



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro



Contribuição  
para o estudo do  
comportamento higiénico  
associado ao ácaro  
*Varroa destructor* Oud.,  
em colónias de abelhas  
melíferas portuguesas

Sância Maria Afonso Pires

Vila Real  
2005



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Contribuição para o estudo do comportamento  
higiénico associado ao ácaro *Varroa destructor*  
em colónias de abelhas melíferas portuguesas**

**Sância Maria Afonso Pires**

Tese original submetida à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, de acordo com o disposto no Decreto-Lei 216/92 de 13 de Outubro.

Vila Real, 2006



A meu filho Miguel Gil

Aos meus pais

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho queremos expressar o nosso sincero reconhecimento a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a sua elaboração:

Ao Professor Catedrático **Dionísio Gonçalves**, Presidente do Instituto Politécnico de Bragança, agradecemos as facilidades concedidas que tornaram possível a execução desta tese.

Ao Professor Doutor **José Manuel Flores Serrano**, na qualidade de orientador científico, pela colaboração directa que se traduziu na sua valiosa orientação científica, bem como pelas oportunas sugestões formuladas e sobretudo pela confiança que sempre depositou no nosso trabalho.

Ao Professor Doutor **José Óscar Branco Pereira**, pela co-orientação científica deste trabalho, pela leitura crítica do texto e pela amizade com que nos distinguiu ao longo destes anos de trabalho conjunto.

Ao Professor Doutor **Vasco Augusto Pilão Cadavez**, pelo apoio manifestado em todas as fases da elaboração deste trabalho, pela sua constante disponibilidade mas, principalmente, pela amizade e pelo companheirismo com que nos distinguiu nas mais variadas situações em que trabalhámos juntos.

Ao Professor Doutor **António Manuel de Oliveira Coelho Murilhas**, agradecemos a sua disponibilidade e o apoio manifestado, por todas as sugestões críticas de organização do trabalho, bem como pela valiosa revisão do manuscrito e pelo permanente incentivo com que sempre nos distinguiu.

Ao Professor Doutor **Carlos Aguiar**, pela sua preciosa colaboração na identificação das espécies para caracterização da vegetação da região em estudo.

Ao Professor Doutor **Fernando Pereira**, pelo apoio manifestado na elaboração deste trabalho, mas principalmente pela amizade e disponibilidade sempre presentes.

Ao Senhor **Manuel Gonçalves**, Presidente da Associação de Apicultores do Parque Natural de Montesinho e da Federação Nacional de Apicultores, assim como aos técnicos da associação que conosco colaboraram, cujo saber constitui a matéria-prima do nosso trabalho, agradeço a generosidade manifestada.

Às Engenheiras **Liliana Soares** e **Helena Teixeira** pelo apoio na realização da componente prática deste trabalho e na sua elaboração.

## FINANCIAMENTOS

A realização deste trabalho foi possível mediante os seguintes apoios:

1. Escola Superior Agrária de Bragança;
2. Programa de Desenvolvimento Educativo para Portugal – PRODEP III. Formação Avançada de Docentes do Ensino Superior, Concurso nº 4/5.3/N/199.006/01.

## RESUMO

No presente estudo investigou-se o comportamento higiénico de colónias de abelhas melíferas portuguesas através do teste de morte da criação de obreira por congelação e de vários métodos de infestação de alvéolos de criação de obreira com o ácaro *V. destructor*. Avaliou-se também o nível de expressão do comportamento higiénico manifestado por grupos de colónias higiénicas e não higiénicas, por ano e entre anos. Além disso, analisou-se quer o efeito da aplicação conjunta dos vários métodos de infestação, quer a relação entre o nível de comportamento higiénico manifestado nesses grupos e a respectiva resposta perante vários métodos de infestação aplicados de forma independente.

O teste da morte da criação por congelação mostrou-se eficaz na avaliação do comportamento higiénico em colónias existentes no Nordeste de Portugal, que manifestam, às 24 horas, uma elevada capacidade de resposta. Todavia, as colónias (higiénicas e não higiénicas) não mantiveram o mesmo padrão comportamental durante os três anos de estudo.

As colónias conseguiram detectar a presença de criação infestada quer com ácaros mortos (independentemente do processo de morte testado), quer com ácaros vivos. A aplicação de vários métodos de infestação em simultâneo na mesma colónia interferiu no nível de resposta.

A infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com *V. destructor* vivas foi a que provocou uma maior reacção das obreiras em cada um dos dois grupos de colónias (higiénicas e não higiénicas).

A infestação artificial com *V. destructor* mortas naturalmente revelou-se mais favorável comparativamente à infestação artificial com *V. destructor* mortas por congelação.

O nível de expressão dos comportamentos manifestados pelas obreiras, relativos à criação infestada, pode ser influenciado pela estação do ano.

Aparentemente não existiu uma relação entre o comportamento higiénico avaliado através do teste de morte da criação por congelação e o comportamento de remoção de criação e parasitas do interior dos alvéolos operculados de obreira.

**Palavras-chave:** *V. destructor*, varroose, comportamento, Portugal



# ABSTRACT

Levels of hygienic behaviour were investigated on Portuguese honey bee colonies, via a freeze-killed brood assay based on time bees required to detect, uncap and remove a comb section containing freeze-killed worker pupae. Several methods of brood cells artificially infested with *V. destructor* were also tested for their ability to induce bee removal of mite-infested pupae.

Levels of hygienic behaviour shown by hygienic and non-hygienic colonies were evaluated and compared within and between years. The effect of simultaneously applying several methods of artificial brood cell infestation into single colonies was assessed. Furthermore, the association between colonies' hygienic behaviour status and the artificial infestation methods (applied into different colony groups) was also studied.

The freeze-killed brood assay proved an efficient test for evaluating hygienic behaviour of honey bee colonies from Northeast Portugal, although hygienic and non-hygienic groups of colonies did not keep similar hygienic behaviour degrees throughout the experimental period (3 years).

Honey bee colonies clearly detected artificially infested brood cells with both dead and alive *V. destructor*. The simultaneous use of several infestation methods in single colonies interfered in their levels of hygienic behaviour.

Worker brood cells artificially infested with live *V. destructor* induced stronger colony reactions on both hygienic and non-hygienic colony groups. Also, worker brood cells artificially infested with naturally dead mites encouraged higher levels of cleaning behaviour than worker brood cells infested with frozen dead mites.

The expression of cleaning behaviour towards *V. destructor* infested brood cells seems to be season dependent.

No relationship was found between degrees of hygienic behaviour (as assessed via the freeze-killed brood assay) and levels of brood removal from *V. destructor* artificially infested cells.

**Key-words:** *V. destructor*, varroaosis, hygienic behaviour, Portugal.

# Índice

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice</b> .....	<b>viii</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Índice de quadros</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xx</b>
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
<b>Introdução Geral</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Objectivos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Organização</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Caracterização da área de estudo</b> .....	<b>6</b>
1.3.1. Localização .....	6
1.3.2. Geomorfologia, clima e tipo de vegetação .....	6
<b>1.4. Referências bibliográficas seleccionadas</b> .....	<b>10</b>
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>13</b>
<b>Importância do comportamento higiénico das abelhas <i>Apis mellifera</i> L. no controlo da varroose</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1. A abelha melífera europeia, <i>A. mellifera</i> L.</b> .....	<b>13</b>
2.1.1. Colónias da abelha melífera europeia, <i>A. mellifera</i> L. ....	15
<b>2.2. Recursos explorados pelas colónias</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3. Produtos apícolas</b> .....	<b>23</b>
2.3.1. Pólen .....	23
2.3.2. Cera.....	24
2.3.3. Própolis .....	24
2.3.4. Geleia real .....	25
2.3.5 Veneno .....	26
<b>2.4. Inimigos naturais e patologias das abelhas melíferas</b> .....	<b>27</b>
2.4.1. Ácaros associados às abelhas melíferas.....	29

2.4.1.1. Ácaros do género <i>Varroa</i> .....	31
2.4.1.2. Dispersão do ácaro <i>V. destructor</i> .....	32
2.4.1.3. Danos directos e indirectos do ácaro <i>V. destructor</i> .....	34
2.4.2. Caracterização e ciclo biológico do ácaro <i>V. destructor</i> .....	35
2.4.2.1. Caracterização anatomo-morfológica.....	35
2.4.2.2. Características gerais da invasão alveolar e do parasitismo .....	36
2.4.2.3. Ciclo reprodutivo.....	39
2.4.3. Meios de Controlo da Varroose .....	41
2.4.3.1 Controlo Químico.....	43
2.4.3.2 Via alternativa de controlo da Varroose .....	45
<b>2.5 Mecanismos de tolerância da espécie <i>A. mellifera</i> ao ácaro <i>V. destructor</i>.....</b>	<b>47</b>
2.5.1 Comportamento higiénico em abelhas melíferas .....	51
2.5.2. Metodologias para detecção do comportamento higiénico.....	55
2.5.2.1. Teste de morte da criação com gás cianídrico.....	56
2.5.2.2. Teste de morte da criação por congelação .....	56
2.5.2.3. Teste de morte da criação por punção .....	57
2.5.2.4. Teste de morte da criação através da injecção de ácaros ou zângãos macerados em solução salina .....	58
2.5.2.5. Teste de morte da criação por congelação com azoto líquido .....	58
2.5.3. Métodos para detectar factores de tolerância à varroose.....	59
2.5.3.1. Métodos de “parasitação” com ácaros vivos ou com ácaros mortos.....	61
2.5.3.2. Métodos de testagem de partículas inertes.....	62
<b>2.6. Referências bibliográficas seleccionadas .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 3 .....</b>	<b>87</b>
<b>Comportamento higiénico de colónias de abelhas <i>A. mellifera</i> de origem portuguesa como um mecanismo de tolerância à varroose.....</b>	<b>87</b>
<b>3.1. Introdução .....</b>	<b>87</b>
<b>3.3. Material e métodos .....</b>	<b>90</b>
3.3.2. Avaliação do comportamento higiénico .....	92
3.3.3. Métodos de análise estatística .....	95
<b>3.4. Resultados.....</b>	<b>96</b>
3.4.1. Estudo 1 – Resposta higiénica das colónias à introdução duma secção de favo com criação de obreira morta nos ensaios realizados em 2001.....	96

3.4.2. Estudo 2 – Relação entre a percentagem média de remoção da criação de obreira morta por congelação em colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) por anos e entre anos.....	101
3.4.2.1. Comparação da resposta higiénica de colónias H e NH, em cada ano .....	101
3.4.2.2. Respostas anuais das colónias H e NH entre estações do ano .....	103
3.4.2.3. Comparação da resposta higiénica das colónias H e NH, entre anos .....	106
3.4.2.4. Resposta higiénica das colónias H e NH entre estações de anos diferentes (2001 a 2003) .....	107
<b>3.5. Discussão.....</b>	<b>111</b>
3.5.1. Resposta higiénica das colónias à introdução numa secção de favo com criação morta por congelação nos ensaios realizados em 2001 .....	111
3.5.2. Relação entre a percentagem média de remoção da criação de obreira morta por congelação em colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) por anos e entre anos.....	114
<b>3.6. Conclusões .....</b>	<b>120</b>
<b>3.7. Referências bibliográficas seleccionadas .....</b>	<b>121</b>
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>127</b>
<b>Avaliação de vários métodos de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com <i>V. destructor</i> .....</b>	<b>127</b>
<b>4.1. Introdução .....</b>	<b>127</b>
<b>4.2 Material e métodos .....</b>	<b>132</b>
4. 2.1. Apiário experimental .....	132
4.2.2. Método de infestação artificial da criação operculada de obreira e “tipos” de <i>V. destructor</i> utilizados .....	133
4.2.3. Métodos de análise estatística .....	135
<b>4.3. Resultados.....</b>	<b>137</b>
4.3.1. Avaliação da resposta de colónias de abelhas melíferas à utilização de vários métodos de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com <i>V. destructor</i> , testados de forma individual ou conjunta .....	137
4.3.1.1. Método de infestação da criação operculada de obreira com ácaros mortos por congelação (AMC).....	137

4.3.1.2 Método de infestação da criação operculada de obreira com ácaros mortos naturalmente (AMN).....	140
4.3.1.3. Método de infestação de criação operculada de obreira com ácaros vivos (AV).....	142
4.3.2. Comparação entre resultados obtidos exclusivamente em grupos de alvéolos AMC, AMN e AV. ....	145
4.3.3. Comparação entre as diferentes metodologias de infestação de alvéolos de criação de obreiras quando aplicadas conjuntamente por colmeia.....	147
<b>4.4. Discussão.....</b>	<b>150</b>
4.4.1. Avaliação da resposta de colónias de abelhas melíferas à utilização de vários métodos de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com <i>V. destructor</i> , testados de forma individual ou conjunta.....	150
<b>4.3.5 Conclusões.....</b>	<b>154</b>
<b>4.6 Referências bibliográficas seleccionadas .....</b>	<b>155</b>
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>161</b>
<b>Análise comparativa dos níveis de expressão de comportamento higiénico relativamente aos vários métodos estudados de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com <i>V. destructor</i> .....</b>	<b>161</b>
<b>5.1. Introdução .....</b>	<b>161</b>
<b>5.2. Material e métodos .....</b>	<b>163</b>
5.2.1. Apiário experimental .....	163
5.2.2. Método de infestação artificial da criação operculada de obreira.....	164
5.2.3. Métodos de análise estatística .....	166
<b>5.3. Resultados.....</b>	<b>167</b>
5.3.1. Estudo do perfil comportamental das colónias higiénicas e não higiénicas como resposta à infestação da criação de obreira com ácaros mortos por congelação (AMC) .....	167
5.3.2. Estudo do perfil comportamental de colónias higiénicas e não higiénicas à infestação da criação operculada de obreira com ácaros mortos naturalmente (AMN).....	172
5.3.3. Estudo do perfil comportamental das colónias higiénicas e não higiénicas à infestação de criação de obreira com ácaros vivos (AV).....	178

