIGNER 1.16 (Premier Biosoft), for the detection of the main mutations associated with *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in Portugal.

METHODOLOGY

1) ALIGNMENT



Alignment of the wild-type (WT) sequence with sequences obtained from DNA extraction and Sanger sequencing, aiming to identify polymorphic regions in *Varroa*.

2) PRIMERS DESIGN



The software tools were tested with different sequence lengths to ensure that primers would not anneal within the polymorphic region. The goal was to position the mutation near the 3' end of internal primers to prevent nonspecific amplifications.

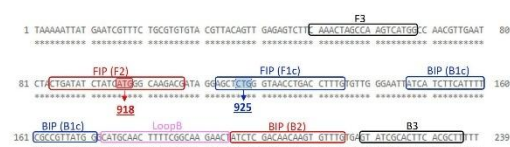
3) PARAMETERS AND SPECIFICITY



Parameter	Description
Position	Bind to conserved DNA regions (avoid polymorphisms)
Length	18–24 nucleotides (nt) for outer primers; 40–45 nt for inner primers
Tm	60–65 °C (inner primers); similar Tm across all primers
GC Content	40–60% for stable binding
Specificity	Avoids off-target amplification
Loop Primers	Optionally speed up amplification by forming loops
Structure Check	Minimize self-dimer, cross-dimers, and hairpins

RESULTS

NEB LAMP PRIMER DESIGN TOOL

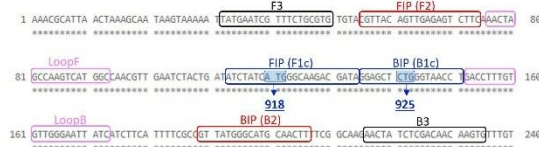


PRIMERS	LENGTH	GC (%)	MELT TEMP	nmole/D250	μg/OD260	ΔG (kcal/mol)	Tm (°C)
F3	19	47.4	60.1	5.28	30.65	-2.02	51.5
B3	18	50	61.9	5.41	30.14	-2.13	53.7
FIP (F1c + F2)	48	50	76	2.12	31.41	-5.29	47.6
BIP (B1c + B2)	45	40	75.4	2.37	32.59	-4.93	57.5
LB	23	47.8	67	4.54	31.95	-1.35	44

PRIMERS FIP: MANUAL ADJUSTMENT



LAMP DESIGNER 1.16 (PREMIER BIOSOFT)



PRIMERS	LENGTH	GC (%)	Tm (°C)	Rating	Melt ΔG (kcal/mol)	Self-Dimer ΔG (kcal/mol)	GC Clamp
F3	19	47.4	60.1	86	0	0	3
B3	18	50	61.9	89.3	0	0.4	2
FIP (F1c + F2)	48	50	76	85.4	-1.5	-1.5	2
BIP (B1c + B2)	45	40	75.4	82.1	0	0	3
LB	23	47.8	67	86.8	0	0	3
F2	20	50	60.3	92.8	0	0	2
F1c	21	52.9	63.7	83.1	0	0	3
B2	18	54.4	60.5	85.1	0	-2.9	3
B1c	18	55.6	64	85.8	0	2.2	3

CONCLUSION

Group 1 contains mutations positioned in more critical regions, such as F2, which may enhance specificity for variant detection despite suboptimal primer parameters. In contrast, Group 2 exhibits better design characteristics but targets mutations in less sensitive regions (F1c/B1c), potentially reducing specificity. Experimental validation is essential to confirm the performance of both groups.

Nevertheless, LAMP Designer proved to be a more complete tool, as it includes BLAST within its interface and provides all the essential information needed for proper primer design. In contrast, the NEB LAMP tool required the use of additional software to analyze key parameters and reach a more conclusive evaluation.

Acknowledgements: Project "MITE- varroa e virus transmitidos: monitorização de mutações e desenvolvimento de ferramentas moleculares inovadoras" with funding from the Program Apícola Nacional 2023-2017. FCT provided financial support by national funds (FCT/MCTES) to CIMO (uidb/00690/2020 and uidp/00690/2020) and SUS TEC (la/p/0007/2021).





ANEXO XI -