<b>5.4. Discussão .....</b>	<b>186</b>
<b>5.5 Conclusões .....</b>	<b>193</b>
<b>5.6 Referências bibliográficas seleccionadas .....</b>	<b>194</b>
<b>Capítulo 6 .....</b>	<b>197</b>
<b>Conclusões gerais .....</b>	<b>197</b>
<b>6.1. Resposta higiénica das colónias à introdução duma secção de favo com criação morta por congelação .....</b>	<b>197</b>
<b>6.2. Relação entre a percentagem média de remoção da criação de obreira morta por congelação em colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) por anos e entre anos.....</b>	<b>198</b>
<b>6.3. Avaliação da resposta de colónias de abelhas melíferas à utilização de vários métodos de infestação de alvéolos de criação operculada de obreira com <i>V. destructor</i>, testados de forma individual ou conjunta.....</b>	<b>198</b>
<b>6.4. Estudo do perfil comportamental das colónias higiénicas e não higiénicas como resposta a vários métodos de infestação da criação operculada de obreira com <i>V. destructor</i> .....</b>	<b>199</b>

# Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Localização da área de estudo.....	6
<b>Figura 2.1.</b> Obreira adulta de uma colónia de abelhas melíferas portuguesas.....	15
<b>Figura 2.2.</b> As três castas existentes numa colónia de abelhas melíferas.....	15
<b>Figura 2.3.</b> Diferentes fases da metamorfose das abelhas obreiras.....	20
<b>Figura 2.4.</b> Fêmea (a) e macho (b) de <i>V. destructor</i> , ao microscópio electrónico (adaptada de International Bee Research Association, 1997).....	35
<b>Figura 2.5.</b> Representação esquemática da estruturação espacial da reprodução das varroas em alvéolos com criação no estado de pupa (Adaptado de Donze <i>et al.</i> , 1998).....	37
<b>Figura 2.6.</b> Desenvolvimento diário da descendência de <i>V. destructor</i> em criação de zângão e de obreira de <i>A. mellifera</i> (adaptada de Martin, 1997) .....	40
<b>Figura 3.1.</b> Apiário experimental da ESAB.....	90
<b>Figura 3.2.</b> Pormenor do modelo de colmeias (Langstroth) existentes no apiário com estrados para a recolha de ácaros .....	91
<b>Figura 3.3.</b> Marcação e corte da secção de favo (a) e remoção da secção cortada (b) .	93
<b>Figura 3.4.</b> Acondicionamento e identificação das amostras (a) e sua congelação (b)..	93
<b>Figura 3.5.</b> Resposta higiénica das colónias à secção de favo com criação morta às 24 horas (a) e às 48 horas (b).....	94
<b>Figura 3.6. Estudo 1</b> – Valores observados (média $\pm$ erro padrão da média, %) para o CHP (total de alvéolos desoperculados) e para o CHT (total de alvéolos desoperculados e respectivas pupas removidas), registados por período de observação, no total das colónias estudadas e nas diferentes estações do ano 2001 (n=36). .....	96
<b>Figura 3.7. Estudo 1</b> – Valores observados (média $\pm$ erro padrão da média, %) em termos de comportamento higiénico total de sete colónias classificadas como higiénicas (H) e cinco como não higiénicas (três testes efectuados em cada colónia em 2001). .....	99
<b>Figura 3.8. Estudo 1</b> – Valores observados (média $\pm$ erro padrão da média, %) do comportamento higiénico total manifestado pelas 4 colónias higiénicas (H) e 4 não higiénicas (NH) (três testes efectuados a todas as colónias, por ano de estudo). 101	

<b>Figura 3.9.</b> Estudo 2 – Valor médio de comportamento higiênico total observado às 24 horas (média ± erro padrão da média, %) em 4 colônias higiênicas (H) e 4 não higiênicas (NH), entre estações do ano de 2001. ....	103
<b>Figura 3.10.</b> Estudo 2 – Valor médio de comportamento higiênico total observado às 24 horas (média ± erro padrão da média, %) em 4 colônias higiênicas (H) e 4 não higiênicas (NH), entre estações do ano de 2002. ....	104
<b>Figura 3.11.</b> Estudo 2 – Valor médio de comportamento higiênico total observado às 24 horas (média ± erro padrão da média, %) em 4 colônias higiênicas (H) e 4 não higiênicas (NH), entre estações do ano de 2003. ....	105
<b>Figura 3.12.</b> Estudo 2 – Nível global de comportamento higiênico total médio observado às 24 horas (média ± erro padrão da média, %) em 4 colônias higiênicas (H) e 4 não higiênicas (NH) na globalidade dos 3 anos de estudo, entre estações do ano. ....	109
<b>Figura 4.1.</b> Marcação de alvéolos e corte lateral do opérculo (a) e introdução de ácaros (b) .....	134
<b>Figura 4.2</b> – Valores observados (media ± erro padrão da media, %) dos comportamentos manifestados pelas colônias quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AMC) ou em simultâneo com outros (AMCc), utilizando três colmeias por grupo [duas repetições por colmeia e por mês n=6]. ....	138
<b>Figura 4.3</b> – Valores observados (media ± erro padrão da media, %) dos comportamentos manifestados pelas colônias quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AMN) ou em simultâneo com outros (AMNc), utilizando três colmeias por grupo [duas repetições por colmeia e por mês]. ....	140
<b>Figura 4.4</b> – Valores observados (media ± erro padrão da media, %) dos comportamentos manifestados pelas colônias quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AV) ou em simultâneo com outros (AVc), utilizando três colmeias por grupo [duas repetições por colmeia e por mês]. ....	143
<b>Figura 4.5</b> - Valores observados (média ± erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colônias de abelhas quando cada um dos três métodos de infestação foi o único aplicado. ....	145



<b>Figura 4.6</b> - Valores observados (média $\pm$ erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias de abelhas quando três metodologias de infestação foram aplicadas conjuntamente em cada uma delas, nos quatro ensaios realizados em 2001 (n=6, para cada método e mês). .....	148
<b>Figura 5.1</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias higiénicas (H) e 4 não higiénicas (NH) como resposta ao método de infestação AMC [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] na Primavera de 2002.....	167
<b>Figura 5.2</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMC [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] no Verão de 2002. ....	168
<b>Figura 5.3</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMC [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=7)] no Outono de 2002. ....	169
<b>Figura 5.4</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMN [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] na Primavera de 2002. ....	173
<b>Figura 5.5</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMN [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] no Verão de 2002. ....	174
<b>Figura 5.6</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMN [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=7)] no Outono de 2002. ....	175
<b>Figura 5.7</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AV [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] na Primavera de 2002. ....	179
<b>Figura 5.8</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AV [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] no Verão de 2002. ....	180
<b>Figura 5.9</b> – Valores observados do perfil comportamental (media $\pm$ erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AV [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=7)] no Outono de 2002.....	181

## Índice de quadros

<b>Quadro 1.1</b> – Características climáticas da estação climatológica de Bragança, durante o período de 1951 a 1980 (INMG, 1991).....	7
<b>Quadro 2.1.</b> Ácaros parasitas (e alguns não parasitas) da abelha <i>A. mellifera</i> (adaptado de Denholm, 1999 e Crane, 1990).....	30
<b>Quadro 2.2.</b> Principais metodologias utilizadas na avaliação do comportamento higiénico.....	55
<b>Quadro 3.1.</b> Estudo 1 – Coeficientes de correlação entre o nível de desoperculação total (CHP) e o nível de remoção total (CHT) de criação morta por congelação, por período de observação obtido em 2001.....	97
<b>Quadro 3.2.</b> Estudo 1 – Valores observados (média ± erro padrão da média, mínimo e máximo; %) do CHT (total de alvéolos desoperculados e pupas removidas), registados por período de observação entre as estações do ano de 2001 (n=12).....	98
<b>Quadro 3.3.</b> Estudo 2 – Nível global do comportamento higiénico total observado às 24 horas (média ± erro padrão da média, %), relativo ao número total de colónias testadas nos 3 anos de estudos (n=12).....	106
<b>Quadro 3.4.</b> Estudo 2 – Nível médio (média ± erro padrão da média, %) de comportamento higiénico total observado às 24 horas, por nível de higiene, por estação do ano e entre anos (n=4).....	107
<b>Quadro 4.1.</b> – Valores observados (média ± erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AMC) ou em simultâneo com outros (AMCc), em duas repetições efectuadas por colmeia e em dois grupos de três colmeias, nos quatro ensaios consecutivos realizados em 2001 (n=24).....	139
<b>Quadro 4.2.</b> – Valores médios observados (média ± erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos	

comportamentos manifestados pelas colónias quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AMN) ou em simultâneo com outros (AMNc), em duas repetições efectuadas por colmeia e em dois grupos de três colmeias, nos quatro ensaios realizados em 2001 .....	141
<b>Quadro 4.3.</b> – Valores médios (média ± erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AV) ou em simultâneo com outros (AVc), em duas repetições efectuadas por colmeia e em dois grupos de três colmeias, nos quatro ensaios realizados em 2001 .....	144
<b>Quadro 4.4.</b> – Valores observados (média ± erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias quando um só método de infestação foi aplicado em dois quadros por colónia e em três grupos de três colónias por cada método, nos quatro ensaios realizados em 2001. ....	147
<b>Quadro 4.5.</b> – Valores médios observados (média ± erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias em que foram aplicados conjuntamente três métodos de infestação de alvéolos de criação de obreira em dois quadros por colónia, num grupo de três colónias nos quatro ensaios realizados em 2001 (n=24). ....	149
<b>Quadro 5.1.</b> Valor observado do perfil comportamental (média ± erro padrão da média, %) de 4 colónias H ou 4 NH como resposta ao método AMC aplicado em 2 quadros por colmeia entre as estações do ano de 2002. ....	170
<b>Quadro 5.2.</b> Valores médios (média ± erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método AMC no total dos ensaios realizados em 2002 (n=23). ....	171
<b>Quadro 5.3.</b> Valores médios (média ± erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas obreiras de 4 colónias H e 4 NH como resposta	

ao método AMC e ao teste de morte da criação de obreira por congelção, no total dos ensaios realizados em 2002 (n=12).....	172
<b>Quadro 5.4.</b> Valor observado do perfil comportamental (média $\pm$ erro padrão da média, %) de 4 colónias H ou 4 NH como resposta ao método AMN aplicado em 2 quadros por colmeia entre as estações do ano de 2002.....	176
<b>Quadro 5.5.</b> Valores médios (média $\pm$ erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método AMN (aplicado em 2 quadros por colmeia) no total dos 3 ensaios realizados em 2002 (n=23).....	177
<b>Quadro 5.6.</b> Valores médios (média $\pm$ erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH, como resposta ao método AMN e ao teste de morte da criação de obreira por congelção (CHT) no total dos ensaios realizados em 2002 (n=12). ....	178
<b>Quadro 5.7.</b> Valor observado do perfil comportamental (média $\pm$ erro padrão da média, %) de 4 colónias H ou 4 NH como resposta ao método AV aplicado em 2 quadros por colmeia entre as estações do ano de 2002.....	182
<b>Quadro 5.8.</b> Valores médios (média $\pm$ erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método AV (aplicado em 2 quadros por colmeia) no total dos 3 ensaios realizados em 2002 (n=23).....	183
<b>Quadro 5.9.</b> Valores médios (média $\pm$ erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH, como resposta ao método AV e ao teste de morte da criação de obreira por congelção (CHT), no total dos ensaios realizados em 2002 (n=12).....	184
<b>Quadro 5.10.</b> Valores médios (média $\pm$ erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados por 4 colónias H e 4 colónias NH	

após a aplicação de várias metodologias de infestação ao longo de  
três estações do ano de 2002 (n=23). ..... 185

## Abreviaturas

**AMC** – Ácaros mortos por congelação

**AMCc** – Ácaros mortos por congelação introduzidos em simultâneo com outros “tipos” de ácaros

**AMN** – Ácaros mortos naturalmente

**AMNc** – Ácaros mortos naturalmente introduzidos em simultâneo com outros “tipos” de ácaros

**AV** – Ácaros vivos

**AVc** – Ácaros vivos introduzidos em simultâneo com outros “tipos” de ácaros

**CV** – Coeficiente de variação

**CHT** – Comportamento higiénico total

**CHP** – Comportamento higiénico parcial

**EPM** – Erro padrão da média

**ESAB** – Escola Superior Agrária de Bragança

**H** – Colónias higiénicas

**NH** – Colónias não higiénicas

**r** – Coeficiente de correlação

**R** – Remoção

**RM** – Remoção média

**TD** – Taxa de desoperulação

**TR** – Taxa de remoção

**vs** – Versus

# Capítulo 1

## Introdução Geral

---

A apicultura é uma actividade relevante na economia mundial e nacional. Este facto deve-se à função de polinização das abelhas melíferas e ao valor dos produtos e sub-produtos resultantes desta actividade. Segundo Spivak e Reuter (2005) estima-se que um terço da dieta alimentar humana esteja relacionada, directa ou indirectamente, com a função polinizadora dos insectos. Actualmente, a abelha melífera (*Apis mellifera* L.) é considerada como o insecto polinizador mais importante, a nível mundial, na polinização de frutos, de plantas cultivadas, jardins e flores selvagens (Spivak e Reuter, 2005), representando uma percentagem que pode variar entre 60 a 95% de todos os polinizadores existentes nas regiões de clima temperado (Zaragoza, 2001a). A polinização tem um efeito positivo em muitas culturas agrícolas (Corbet, 2003), calculando-se que a abelha melífera, pode possivelmente, efectuar 80% da polinização entomófila (Ortega-Sada, 1987; Zaragoza, 2001a). Os benefícios desta polinização manifestam-se no acréscimo de produção (quantidade de frutos) e/ou na melhoria da sua qualidade (tamanho e sabor dos frutos) e/ou ainda, no aumento da precocidade e uniformidade de culturas como a colza e o girassol (Ortega-Sada, 1987; Corbet, 2003).

Este efeito é tanto mais importante quanto, nas últimas décadas, devido à destruição do habitat e ao aumento da utilização de pesticidas (resultantes da intensificação frequentemente desregulada da agricultura) se tem registado a diminuição significativa da quantidade e da diversidade de espécies de abelhas selvagens e de outros insectos benéficos. É cada vez maior a dependência da polinização dirigida, em vários países como, por exemplo no Reino Unido (Denholm, 1999).

Paralelamente, as abelhas melíferas também têm uma importante função na manutenção da biodiversidade através da polinização das flores silvestres que, por sua vez, proporcionam uma fonte alimentar para várias espécies de aves e pequenos mamíferos (Williams e Carreck, 1994, citado por Denholm, 1999). No entanto, deve também salientar-se a existencia de alguns casos, em que o efeito da polinização por abelhas melíferas é praticamente nulo. Um destes casos é a produção de sementes (Calatayud e Zaragoza, 2001). Noutros casos, a polinização parece ter um efeito negativo. A título exemplificativo, poder-se-á referir o caso concreto do cultivo de certas variedades de cítrinos na Comunidade Espanhola de Valência. Neste caso, o Governo Valenciano tomou algumas medidas mediante a publicação de alguns decretos (como o Decreto 33/2000, de 28 de Março e o Decreto 37/2001, de 13 de Fevereiro) que proibiam a instalação de colmeias, a menos de 5 Km das plantações de cítrinos em floração. Estas medidas visavam limitar a polinização cruzada entre plantações e variedades de cítrinos, conducente à presença de sementes nos frutos, que se repercutiu negativamente no valor comercial desses frutos (Pajuelo, 2000; Calatayud e Zaragoza, 2001; Zaragoza, 2001a, b, 2003).

O valor comercial dos produtos e subprodutos da “colmeia” origina benefícios económicos relevantes e directamente derivados da própria exploração apícola.

Actualmente, estima-se em 26 000 o número total de apicultores portugueses, dos quais 1800 são apicultores profissionais. Segundo a Federação Nacional de Apicultores FNAP (2004) estes possuem 632 500 e 345 000 colmeias, respectivamente. Ainda segundo a mesma fonte, a produção total de mel no mesmo triénio (2001/2003) foi aproximadamente de 12 mil toneladas, cujo valor, calculado a preços praticados em 2003 (2,5 € por kilograma), é de 30 milhões de Euros. Estes valores económicos, aos quais devem ainda ser adicionados os valores dos restantes sub-produtos da exploração apícola (cera, enxames, colmeias e outros materiais apícolas) revelam o contributo desta



actividade para o desenvolvimento agrário e rural, seja como actividade económica exclusiva, seja como complemento económico de outras actividades.

Para além disto, Portugal dispõe de nove Denominações de Origem Protegida (DOP) relativas a méis (GPPAA, 2000). A criação destas DOP visou a aposta na produção de méis de qualidade, o que lhes permite serem reconhecidos e valorizados pelos consumidores, aumentando a sua competitividade no mercado. Por outro lado, a produção DOP também está sujeita a maior rigor do ponto de vista da segurança alimentar do produto, designadamente a ausência de resíduos químicos oriundo dos tratamentos apícolas.

O principal problema associado á prática da apicultura está actualmente associado à varroose. Esta ectoparasitose, causada pelo ácaro *Varroa destructor* Anderson e Trueman, 2000, surge como a principal responsável pela debilitação e/ou perda de muitas colónias melíferas a nível nacional e mundial.

Compreende-se assim o enorme esforço de investigação e desenvolvimento experimental que tem vindo a ser realizado no sentido de facilitar a sobrevivência da apicultura com esta parasitose.

## 1.1. Objectivos

É também neste domínio que se deverá entender este trabalho. Um modesto contributo para o estudo do comportamento higiénico e do seu possível impacto sobre o nível de tolerância à varroose em colónias de abelhas melíferas nativas em Portugal.

Este objectivo geral subdividiu-se em dois campos de investigação principais:

(1) Examinar colónias de abelhas melíferas portuguesas, sem prévia selecção genética, de forma a avaliar a sua resposta higiénica, em função da evolução do nível de comportamento higiénico entre estações do ano e entre anos. A avaliação deste comportamento foi efectuada através de um teste baseado na remoção de criação de obreira morta por congelação, que permitiu classificar as colónias em função do seu nível de higiene (colónias higiénicas e não higiénicas). Trata-se de uma metodologia de campo, de fácil implementação, de reduzidos custos e passível de ser utilizada ao nível da exploração apícola pelos próprios apicultores. Por isso, é apontada como uma das metodologias mais promissoras na identificação (a larga escala) e selecção de colónias

mais higiénicas e, como tal, importa desenvolver estudos sobre a sua aplicabilidade aos sistemas de produção apícolas portuguesas.

(2) Investigar a utilização de distintos métodos de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com o ácaro *V. destructor*, como forma de avaliar se as colónias de abelhas melíferas portuguesas manifestam também o comportamento higiénico ao nível da detecção e remoção da criação infestada. Paralelamente, identificar o método de infestação em função da sua efectividade nos diferentes estudos, de forma a comparar as relações entre a resposta comportamental das colónias higiénicas e não higiénicas à introdução de parasitas nos alvéolos de criação de obreiras.

A utilização destas metodologias encontra aplicabilidade no desenvolvimento de um método de testagem de colónias em larga escala, que permita implementar, à posteriori, um programa de selecção visando o melhoramento genético do comportamento higiénico das colónias como um mecanismo de maior tolerância às patologias apícolas.

## 1.2. Organização

O estudo da “habilidade” das obreiras para detectar e remover criação de obreira morta ou infestada com varroa tem-se baseado na utilização de várias metodologias. As mais utilizadas têm sido os testes baseados na morte da criação por congelação e/ou na infestação artificial de alvéolos de criação com ácaros *V. destructor* (vivos ou mortos).

Neste trabalho, o **Capítulo 1** é reservado à introdução geral da investigação, no qual figuram os objectivos e a justificação da relevância da mesma.

No **Capítulo 2** são abordados os principais aspectos relacionados com a espécie de abelhas melíferas na Europa. Por outro lado, descreve-se também as principais características do parasita *V. destructor* “responsável” pela varroose, patologia apícola de maior incidência em Portugal, salientando as suas inter-relações com o seu hospedeiro. De forma um pouco mais pormenorizada referimos os aspectos comportamentais e genéticos inerentes a esta espécie de abelhas, que lhes permite melhor defender-se naturalmente desta patologia. Estes aspectos, associados a diferentes metodologias permitem avaliar alguns dos factores que contribuem para a obtenção de colónias de abelhas tolerantes a esta patologia. Consequentemente no **Capítulo 3**, são

examinadas diferentes colónias para quantificar a sua resposta higiénica relativamente à utilização de um teste baseado na morte da criação por congelação, nos distintos períodos de observação e nas distintas estações do ano. A aplicação desta metodologia, permitiu identificar e agrupar as colónias por nível de higiene (colónias higiénicas e não higiénicas) (Estudo 1). Foram também analisadas as inter-relações entre a remoção média da criação morta, por nível de higiene, entre estações do ano, por ano e entre anos (Estudo 2). A possibilidade de avaliar factores de tolerância do hospedeiro, como o comportamento higiénico, pode ser promissor para instigar a diminuição populacional dos ácaros em colónias pré-identificadas. Na sua utilização em populações nacionais, a implementação de metodologias de parasitação de alvéolos operculados de criação de obreiras com o ácaro *V. destructor*, permitem estimar a capacidade de tolerância destas populações para colmatar as necessidades anteriormente identificadas do abrandamento populacional destes parasitas.

No **Capítulo 4** procede-se à implementação e avaliação de distintos métodos de infestação para investigar as estratégias comportamentais de colónias de abelhas melíferas de origem portuguesa, acasaladas naturalmente. Adicionalmente pesquisar também, o efeito que a aplicação dessas metodologias em distintas situações (de forma individual e/ou conjunta, por colónia) pode causar ao nível da resposta higiénica destas populações.

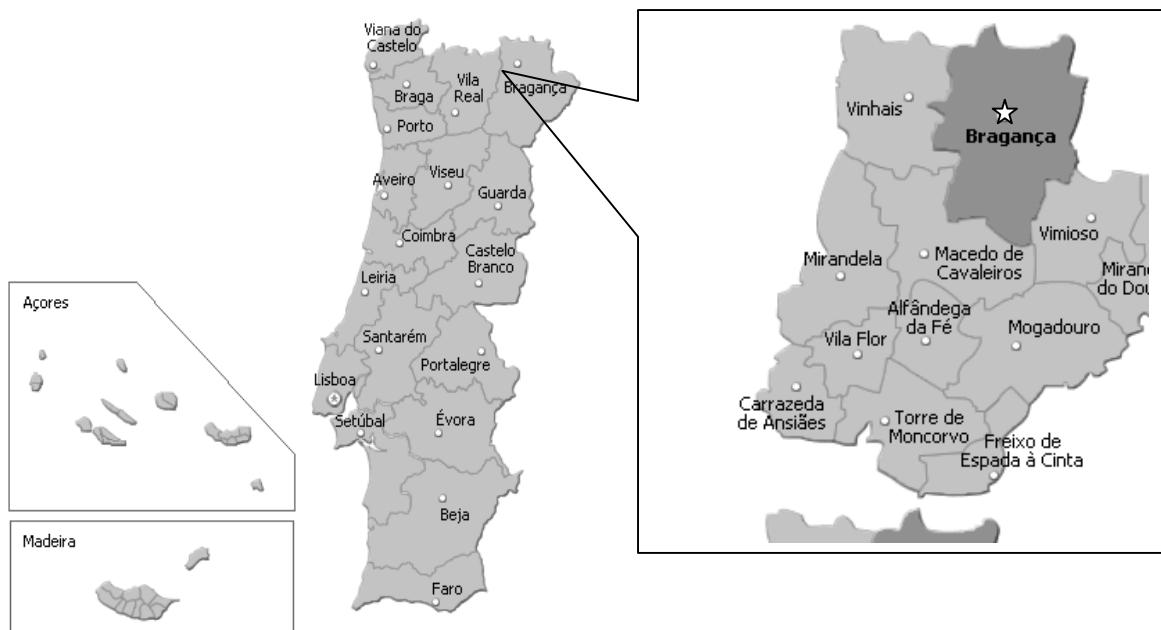
No **Capítulo 5** procede-se ao estudo da relação entre a resposta comportamental das colónias agrupadas por níveis de higiene (Capítulo 3) e o seu nível de expressão após a aplicação individual por colónia dos vários métodos de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com *V. destructor*.

Por último, no **Capítulo 6** apresentam-se as conclusões gerais. Entende-se que os resultados confirmam a aplicabilidade do método de campo baseado na remoção de criação de obreira morta por congelação, na avaliação do comportamento higiénico. Contudo, a aplicabilidade dos métodos de infestação artificial de colónias com ácaros *V. destructor* põe em evidencia o carácter multifactorial da tolerância à varroose, bem como, a dificuldade e morosidade da execução destas metodologias. Demonstra também a necessidade de dar continuidade aos estudos de investigação nesta área, no sentido de melhor controlar as variáveis que contribuem para a tolerância à varroa e para a criação de metodologias de testagem cuja transferência para os sistemas apícolas de produção seja exequível.

## 1.3. Caracterização da área de estudo

### 1.3.1. Localização

Este trabalho foi desenvolvido no apiário da Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB), situada na Região de Trás-os-Montes e localizada no Nordeste de Portugal (41° 49'N e 6° 40'W), encontrando-se, aproximadamente, a 720 m de altitude sobre o nível do mar (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Localização da área de estudo (Adaptado de: <http://portugal.veraki.pt>) ☆ localização do apiário da ESAB.

### 1.3.2. Geomorfologia, clima e tipo de vegetação

Segundo Gonçalves (1990) em Trás-os-Montes distinguem-se dois territórios homogêneos do ponto de vista macro-climático, geomorfológico e agrário, nomeadamente a “Terra Fria” e a “Terra Quente”. Atendendo à localização da área de estudo (“Terra Fria”) não se caracterizará neste trabalho a “Terra Quente”.

A “Terra Fria”, pertencente à Zona de Montanha, caracteriza-se por uma paisagem típica cujos principais componentes do seu estrato vegetativo são os bosques de

carvalhais, os prados (terras com pastagens permanentes, designadas por “lameiros”) e, nas elevações, os baldios (terras de exploração comunitária) e os soutos de castanheiros. O Nordeste transmontano enquadra-se na zona agrícola da “Terra Fria” Transmontana, coincidindo em grande parte com os concelhos de Bragança e Vinhais.

A edafologia desta região, revela uma predominância de solos incipientes e argilosos, pouco saturados (anteriormente denominados por solos mediterrâneos). A unidade pedológica mais representativa da região de Bragança são os leptossolos (Agroconsultores e Coba, 1991).

Do ponto de vista climático, esta região apresenta características que a situam numa zona de transição da influência Atlântica para a Continental. Neste caso, o Nordeste transmontano (Bragança), embora de clima mediterrânico, tem influência do regime atlântico, cuja importância se repercute, ao nível climático, condicionando a distribuição da precipitação (fisiografia) (Gonçalves, 1985).

A caracterização climática baseou-se nos valores registados na estação climatológica de Bragança, relativas ao trinténio de 1951-80 (INMG, 1991) (Quadro 1.1). Esta estação, inclusivamente pela proximidade física do apiário, apresenta condições climáticas semelhantes à área de estudo.

**Quadro 1.1** – Características climáticas da estação climatológica de Bragança, durante o período de 1951 a 1980 (INMG, 1991).

---

Parâmetros	Valores
Temperatura média anual	11,9° C
Temperatura média do mês mais quente	20,7° C
Temperatura média do mês mais frio	4,5° C
Precipitação média anual	741,1 mm
Humidade relativa média anual às 6 h	84 %
Humidade relativa média anual às 12 h	62 %
Humidade relativa média anual às 18 h	60 %
Direcções predominantes do vento	W
Insolação média anual	58 %
Número de dias com geada (média anual)	63,2
Número de dias com neve (média anual)	10

---

Em Bragança, a temperatura e a precipitação média anual registada, nesse período foi de 11,9°C e 741,1 mm, respectivamente. Ainda que, possam ser encontradas diferenças regionais relativamente à quantidade de precipitação e à maior ou menor duração da estação estival, esta concentrou-se nos meses mais frios, sendo comum a sua quase inexistência na estação seca (Gonçalves, 1991). Na estação estival, a temperatura média no mês mais quente foi de 20,7°C (Julho) e, na estação invernal, foi de 4,5°C (Julho). A amplitude térmica anual foi de 16,2°C (INMG, 1991).

Normalmente, nas zonas de maior altitude os dias de neve oscilam entre os 40 a 50 e, nas restantes zonas, entre os 10 a 20. Além disso, a humidade relativa média anual oscila entre os 60 e os 80% (Gonçalves, 1991; INMG, 1991).

De acordo com Aguiar (2002) sob as condições climáticas que prevalecem na área de estudo e, descritas nos parágrafos anteriores, a Vegetação Natural Potencial é do tipo florestal e dominada pelo *Quercus pyrenaica* [carvalho-negral]. Acompanham esta espécie arbórea um extenso cortejo de espécies arbustivas e herbáceas entre as quais se citam, pela sua frequência, *Genista falcata* e a *Arenaria montana*. O uso agrícola e pastoril secular do território reduziu os bosques primitivos de *Quercus pyrenaica* a pequenas manchas submetidas a cortes cíclicos para a produção de lenha. Deste modo, a paisagem vegetal actual é dominada por etapas sucessionais regressivas do tipo arbustivo ou herbáceo. Os tipos de vegetação arbustiva mais frequentes na área de estudo são os giestais, os estevais e os urzais. Os giestais são comunidades arbustivas de grande biomassa e altura – ultrapassam com facilidade os 2 m de altura – dominados por *Pteridium aquilinum*, *Erica arborea* [urze-branca] e leguminosas da tribo das *Genisteas* [*Cytisus* spp.]. Estes matos ocupam solos relativamente profundos e com frequência orlam bosques ou colonizam solos abandonados pela agricultura. Os estevais e os urzais ocupam solos mais delgados sendo os estevais mais termófilos que os urzais. Nos estevais dominam espécies da família das cistáceas (e.g. *Cistus ladanifer* [esteva-ordinária]) e das labiadas (e.g. *Lavandula pedunculata* subsp. *sampaiana* [arça] e *Thymus mastichina* [tomilho]). As espécies arbustivas mais frequentes no urzais são a *Erica australis* e *Erica umbellata* (família das Ericáceas) [urzes], a *Calluna vulgaris* (Ericáceas) o *Peterospartum tridentatum* (Leguminosas) [carqueja] e o *Halimum alyssoides* (Cistáceas) [sargaço]. Nos solos hidricamente compensados desenvolve-se um tipo particular de vegetação arbustiva dominado por plantas espinhosas da família das rosáceas (*Rosa* spp., *Rubus* spp., *Prunus* spp., etc.) A vegetação herbácea tem por

habitat as clareiras da vegetação arbustiva, os solos agrícolas recentemente abandonados e os fundos de vale (lameiros). A flora herbácea da região é extraordinariamente diversa (e.g. *Trifolium* spp., *Ornithopus* spp., *Anthyllis* spp., etc.).

Desta forma, ao nível dos estratos arbustivos e herbáceos, encontram-se as espécies botânicas de maior interesse apícola, cuja floração principal ocorre de Março a Junho, e permite a entrada dos principais recursos alimentares (fluxos de néctar e pólen) responsáveis, em grande parte, pela evolução da postura, variação de peso das colónias e, conseqüentemente, pela sua produtividade.

A curva de postura das colónias desta região caracteriza-se, normalmente, por um crescimento primaveril gradual. Normalmente, os picos de postura poderão ocorrer no período de Abril a Maio, coincidindo com a época de enxameação. Esta curva apresenta um ligeiro decréscimo no início do Verão, mas a postura mantém-se a um nível médio até praticamente ao meio da estação estival, associada à floração de espécies do estrato arboreo (soutos de castanheiros, amieiros, carrasco) e algumas culturas agrícolas (horto-frutícolas). A partir do meio da estação estival, a postura decresce rapidamente até ao início do Outono, ocorrendo neste período a sua paragem invernal. O início de uma nova fase de crescimento populacional pode ocorrer ainda nos meses de inverno (fins de Fevereiro ou início de Março) ou no início da Primavera. Nesta região, em média, o rendimento médio em mel é de 20 kg de por colónia.

#### 1.4. Referências bibliográficas seleccionadas

Agroconsultores e Coba. 1991. Projecto de Desenvolvimento Rural Integrado de Trás-os-Montes, Carta de Solos, Carta de Uso Actual da Terra e Carta de Aptidão da Terra do Nordeste de Portugal, UTAD, Vila Real, Portugal.

Aguiar, C. 2002. Flora e Vegetação da Serra de Nogueira e do Parque Natural de Montesinho. Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal.

Anderson, D. L. e Trueman, J. W. H. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* **24**: 165-189.

Calatayud, F. e Zaragoza, E. S. 2001. Importancia de las abejas melíferas y otros insectos como agentes polinizadores de las plantas cultivadas y silvestres de la Comunidad Valenciana. [http://www.apiservices.com/articulos/zaragoza/agentes\\_polinizadores.htm](http://www.apiservices.com/articulos/zaragoza/agentes_polinizadores.htm). Visitada em 20/10/2005.

Cobert, S. A. 2003. Nectar sugar content: estimating standing crop and secretion rate in the field. *Apidologie* **34**: 1-10.

Denholm, C. H. 1999. Inducible honey bee viruses associated with *Varroa jacobsoni*. PhD. Thesis, Keele University, Staffordshire, UK.

FNAP. 2004. Relatório do Triénio 2001, 2002 e 2003 no âmbito do Programa "Acções de melhoria da produção e comercialização do mel". Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas (MADRP).

Gonçalves, D. A. 1985. Contribuição para o estudo do clima da bacia superior do rio Sabor. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal.

Gonçalves, D. A. 1990. O uso do solo e a construção das paisagens rurais. O caso do interior de Trás-os-Montes, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal.

Gonçalves, D. A. 1991. O clima e os ecossistemas agro-ecológicos do Parque Natural de Montesinho. In: Seminário Técnico sobre a Conservação da Natureza nos países do Sul da Europa, Faro, Portugal.

GPPAA. 2000. Anuário Pecuário 2000, Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa, Portugal.

INMG. 1991. Normas Climatológicas da Região de «Trás-os-Montes e Alto Douro e Beira Interior», correspondentes a 1951-1980. O clima de Portugal, Fascículo



XLIX, vol. 3 - 3ª Região. Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, Lisboa, Portugal.

Ortega-Sada, J. L. 1987. Flora de interes apícola y polinización de cultivos. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.

Pajuelo, A. G. 2000. Prohibición de instalar colmenas en los cítricos. *Vida Apícola* **102**: 7-9.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 2005. A sustainable approach to controlling honey bee diseases and varroa mites. <http://www.sare.org/publications/factsheet/0305.htm>. Visitada a 15/09/05.

Zaragoza, E. S. 2001a. Las abejas de la miel y la polinización. [http://www.apiservices.com/articulos/zaragoza/agentes\\_polinizadores.html](http://www.apiservices.com/articulos/zaragoza/agentes_polinizadores.html). Visitada em 20/10/2005.

Zaragoza, E. S. 2001b. Problemática de los asentamientos de colmenas en cítricos "La Pinyoà". [http://www.apiservices.com/articulos/zaragoza/problemativa\\_citricos.htm](http://www.apiservices.com/articulos/zaragoza/problemativa_citricos.htm). Visitada em 20/10/2005.

Zaragoza, E. S. 2003. Árbol sin abejas, árbol sin cosecha y seguimos en pañales contra la Pinyolà. [http://www.apiservices.com/articulos/zaragoza/arbol\\_sin\\_abejas.htm](http://www.apiservices.com/articulos/zaragoza/arbol_sin_abejas.htm). Visitada em 20/10/2005.



## Capítulo 2

### **Importância do comportamento higiénico das abelhas *Apis mellifera* L. no controlo da varroose**

---

Neste capítulo abordaremos sucessivamente: a biologia da abelha melífera ocidental, que se inclui na espécie *A. mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae); as patologias apícolas provocadas por ácaros, com especial ênfase na biologia, distribuição e incidência do ácaro ectoparasita *V. destructor* (Acari: Varroidae), agente responsável pela varroose; e, por fim, o comportamento higiénico de colónias de abelhas melíferas e a sua tolerância à varroose. O objectivo principal é o de revelar aspectos da vida do hospedeiro e do parasita e, sobretudo, as relações existentes entre si, como elemento essencial ao estudo e compreensão do comportamento higiénico das abelhas.

#### **2.1. A abelha melífera europeia, *A. mellifera* L.**

O género *Apis* engloba várias espécies de abelhas sociais productoras de mel que pertencem à família Apidae, subfamília Apinae, e caracterizam-se por apresentarem um elaborado comportamento social e por possuírem órgãos especiais para a recolha do pólen (Winston, 1987; Ruttner, 1988; Jean-Prost, 1989). A origem, a evolução e a

taxonomia das abelhas melíferas têm sido tema de investigação desde há longo tempo. Particularmente, têm sido efectuados vários estudos no sentido de clarificar a filogenia dentro do género *Apis*. De acordo com Winston (1987), este género inclui cinco espécies de abelhas melíferas: a abelha comum (*A. mellifera*), as abelhas gigantes (*A. dorsata* e *A. laboriosa*), a abelha indiana (*A. cerana*) e a abelha anã (*A. florea*). No entanto, Ruttner (1988) considera não existirem dados suficientes para reconhecer a abelha *A. laboriosa* como uma quinta espécie, embora exista essa possibilidade.

Entre os apicultores Portugueses, a designação mais comum para a abelha local (isto é, “nativas” da Península Ibérica), é a de abelha negra ou abelha local. No seio da comunidade científica são actualmente designadas como pertencentes à raça geográfica *A. mellifera iberiensis* Engel, 1999 [anteriormente denominada por *A. m. iberica* Goetze, 1964 (Ruttner, 1973, 1975; Santiago *et al.*, 1986; Graça, 1996)]. O estudo mais aprofundado de que temos conhecimento sobre a caracterização da estrutura genética das populações nativas de abelhas melíferas em Portugal deve-se a Graça (1996). Neste foram analisados 25 caracteres de forma a identificar a subespécie de abelha tradicionalmente utilizada no Sul de Portugal, tendo chegado a três hipóteses plausíveis para entender correctamente a verdadeira natureza genética das abelhas locais, designadamente: (1) considerando que as populações de *A. m. iberiensis* são uma subespécie distinta de *A. m. mellifera*, então as abelhas locais do Sul de Portugal parecem manifestar alguma hibridação entre *A. m. mellifera* e *A. m. iberiensis*; (2) estas abelhas locais manifestam, aparentemente, algum grau de modulação ambiental se se considerar que a *A. m. iberiensis* não é uma subespécie distinta de *A. m. mellifera*; e (3) estas abelhas locais poderão ainda pertencer a uma zona de hibridação específica entre linhas de abelhas africanas e europeias (Europa Ocidental). Este estudo é corroborado, de certa forma, por trabalhos posteriores realizados por De La Rúa *et al.* (1998, 1999, 2001), os quais, resumidamente, referem que a Península Ibérica, juntamente com as Ilhas Baleares e Canárias são, provavelmente, os lugares da Europa com maior diversidade de patrimónios genéticos. Entre as diversas raças europeias a heterogeneidade racial da abelha ibérica notabiliza-se por reunir genes, tanto de origem do Norte de África (*A. m. intermissa*), como da Europa ocidental (*A. m. mellifera*) (De La Rúa *et al.*, 2001). Assim, neste estudo as colónias de abelhas melíferas nativas em Portugal serão referidas como *A. mellifera*, *sensu lato*.

### 2.1.1. Colónias da abelha melífera europeia, *A. mellifera* L.

As abelhas melíferas são insectos sociais que vivem em colónias. Cada colónia é constituída por duas castas de fêmeas e pelos machos: uma única rainha (fêmea fértil); vários milhares de obreiras (cujo número pode ser superior a 50 000; Figura 2.1.) por colónia; por um número variável de elementos na fase de criação (ovos, larvas e pupas); e algumas, poucas, centenas de zângãos (machos) na época de reprodução (Winston, 1987 e Sammataro *et al.*, 2000). Uma representação estilizada dos vários tipos de indivíduos que poderão ser encontrados numa colónia (Figura 2.2.).



**Figura 2.1.** Obreira adulta de uma colónia de abelhas melíferas portuguesas.



**Fonte:** <http://www.worldbook.com>

**Figura 2.2.** As três castas existentes numa colónia de abelhas melíferas.

A principal característica dos insectos sociais é a divisão de trabalho inerente a cada colónia, pelo que a sua organização social e a atribuição de tarefas são importantes temas dos estudos comportamentais dos insectos sociais (Winston, 1987).

Os insectos sociais têm como principal característica o facto de as obreiras executarem, individualmente, actos comportamentais de uma forma repetitiva e não casual (Gordon, 1996; Arathi *et al.*, 2000; Arathi e Spivak, 2001). A organização social existe a dois níveis: o nível individual, no qual a obreira executa uma grande variedade de actividades; e o nível da colónia (sociedade), caracterizado por complexas interacções entre os seus membros (Calderone e Page, 1991). O perfil comportamental das obreiras numa colónia é determinado pelas suas actividades colectivas, considerando as frequências relativas com que executam as diferentes tarefas e a organização social no interior da qual estas tarefas são executadas (Arathi *et al.*, 2000; Arathi e Spivak, 2001).

Estudos sobre a divisão de trabalho em colónias de abelhas *A. mellifera* demonstraram que as várias tarefas a executar no interior e no exterior da colónia são geralmente dirigidas pelas obreiras e variam em função da sua idade "polietismo", conduzindo desta forma a uma especialização das actividades entre obreiras (Winston, 1987; Calderone e Page, 1988; Seeley, 1995; Calderone, 1998). O "polietismo" em colónias de insectos sociais é um sistema altamente flexível, permitindo às obreiras responderem constantemente a alterações ambientais, determinadas por factores internos e/ou externos (Moritz e Southwick, 1992; Robinson, 1992). Existem vários factores que influenciam esta flexibilidade, incluindo, entre outros, alterações dos níveis hormonais das obreiras e a sua variabilidade genética na execução de dada tarefa (Calderone e Page, 1991; Calderone e Page, 1992; Calderone, 1998). Mesmo entre obreiras de idades semelhantes, a especialização para determinada actividade pode ocorrer (Visscher, 1983, citado por Arathi *et al.*, 2000).

Segundo Wilson (1985) existem tarefas gerais associadas à distribuição de idades das obreiras que envolvem várias funções comportamentais distintas. Assim, as jovens obreiras de 2 a 11 dias de idade, confinadas à área do ninho, demonstram uma forte probabilidade para a execução de múltiplas funções. Estas funções incluem a alimentação da criação, a limpeza e o polimento dos alvéolos, a construção dos favos, a

operulação da criação e corte à rainha (Winston, 1987). Entre os 11 e os 20 dias de idade, o procedimento habitual é receber e armazenar o néctar, acondicionar o pólen, remover restos e/ou detritos (incluindo abelhas mortas), etc. Após os 20 dias de idade, ainda que responsáveis pela ventilação da colónia, iniciam funções no exterior da colmeia (tornam-se guardas e forrageiras) (Winston, 1987).

Uma outra particularidade relativa às obreiras é a sua capacidade de produzir descendentes (zângãos) por partenogénese (ou seja, sem a intervenção do gâmeta masculino). Tipicamente, as obreiras poedeiras surgem sempre que uma colónia fica órfã (algumas obreiras activam os seus ovários e podem efectuar a postura de um considerável número de óvulos) e não tem possibilidade de criar uma nova rainha (Page e Erickson, 1988). Embora a colónia acabe por morrer, a estratégia reprodutiva das obreiras poedeiras é significativa do ponto de vista adaptativo. Na realidade, estes descendentes poderão eventualmente, transmitir genes para a próxima geração, [se encontrarem rainhas virgens e se conseguirem com elas acasalar Moritz e Southwick, (1992)].

A vida da colónia é regulada por uma grande quantidade de feromonas emitidas, principalmente, pela rainha. A rainha apenas deixa a colónia, para acasalar, quando ocorre a enxameação, ou quando uma colónia abandona a colmeia. A sua principal função é a postura dos ovos (Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992).

Normalmente, na região em estudo, a rainha pode iniciar a postura a partir do mês de Fevereiro e a sua taxa de produção pode aumentar até ao fim da Primavera. Os picos de postura geralmente ocorrem em plena Primavera e a partir da época estival, esta começa a declinar até, aproximadamente, meados de Outubro, quando cessa totalmente.

Na Europa, geralmente os zângãos apenas estão presentes nas colónias na época reprodutiva (que corresponde ao período do ano compreendido entre a Primavera e o fim do Verão). Estes não contribuem para a realização das tarefas necessárias ao normal funcionamento da colónia. Normalmente, são alimentados pelas obreiras, consomem o alimento armazenado na colónia e vivem na protecção do ninho. Contudo, os machos constituem uma importante componente na performance da colónia (Kraus *et al.*, 2003). A principal função dos zângãos visa o acasalamento com as rainhas provenientes de outras colónias (Winston, 1987; Sammataro *et al.*, 2000).

Além destas particularidades, é interessante realçar que as “relações de parentesco” entre os membros de uma colónia são diferentes quando comparados com outros animais de interesse zootécnico. Esta particularidade advém do sistema reprodutivo e do tipo de estrutura social inerente ao género *Apis*. As abelhas melíferas (*A. mellifera*) possuem um sistema reprodutivo que envolve, frequentemente, a realização de vários acasalamentos com diferentes zângãos, regra geral, num único voo nupcial. A rainha normalmente acasala com mais de 10 zângãos. Existem situações documentadas de vôos nupciais que envolveram 10 a 17 (Adams *et al.*, 1977) ou 10 a 28 (Neumann e Moritz, 2000) acasalamentos com diferentes zângãos. Consequentemente, uma colónia é um grupo familiar complexo, melhor descrito como uma superfamília. Esta superfamília é igualmente constituída por 10 a 17 subfamílias de obreiras (Laidlaw e Page, 1986; Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992).

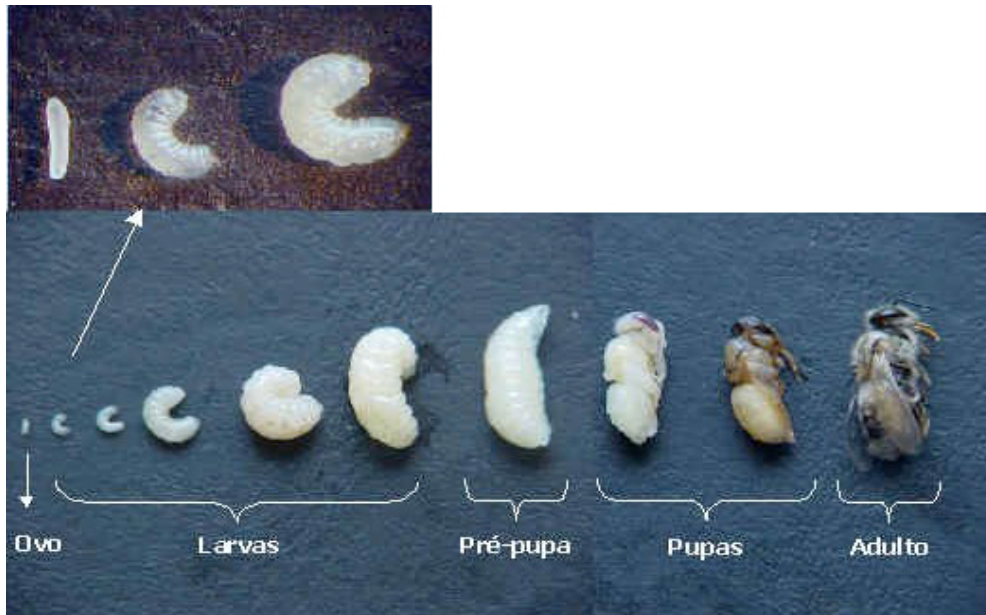
No que se refere às principais características do acasalamento natural, podemos afirmar que este ocorre no ar e em pleno voo (Koeniger *et al.*, 1979), preferencialmente acima dos 20 metros de altura, na denominada “zona de congregação de zângãos” (Moritz e Southwick, 1992). Esta área de acasalamento encontra-se a uma distância estimada entre 4 a 5 km do seu apiário de origem, sendo necessários mais de 10 minutos de voo para a realização desta actividade (Loper *et al.*, 1987, 1988). Não se sabe ainda como é que os zângãos determinam a localização exacta desta área de agregação. No entanto, como esta localização se mantém constante ao longo de vários anos, somos levado a pensar que as suas características geográficas e geofísicas proporcionam os sinais de orientação para os zângãos e rainhas (Loper *et al.*, 1988). Os zângãos são atraídos pelas rainhas apenas nesta área de acasalamento. No momento prévio ao acasalamento, as rainhas são perseguidas em voo por um cometa de centenas de zângãos, os quais morrem imediatamente após o acasalamento (Moritz e Southwick, 1992). Devemos contudo salientar, o facto destas características (sistema de acasalamento e reprodução) dificultarem, de forma natural, o controlo parental.

O mecanismo de determinação sexual dos membros das colónias de abelhas melíferas é baseado num sistema reprodutivo classificado como haplo-diploide, comum a todos os insectos da ordem Hymenoptera (Crozier, 1977). Desta forma, este mecanismo é baseado numa estratégia reprodutiva associada, uma vez que, adicionalmente á reprodução sexual que ocorre em colónias de abelhas melíferas ocorre



também a partenogénese. Em condições normais, as fêmeas (obreiras e rainha) desenvolvem-se a partir de ovos fecundados conservando o número diplóide ( $2n=32$ ) de cromossomas da espécie. Por sua vez, os machos, os zângãos, desenvolvem-se a partir de ovulos não fecundados, possuindo apenas um número haplóide ( $n=16$ ) de cromossomas (Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992; Ayasse *et al.*, 2001; Beye *et al.*, 2003). Também se podem desenvolver zângãos diplóides a partir de ovos fecundados (quando ocorre homozigose ao nível do gene sexual). Estes zângãos são detectados pelas obreiras e canibalizados imediatamente após a eclosão do ovo (estado larvar L1) (Adams *et al.*, 1977; Moritz e Southwick, 1992).

Em relação ao ciclo biológico das colónias de abelhas melíferas, pode-se afirmar que, o desenvolvimento individual dos elementos de cada colónia, ocorre através da sua metamorfose completa que compreende essencialmente quatro fases: o estado de ovo, larva, pupa e o estado adulto (Figura 2.3). Após 3 dias do estado de ovo (igual para todas as castas) as larvas eclodem. O estado larvar corresponde ao período de alimentação, caracterizado por elevados ganhos de peso e grande desenvolvimento corporal, em tamanho. Estas duas alterações ocorrem ainda no período de criação aberta. Posteriormente, as larvas tecem um casulo, passam por uma fase de prepupa e transformam-se em pupas, após as obreiras adultas terem operculado os seus alvéolos. O estado pupal corresponde ao período da metamorfose em que ocorre a mudança da pupa para o estado de imago. Quando esta transformação está completa, os insectos adultos emergem dos alvéolos e terminam o seu desenvolvimento em poucos dias (8 a 10 dias). O período de desenvolvimento do ovo até ao imago, ou insecto adulto, é diferente para cada um dos elementos da colónia, dependendo de vários factores ambientais (particularmente, da temperatura e da alimentação) e da raça de abelhas. Este período é, em média, de 21 dias para as obreiras, 24 dias para os zângãos e 16 dias para as rainhas (Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992).



Fonte: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>

**Figura 2.3.** Diferentes fases da metamorfose das abelhas obreiras.

A determinação da casta entre a rainha e as obreiras (que têm o mesmo genótipo) baseia-se na quantidade e qualidade de alimentos consumidos pelas larvas. São estes factores nutricionais (ou seja, a dieta da larva fêmea diplóide) que determinam se o adulto será uma rainha ou uma obreira. Nos três primeiros dias da fase larvar, todas as larvas são alimentadas exclusivamente com geleia real, uma secreção relativamente rica em proteínas segregadas pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas amas. Após estes dias, mel e pólen são adicionados à dieta alimentar das larvas que originarão obreiras. Por sua vez, as larvas destinadas a originarem rainhas são alimentadas com maiores quantidades de geleia real e por muito mais tempo (Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992). No que se refere à alimentação das larvas de zângãos, parece existir alguma diferença na quantidade e na composição da sua dieta, devido ao seu maior porte (Winston, 1987). Resumidamente, podemos afirmar que existem algumas diferenças nas necessidades alimentares e nos mecanismos de alimentação entre obreiras, rainhas e zângãos, tanto ao nível da criação (estado larvar) como do estado adulto.

Por último, alguma informação sobre o ciclo anual das colónias. Uma colónia é constituída por obreiras, cujo período de vida pode variar, de apenas alguns dias até

quase um ano. Esta longevidade depende, principalmente, das condições climáticas (relativas às estações do ano, ou seja, à sua actividade sazonal), da disponibilidade alimentar, das actividades desempenhadas durante o seu período vida e da raça de abelhas (Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992).

Nos climas temperados, o padrão normal que reflete o ciclo anual da colónia é, no Verão, caracterizado por uma longevidade individual para as obreiras adultas que pode atingir os 50 dias (com uma média inferior a 17 dias). No Inverno, a longevidade média pode variar entre 154 a 170 dias ou mais, com valores máximos registados de 350 dias de vida (Schmid-Hempel e Wolf, 1988; Fukuda e Sakagami, 1968, citados por Moritz e Southwick, 1992). Na Primavera, as obreiras têm uma longevidade intermédia, normalmente de 30 a 60 dias (Fukuda e Sekiguchi, 1966, citado por Winston, 1987). Por sua vez, os zângãos vivem em média 21 a 32 dias no período compreendido entre a Primavera e o Verão, embora tenha sido registada uma longevidade máxima de 43 dias (Witherell, 1972; Fukuda e Ohtani, 1977). Entre o Verão e o Outono os zângãos podem sobreviver até aos 90 dias, mas quando se aproxima o Inverno eles são expulsos da colónia, e poucos ou nenhum sobrevive (Fukuda e Ohtani, 1977). As rainhas são, de todos os elementos da colónia, os que apresentam uma maior longevidade, normalmente de 1 a 5 anos (Seeley, 1977).

Neste contexto, podemos afirmar que o ciclo anual de uma colónia nos países europeus de clima temperado possui uma fase invernal, caracterizada por uma “estratégia” de manutenção com apenas uma limitada produção de criação. Nesta fase, uma colónia de abelhas é constituída por uma rainha e poucos milhares de obreiras (8 000 a 15 000) (Kefuss, 1978), que nasceram no fim do verão anterior, e que se alimentaram predominantemente do mel armazenado nesse período (Martin *et al.*, 2001).

No fim do Inverno ou no início da Primavera, à medida que aumenta o fotoperíodo, a rainha inicia a postura, mas de uma forma ainda limitada (Kefuss, 1978; Martin *et al.*, 2001). O desenvolvimento exponencial da colónia, ou seja, a fase de rápido “crescimento somático (muito maior número de indivíduos) e da reprodução sexual (enxameação)”, ocorre durante as estações do ano em que existe maior abundância de néctar e pólen (Primavera e Verão). Consequentemente, com o aumento populacional, a colónia prepara-se para a enxameação (processo de reprodução das

colónias, por fissão da “colónia mãe”) (Moritz e Southwick, 1992). O pico de produção da criação é alcançado pouco antes da enxameação (Seeley e Visscher, 1985) com 30 000 ou mais alvéolos de criação operculada. Poucos dias antes da enxameação, a taxa de produção de criação diminui, porque a rainha diminui (ou pára) a sua postura (Moritz e Southwick, 1992).

Após a saída do novo enxame, uma nova rainha emerge na “colónia mãe”, mata as suas rivais e acasala, iniciando novamente a postura. Desta forma, a área de criação, aumenta novamente, até que a diminuição do fotoperíodo e os recursos alimentares diminuam. Nesta fase, a colónia altera a sua estratégia e prepara-se para poder sobreviver a condições inverniais mais ou menos rigorosas (Moritz e Southwick, 1992).

## **2.2. Recursos explorados pelas colónias**

Os princípios alimentares básicos das duas castas de fêmeas e dos machos de uma dada colónia são os mesmos: néctar e pólen.

Basicamente, o néctar fornece os hidratos de carbono, e o pólen fornece proteínas, lípidos, vitaminas e minerais (Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992).

O pólen recolhido pelas abelhas forrageiras é a principal fonte de proteína naturalmente disponível para as abelhas, usado como alimento na fase larvar e adulta (até aproximadamente aos 18 dias de idade) (Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992).

As abelhas forrageiras também recolhem néctar, o qual pode ser fornecido directamente à criação e abelhas adultas, mas normalmente é primeiro convertido em mel (Gary, 1975; Maurizio, 1975). O néctar floral contém essencialmente hidratos de carbono (principalmente frutose, glucose e sacarose) e água (Cobert, 2003). As abelhas possuem uma língua especializada (denominada proboscis) que funciona como uma bomba de sucção. O néctar é transportado para a colmeia na bolsa do mel (papo) das obreiras forrageiras. O néctar passa através do esófago para a bolsa do mel e pode passar, via proventriculo, para o ventriculo ou estômago glandular, em função das necessidades das obreiras. A bolsa do mel é essencialmente uma extensão do esófago que funciona como um órgão de armazenamento e transporte dos alimentos líquidos. Durante este transporte, são-lhe adicionadas enzimas das glândulas salivares e

hipofaríngeas (especificamente,  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e glucose oxidase) que reduzem os hidratos de carbono mais complexos em açúcares simples, sendo esta uma parte do processo de conversão do néctar em mel. Posteriormente, é armazenado na colónia, tal como o pólen, constituindo-se como reservas alimentares para o Inverno e outros períodos de escassez (Crane, 1990a).

A água também é um elemento essencial usado na fase larvar e adulta. As abelhas forrageiras também recolhem a água, que é transportada para a colmeia na bolsa do mel e posteriormente transferida para as jovens obreiras. Ao nível da colónia, a água é utilizada, principalmente, para diluir o néctar e/ou mel preparar o aquoso alimento larvar (geleia de obreira) e, sempre que necessário, para o arrefecimento da colónia (Winston, 1987; Moritz e Southwick, 1992). Segundo Jean-Prost (1989) as necessidades de uma colónia em água são muito variáveis, aproximadamente doze litros por colónia/ano.

O própolis é o produto da recolha e da elaboração (pelas obreiras) de misturas de cera e resinas vegetais provenientes de secreções de plantas (árvores e arbustos) (Burdock, 1998 e Bankova *et al.*, 2000). Ao nível da colónia, o própolis é utilizado em actividades de construção, conservação, isolamento e protecção (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998). As abelhas recolhem (com as mandíbulas) partículas resinosas de diferentes plantas, que posteriormente (na colmeia) misturam com cera e secreções salivares obtendo assim o própolis (Winston, 1987; Jean-Prost, 1989).

## **2.3. Produtos apícolas**

Além do mel e do pólen, a cera, o própolis, a geleia real e o veneno são também “produtos da colmeia”.

### **2.3.1. Pólen**

Em virtude do seu alto valor nutritivo, o pólen é utilizado na suplementação alimentar dos seres humanos, na indústria cosmética e, também em apiterapia. Pode ser comercializado sob diversas formas: misturado com o mel, seco, sob a forma de cápsulas ou tabletes e em forma de pó (Bogdanov, 2004).

Portugal não é um país com tradição na produção de pólen, possuindo um mercado muito reduzido. No entanto, recentemente este produto tem despertado o interesse de vários apicultores como alternativa à produção de mel.

Por outro lado, não se dispõe de dados fiáveis sobre a produção e comercialização de pólen a nível mundial. Segundo estimativas recolhidas junto dos operadores deste sector pode-se afirmar que a produção mundial é da ordem das 1 500 toneladas, sendo os principais produtores a Espanha, China, Austrália, Argentina, México, Estados Unidos (William, 2003).

### **2.3.2. Cera**

A cera segregada pelas glândulas cerígenas localizadas no abdómen das jovens abelhas é utilizada para a construção dos alvéolos (hexagonais), os quais formam a base da arquitectura do ninho (Winston, 1987).

Os apicultores reutilizam a maior parte da cera produzida nos seus apiários. A composição química da cera varia ligeiramente em função da idade das abelhas que a produzem e da sua raça. A cera produzida por colónias de *A. mellifera* é constituída principalmente por ésteres (70-80 %), hidrocarbonetos (10-15%), álcoois (10%) e ácidos livres (1%), numa mistura complexa de 284 componentes (nem todos ainda identificados). As indústrias de cosmética, farmácia e de produção de velas são as principais utilizadoras de cera (embora seja também utilizada na indústria têxtil, no fabrico de polidores e vernizes, no processamento de alimentos e na indústria tecnológica). Os principais produtores de cera são os países asiáticos, nomeadamente a China, Índia, Indonésia, Malásia, Paquistão e Tailândia. Alguns dos principais importadores estão na União Europeia (Alemanha e França), na Ásia (Japão) e na América do Norte (Estados Unidos e Canadá) (Crane, 1990b). Em Portugal não existem dados oficiais sobre a produção de cera.

### **2.3.3. Própolis**

A produção anual de própolis (10-300 g/colónia) é muito variável, dependendo da espécie de abelhas, do clima, do tipo de plantas e do sistema de recolha (Bankova *et al.*,

2000; Kumazawa *et al.*, 2003). A composição química do própolis é muito complexa e diversificada, apresentando como principais grupos químicos, os flavonóides, os compostos fenólicos e diversos compostos aromáticos (Marcucci, 1995; Sahinler *et al.*, 2003). No própolis europeu, o conteúdo total em compostos fenólicos (principais responsáveis pela maioria das suas propriedades farmacológicas) representa mais de metade dos 160 compostos diferentes que já foram identificados (Bankova *et al.*, 2000, 2002).

Ao própolis têm sido atribuídas, entre outras, propriedades fungicidas, bactericidas, antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias. O própolis tem sido amplamente utilizado, desde a antiguidade, por diversas culturas e com diversas finalidades. Entre elas, a medicina e indústria farmacêutica (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995; Burdock, 1998). Nos últimos anos, tem-se observado um incremento da sua procura no mercado, aliado também a uma crescente actividade de investigação sobre as suas acções, efeitos e possíveis usos em biologia e medicina. Destaca-se a sua aplicação como suplemento dietético e o seu uso na indústria farmacêutica (Negri *et al.*, 1998; Burdock, 1998; Bankova *et al.*, 2000, 2003; Garedew *et al.*, 2002; Sahinler *et al.*, 2003; Farre *et al.*, 2004).

Contudo, existe uma grande dificuldade em estabelecer uma uniformidade de critérios, relativamente à sua composição química, para a sua normalização a nível internacional. Este, provavelmente será o principal obstáculo para a sua comercialização e para a expansão da sua utilização em medicina (Bankova, 2003).

A apresentação comercial do própolis é muito variada, estando disponível, sob a forma de cápsulas, tabletes, grânulos para fundir, pastilhas para a garganta e pastilhas elásticas. Entre os principais produtores encontram-se a China, Austrália, o Brasil e o Uruguai e, na Europa, a Bulgária, a França, a Alemanha e a Rússia. O Japão é o maior consumidor mundial de própolis (Crane, 1990c; William, 2003; Vespa, 2004). Em Portugal não existem dados oficiais sobre a sua produção.

#### **2.3.4. Geleia real**

A geleia real, é um produto de origem animal, dado que deriva das secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares das obreiras jovens (Crane, 1990c; Garcia-

Amoedo e Almeida-Muradian, 2002). É utilizada pela colónia na alimentação das larvas, tendo uma função relevante na diferenciação das suas castas (Moritz e Southwick, 1992; Garcia-Amoedo e Almeida-Muradian, 2002).

A geleia real é uma substância viscosa, de coloração branco-leitosa, levemente opalescente, ácida e de sabor e odor muito característicos (Sabatini *et al.*, 2003). A sua composição química é relativamente constante, basicamente constituída por água, hidratos de carbono, lípidos, prótidos e cinzas. Por ser um produto de difícil obtenção e de considerável procura, nomeadamente pela indústria farmacêutica e pela indústria de cosméticos, alcança preços consideráveis no mercado (Crane, 1990c).

Pode ser produzida por apicultores competentes e comercializada pura, misturada com o mel ou liofilizada. A China, sendo o principal produtor (responsável por cerca de 60% da produção mundial), exporta aproximadamente 2 000 toneladas/ano para o Japão, Estados Unidos e Europa. Os preços são muito variáveis, mas normalmente o produto fresco tem custos inferiores ao produto liofilizado (Crane, 1990c; William, 2003). Em Portugal não existem dados oficiais sobre a produção de geleia real.

### **2.3.5 Veneno**

A “apitoxina” (veneno desidratado) tem origem em secreções glandulares das obreiras (glândulas ácida e alcalina, do aparelho vulnerante). O veneno é sobretudo produzido, nas duas primeiras semanas de vida das obreiras e, armazenado no “saco do veneno” (acumulando-se aí em quantidades de cerca de 0,3 mg) (Jean-Prost, 1989; Crane, 1990c).

A “apitoxina” apresenta-se como um líquido incolor, solúvel em água e insolúvel em álcool (Salamanca Grosso *et al.*, 2001; Patricio *et al.*, 2003). O veneno das abelhas caracteriza-se por uma actividade farmacológica particularmente elevada e diversa, que depende essencialmente da sua composição química. Contém um amplo espectro de proteínas (como a melitina ou a apamina) e enzimas (fosfolipase e hialuronidase), de péptidos, aminas, hidratos de carbono, fosfolípidos, aminoácidos e algumas feromonas de “alarme” (Jean-Prost, 1989; Crane, 1990c; Salamanca Grosso *et al.*, 2001). Os recentes êxitos na purificação do veneno das abelhas e na identificação e determinação quantitativa dos seus principais componentes criaram novas possibilidades para a



normalização deste produto e seu uso farmacológico (Salamanca Grosso *et al.*, 2001; Patricio *et al.*, 2003).

No caso dos himenópteros sociais, o veneno tem uma função puramente defensiva. As abelhas melíferas utilizam o veneno, não para capturar presas, mas para defender as suas sociedades de predadores (sobretudo os mamíferos ou outros vertebrados) (Winston, 1987; Crane, 1990c). O interesse pelo estudo do veneno dos himenópteros baseia-se essencialmente nos problemas clínicos causados pela sua acção directa (particular referência às respostas alérgicas) e pelo seu potencial de utilização em farmacologia (fonte potencial de substâncias úteis para a medicina, para a indústria química e para a investigação biológica). Os efeitos terapêuticos do veneno são conhecidos desde há mais de 12 séculos. No entanto, a sua utilização em medicina tradicional só se desenvolveu (e recebeu a aprovação oficial) nos países em que a apiterapia tem tradição (como, por exemplo, na China e em países do Leste Europeu). A medicina tradicional apenas adoptou um método preventivo de dessensibilização de pessoas alérgicas (imunoterapia específica). Apesar disso, trata-se de um produto de mais difícil comercialização pois, ao contrário de outros produtos apícolas, a apitoxina deve ser comercializada e manipulada por farmácias e indústrias de processamento químico, devido à sua acção tóxica (Crane, 1990c; Salamanca Grosso *et al.*, 2001; Szczesna e Rybac-Chmielewska, 2003).

Os dados estatísticos sobre a produção de veneno e a sua comercialização a nível mundial são escassos e pouco precisos. Os principais países produtores e utilizadores deste produto são os Estados Unidos, Brasil, China, Israel, Japão, Egipto, e, a nível da Europa, a Alemanha, França, Itália e Espanha (Crane, 1990c; Salamanca Grosso *et al.*, 2001; Szczesna e Rybac-Chmielewska, 2003).

Em Portugal não existem dados oficiais sobre a produção e comercialização de apitoxina.

#### **2.4. Inimigos naturais e patologias das abelhas melíferas**

A abelha melífera ocidental, como todos os seres vivos, em todas as fases do seu desenvolvimento, está sujeita ao ataque de vários inimigos (predadores, parasitas e agentes patogénicos vários) que agem, directa ou indirectamente, perturbando a vida da

colónia de várias formas. Alguns inimigos (alguns mamíferos, aves e insectos), cuja acção é limitada no tempo e no espaço, não provocam danos elevados excepto em circunstâncias excepcionais (Ben Hamida, 1999). Por exemplo, destruição dos favos e/ou da colmeia, consumo das reservas alimentares, captura das abelhas forrageiras e algumas formas menos graves de parasitismo. Os nemátodos estão ocasionalmente associados às abelhas melíferas, tendendo a causar danos insignificantes (Knutson e Murphy, 1990; Bailey e Ball, 1991).

São várias as espécies de insectos que podem parasitar as abelhas melíferas adultas e/ou a sua criação. O insecto [*Braula coeca* Nitzsch (Díptera: Braulidae)] vulgarmente designado por “piolho” da abelha comum é, mais frequentemente, descrito como um inquilino das colónias de abelhas melíferas do que propriamente como um parasita, e está associado especificamente a estas abelhas, causando danos desprezíveis, excepto se existir num número extraordinariamente elevado (Bailey e Ball, 1991). É também conhecido que várias famílias de moscas parasitárias (Díptera) atacam ocasionalmente as colónias de abelhas. Alguns destes insectos são parasitas cuja importância é mais relevante a nível local. É o caso das moscas vivíparas (Díptera: Sarcophagidae) e algumas outras famílias Conopidae e Tachinidae que podem parasitar também as abelhas adultas da espécie *A. mellifera* (Crane, 1990a). Outros insectos vivíparos que parasitam as abelhas melíferas pertencem à ordem Streptocera e género *Stylops*. (Crane, 1990a; Bailey e Ball, 1991). Pelo menos 8 espécies de besouros (*Meloe spp.*) parasitam as abelhas melíferas durante o seu primeiro estado larvar (Crane, 1990a). Poucos destes parasitas são economicamente importantes, a menos que em número excepcionalmente elevado (Crane, 1990a; Matheson, 1993, 1995, 1996; Ben Hamida, 1999).

Outros inimigos, designadamente vírus, bactérias, protozoários e fungos ocasionalmente provocam importantes perdas económicas (Morse e Flottum, 1997; Bailey e Ball, 1991) e, geralmente, são os agentes causais das principais patologias apícolas das abelhas melíferas.

Para facilitar a compreensão da etiologia das principais patologias apícolas é necessário referir que estas podem ser classificadas em função do agente causante ou da especificidade da fase de metamorfose da abelha (fase de larva ou fase adulta), para determinado agente patogénico. Neste último caso, podem ser agrupadas em: (1)

patologias da criação; (2) patologias das abelhas adultas e, (3) patologias comuns à criação e abelhas adultas.

De uma forma muito geral pode-se afirmar que, nas patologias mais comuns da criação, se incluem as loques (causadas por agentes bacterianos), a ascosferiose (causada por fungos) e o vírus da larva saculiforme.

Nas patologias mais comuns das abelhas adultas, incluem-se a acarapisose (causada por um ácaro, *Acarapis woodi*), a nosebose (causada por um protozoário, *Nosema apis*), a amebíase (causada pela ameba *Malpighamoeba mellificae*), a septicémia (agentes bacterianos vários), o vírus da paralisia crónica.

Nas principais patologias que são comuns à criação e abelhas adultas podem-se incluir a varroose (associada ao ácaro *V. destructor*) e a aspergilose (causada por fungos tais como *Aspergillus flavus* e/ou *Aspergillus fumigatus*). Existem ainda várias classes de vírus, nomeadamente, o vírus da paralisia aguda e o vírus das asas deformadas que normalmente são associados com a varroose.

Pode-se assim afirmar que, antes do aparecimento do ácaro *V. destructor*, as doenças que provocavam maiores perdas económicas eram as loques bacterianas, denominadas doenças da criação, porque apenas manifestam sintomas na fase larvar das abelhas melíferas. Estas são, a loque europeia causada por *Melissococcus plutonius* e a loque americana causada por *Paenibacillus larvae larvae* (Shimanuki, 1997; Crailsheim e Riessberger-Gallé, 2001). A ascosferiose, causada pelo fungo (*A. apis*), infecta as larvas mas raramente origina perdas importantes (Gilliam e Vandenberg, 1997) e é a infecção fúngica mais frequente das abelhas melíferas.

A nosebose, causada pelo parasita intestinal *N. apis* Zander (Cnidosporidea), é uma doença das abelhas adultas mas raramente ocasiona danos graves nas colónias (Bailey e Ball, 1991; Chioveanu *et al.*, 2004), apesar de poder ter impactos económicos negativos na actividade apícola.

#### **2.4.1. Ácaros associados às abelhas melíferas**

Mais de 40 espécies de ácaros (Acari) têm sido associados às abelhas melíferas (Eickwort, 1990), variando esta associação do comensalismo ao parasitismo (Colin *et al.*, 1999); são conhecidas 6 espécies de ácaros que parasitam a abelha *A. mellifera*

(Bailey e Ball, 1991). O Quadro 2.1 mostra a relação dos ácaros que parasitam a abelha *A. mellifera* e menciona também alguns ácaros foréticos encontrados em colónias de abelhas melíferas mas que não se alimentam delas.

Em Portugal, as doenças mais comuns provocadas por ácaros pertencem a dois géneros: *Acarapis* e *Varroa*. O ácaro endoparasita *A. woodi* Rennie (Acari: Tarsonemidae) aloja-se no primeiro par de traqueias torácicas, perfurando-as e alimentando-se da hemolinfa das abelhas adultas (Crane, 1990; Bailey e Ball, 1991; De Guzman *et al.*, 2001b).

**Quadro 2.1.** Ácaros parasitas (e alguns não parasitas) da abelha *A. mellifera* (adaptado de Denholm, 1999 e Crane, 1990).

Família	Espécie
Tarsonemidae <sup>1</sup>	<i>Acarapis woodi</i>
	<i>Acarapis externus</i>
	<i>Acarapis dorsalis</i>
Varroidae <sup>1</sup>	<i>Varroa jacobsoni</i>
	<i>Varroa destructor</i>
Laelapidae <sup>1</sup>	<i>Tropilaelaps clareae</i>
Erythraeidae <sup>2</sup>	<i>Leptus spp.</i>
Pyemotidae <sup>2</sup>	<i>Pyemotes spp.</i>
Ameroseiidae <sup>3</sup>	<i>Neocypholaelaps indica</i>
Laelapidae <sup>3</sup>	<i>Melittiphis alvearius</i>
Macrochelidae <sup>3</sup>	<i>Macrocheles glaber</i>
	<i>Macrocheles muscaedomesticae</i>
Pyemotidae <sup>3</sup>	<i>Pyemotes spp.</i>
	<i>Pyemotes tritici</i>
Tarsonemidae <sup>3</sup>	<i>Tarsonemus apis</i>

1. Parasitas mais frequentes nas abelhas melíferas (Bailey e Ball, 1991; Denholm, 1999).

2. Parasitas menos frequentes nas abelhas melíferas (Bailey e Ball, 1991; Denholm, 1999).

3. Famílias de ácaros não parasitas encontrados em colónias de abelhas (Crane, 1990).

#### 2.4.1.1. Ácaros do género *Varroa*

O ácaro *Varroa* foi primeiramente identificado no continente asiático, nomeadamente na ilha Indonésia de Java, por Edward Jacobson e descrito, pela primeira vez, no ano de 1904 pelo entomologista Holandês A. C. Oudemans (Oudemans, 1904, citado por Denholm, 1999). Este ácaro foi denominado *Varroa jacobsonii* Oudemans e considerado como um parasita natural da abelha melífera asiática, *Apis cerana* (Oudemans, 1904, citado por Anderson e Trueman, 1999).

Após a sua descoberta em Java, outros ácaros aparentemente semelhantes foram detectados na abelha *A. cerana* em toda a Ásia, assumindo-se que eram representativos da espécie *V. jacobsonii* Oudemans. Esta espécie de ácaros foi classificada como pertencente à Ordem Mesostigmata e à família Varroidae que incluía os ácaros *V. jacobsoni* e *Euvarroa sinhai*, os quais parasitam as abelhas selvagens e domésticas do sudoeste da Ásia, Índia, Coreia e do extremo oriente asiático (Delfinado e Baker, 1974). Paralelamente, várias publicações científicas e técnicas adoptaram para esta espécie o termo usual “*Varroa*”. Delfinado-Baker e Aggarwal (1987) afirmaram que esta terminologia não era taxonomicamente correcta devido ao facto de existir mais do que uma espécie de *Varroa*. Variações geográficas a nível da morfologia externa do ácaro mostravam que o ácaro fêmea *V. jacobsoni* que parasitava a abelha *A. cerana* era mais pequeno do que o ácaro fêmea que parasitava a abelha *A. mellifera* (Delfinado-Baker e Houck, 1989). Posteriormente, estudos de sequências de DNA confirmaram que os ácaros que parasitavam estas duas espécies de abelhas melíferas eram muito diferentes entre si (Anderson e Fuchs, 1998). De forma a compreender o significado das diferenças detectadas entre os ácaros Javaneses e os Europeus foram realizados vários estudos, utilizando recentes técnicas moleculares (por exemplo, estudos moleculares usando DNA mitocondrial e microssatélites), as quais demonstram que o “ácaro *V. jacobsoni*” era um complexo de espécies com, pelo menos, 5 espécies aparentadas mas diferentes e que apenas os ácaros de uma dessas espécies se propagaram da abelha oriental para a ocidental (Anderson e Fuchs, 1998; Anderson e Trueman, 1999). Estes ácaros não pertenciam à espécie *V. jacobsoni*, existindo assim a necessidade de lhes atribuir uma nova designação taxonómica (Anderson e Trueman, 1999). Consequentemente, esta nova espécie foi renomeada *Varroa destructor* Anderson e Trueman, 2000. Assim, a

generalidade dos trabalhos efectuados “a ocidente”, anteriores a 2000/2001 e que se referem à *V. jacobsoni*, efectivamente incidiram sobre *V. destructor*.

#### **2.4.1.2. Dispersão do ácaro *V. destructor***

Quanto à dispersão da *V. destructor*, coloca-se a hipótese de que tenha migrado desde a antiga União Soviética (URSS) para os restantes países da Europa oriental devido à importação de rainhas e à prática de transumância em apicultura (Crane, 1978; Anderson e Trueman, 1999; Colin *et al.*, 1999).

Na Europa ocidental, o ácaro foi também introduzido pela importação de colónias paquistanesas de *A. cerana* e de colónias soviéticas de *A. mellifera*, ambas para a República Federal Alemã em 1977 (Rutner, 1983, citado por Colin *et al.*, 1999). O parasita é assinalado oficialmente no sul da Europa nos anos 80. Em Espanha, o ácaro foi diagnosticado pela primeira vez no ano de 1985 (Cardenal Galván *et al.*, 1988; Gómez Pajuelo, 2000). Em Portugal os primeiros indícios de colónias parasitadas foram detectados em 1987 (Belchior, 1996), em apiários situados em zonas fronteiriças propagando-se rapidamente às restantes regiões do país. Posteriormente, em Abril de 1992, o ácaro *V. destructor* (ainda que então designado como *V. jacobsoni*) foi detectado no Reino Unido (Paxton, 1992, citado por Martin, 1997b).

Este parasita atravessou o mar Mediterrâneo em 1975, pela importação de colónias da Roménia para a Tunísia, propagando-se assim para o Norte de África. Paralelamente, a invasão da América do Sul ocorreu a partir do Japão, também nos anos 70, pela exportação de rainhas e de quadros com criação para o Paraguai (em 1971). Um ano depois, foi detectada no Brasil (Colin *et al.*, 1999). Na América do Norte, este ácaro foi detectado em 1987 nos Estados Unidos (Needham, 1988) ainda que, no Estado do Alasca este tenha só sido detectado em Fevereiro de 1992 (Petersen, 1999). Na América Central, a sua detecção ocorreu em 1991, no México (Vandame *et al.*, 1998). Posteriormente, foi detectado na Nova Zelândia em Abril de 2000 (Stone *et al.*, 2000; Zhang, 2000; Goodwin, 2004). A partir dos primeiros focos detectados desta nova patologia, em menos de 20 anos, a *V. destructor* distribuiu-se amplamente pela maioria dos continentes. Actualmente, apenas o Estado do Havai (Sammataro *et al.*, 2000), a

Austrália e algumas regiões da África Central estarão ainda livres deste parasita (Oldroyd, 1999; Moustafa, 2001).

A dispersão da *Varroa* pode ser realizada de várias formas: (1) dentro do mesmo apiário, através da deriva das abelhas recolectoras ou do livre trânsito dos zângãos, da pilhagem de colónias parasitadas, da enxameação, pela troca de quadros entre colónias, etc.; (2) entre apiários, através da enxameação (por exemplo, captura de enxames parasitados), pelas trocas de colónias entre apicultores, por meio de zângãos parasitados, pela introdução de rainhas, através de enxames selvagens, etc e (3) pela prática de apicultura transumante ou migratória, assim como pela importação de stocks de abelhas e/ou rainhas parasitadas (De Jong *et al.*, 1982a, 1982b; Matheson, 1996; Thompson *et al.*, 2002). Por sua vez, as vespas e os géneros de abelhão *Psithyrus* podem ajudar a disseminar os ácaros e as flores podem actuar como “uma pequena estação intermediária”, embora a importância relativa destes meios de dispersão seja provavelmente insignificante (Kevan *et al.*, 1990, citado por Denholm, 1999). Outro factor que pode facilitar esta dispersão é a introdução de colónias parasitadas em novas áreas pelos apicultores (Denholm, 1999).

Neste contexto, e tentando de alguma forma clarificar o aspecto relacionado com a dispersão dos ácaros através da deriva, pode-se referir que este é um fenómeno, no qual, algumas abelhas podem deixar os seus próprios ninhos para se juntar a outras colónias, como resultado da sua desorientação quando regressam à colmeia (Pfeiffer e Crailsheim, 1998). Este fenómeno depende de múltiplos factores ambientais, da disposição das colmeias no apiário e ainda de factores intrínsecos à colónia (Neumann *et al.*, 2000b). No seio da comunidade científica, tem sido referida a possibilidade das obreiras e dos zângãos poderem ser vectores de várias patologias, através da deriva e da pilhagem (De Jong *et al.*, 1982a; Sakofski, 1990; Vandame *et al.*, 1998). Segundo De Jong *et al.* (1982b) a deriva de abelhas parasitadas entre colónias pode provocar a infestação total de um apiário, em poucas semanas, após a infestação inicial. Por sua vez, Sakofski (1990) verificaram um aumento da deriva em obreiras de colónias com elevados níveis de infestação. Porém, num estudo recente Neumann *et al.* (2000b) constatou-se que a deriva pode ser muito mais elevada nos zângãos do que nas obreiras. Foi também sugerido que, se o apiário tiver uma disposição que reduza o nível de deriva

das obreiras a menos de 5%, este fenómeno aparentemente não interfere nem com o nível de eficiência produtivo da colónia, nem com o nível de infestação das colónias.

No que se refere à pilhagem, esta pode ser definida como um comportamento impulsivo das obreiras para roubar (fundamentalmente mel), frente a situações predisponentes muito diversas e na presença de um estímulo desencadeador (períodos de escassez de néctar, principalmente). Esta, tem sido referida também como uma via possível de propagação de diferentes patologias, entre outras, a varroose. Convém no entanto salientar que este é um fenómeno aparentemente passível de ser prevenido, através de um manejo racional dos apiários comerciais (por exemplo, reduzindo o tamanho da entrada da colmeia, evitando colmeias fracas ou órfãs) (Vandame *et al.*, 1998; Cartel, 2005).

#### **2.4.1.3. Danos directos e indirectos do ácaro *V. destructor***

Os danos causados pela varroa podem ser directos ou indirectos. As colónias parasitadas podem ser afectadas de diferentes formas, desde a debilidade até à morte, estando a sua gravidade directamente relacionada com o nível de infestação (Duay *et al.*, 2003; Garedew *et al.*, 2004).

Os danos directos desta parasitose podem ser físicos ou fisiológicos e ocorrem maioritariamente durante o desenvolvimento individual dos elementos da colónia. O parasita alimenta-se da hemolinfa das pupas e ao nível da criação provoca um atraso na eclosão das jovens abelhas (consequência de um atraso no seu desenvolvimento durante o estado de pupa) e, inclusive, a sua morte. Ao nível das abelhas adultas, estes danos podem significar menor peso (tamanho) das abelhas jovens que emergem, malformações anatómicas (deformação das asas e abdómen), redução do seu período de vida (morte prematura) e, possivelmente, debilitação do seu sistema imunológico (De Jong *et al.*, 1982b; Bailey e Ball, 1991; Denholm, 1999; Garedew *et al.*, 2004).

Os danos indirectos estão relacionados com o pressuposto de que os ácaros aumentam a incidência de patologias, porque actuam como vectores de agentes patogénicos (Ball, 1994). Existe evidência do aumento da incidência de viroses (nomeadamente, o vírus da paralisia aguda e o vírus das asas deformadas) em colónias parasitadas, (Bailey e Ball, 1991; Ball, 1993; Ball, 1994; Denholm, 1999) nas quais a



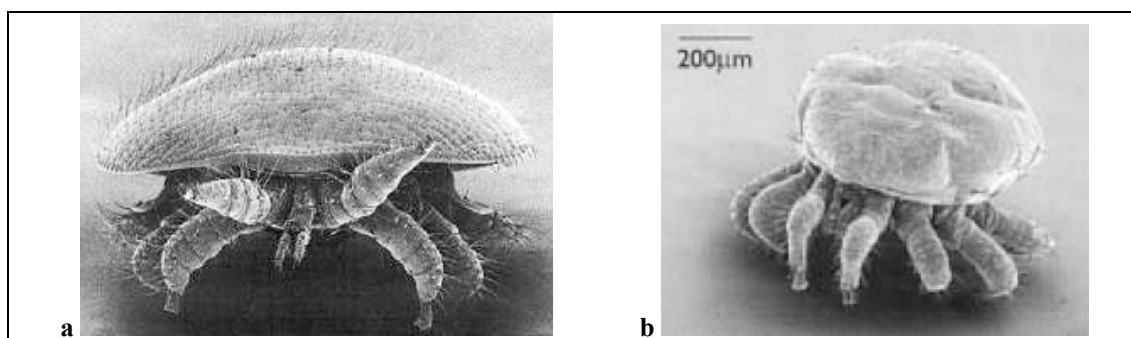
varroa actua como vector na transmissão destes vírus (Bowen-Walker *et al.*, 1999). Deste modo, é de esperar uma menor eficiência produtiva em colónias consideravelmente, infectadas com varroa e, conseqüentemente, uma menor rentabilidade da exploração apícola.

### 2.4.2. Caracterização e ciclo biológico do ácaro *V. destructor*

O ácaro *V. destructor* é um ectoparasita da criação e das abelhas adultas de várias espécies do género *Apis* (De Jong, 1990), alimentando-se da hemolinfa dos seus hospedeiros. Causa elevados danos em colónias de *A. mellifera*, as quais, morrem geralmente no intervalo de um a três anos após o início de uma infestação (Chastel *et al.*, 1991; Murilhas, 1998; Thompson *et al.*, 2002).

#### 2.4.2.1. Caracterização anatomo-morfológica

O ácaro *V. destructor* é um ectoparasita das abelhas que as poderá afectar desde o estado larvar (L5). Possui um sistema de determinação sexual haplo-diplóide. Os machos são haplóides ( $n=7$ ) e as fêmeas são diplóides ( $2n=14$ ) (Rehm e Ritter, 1989; Steiner *et al.*, 1995). A fêmea (Figura 2.4a) e o macho (Figura 2.4b) apresentam um grande dimorfismo sexual, traduzido na forma do corpo, pelo tamanho e pela cor.



**Figura 2.4.** Fêmea (a) e macho (b) de *V. destructor*, ao microscópio electrónico (adaptada de International Bee Research Association, 1997).

As fêmeas têm o corpo de forma elipsoidal e achatado, o qual é mais largo do que comprido, medindo aproximadamente 1,6 mm de largura e 1,1 mm de comprimento, com um peso aproximado de 0,14 mg (Sammataro *et al.*, 2000). A sua cor base é

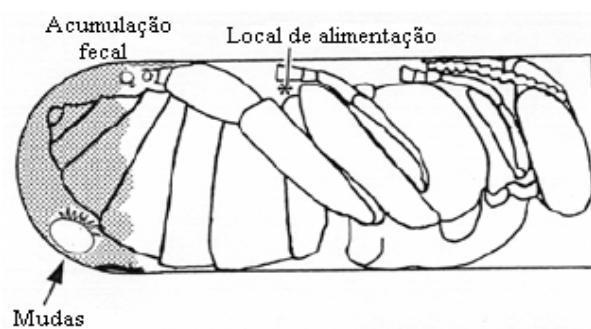
castanha, mas possui uma gama de cores que variam à volta do castanho-avermelhado (Nanneli, 1996). As fêmeas possuem quatro pares de patas com ventosas para a sua fixação nas abelhas e duas quelíceras (Delfinado e Baker, 1974). Comparativamente, os machos adultos são mais pequenos do que as fêmeas, o seu corpo tem uma forma ovóide, de cor amarelada, medindo aproximadamente por 500  $\mu\text{m}$  de largura (Sammataro *et al.*, 2000). As suas quelíceras estão modificadas possuindo um dígito móvel que foi transformado numa estrutura tubular para transferência do sémen. Não têm capacidade de se alimentar, morrendo após a cópula (Delfinado e Baker, 1974; Delfinado-Baker, 1984; Martin *et al.*, 1997).

#### **2.4.2.2. Características gerais da invasão alveolar e do parasitismo**

A fêmea adulta do ácaro invade os alvéolos de cria das obreiras e dos zângãos, um a dois dias antes da operculação dos alvéolos, transportada pelas abelhas amas enquanto estas alimentam a sua criação (De Jong *et al.*, 1982a; Sammataro *et al.*, 2000). Normalmente, esta invasão ocorre entre 15-20 horas antes da operculação (os alvéolos de criação e obreira, ou entre as 40-50 horas no caso da criação de zangão) (Boot *et al.*, 1992). As fêmeas do ácaro vão rapidamente para baixo da larva, ficando imóveis no alimento larvar (geleia de obreira). Aproximadamente 4-6 horas após a operculação dos alvéolos de obreiras, o alimento é consumido pelas larvas. O ácaro sai então da posição em que estava e começa a alimentar-se da hemolinfa das formas juvenis (Boot, 1994; De Jong *et al.*, 1984). Como já referido, a hemolinfa das prepupas, pupas e abelhas adultas é a única fonte alimentar da varroa fêmea. Existem distintos locais sobre o corpo da abelha adulta aonde o ácaro se pode fixar (Delfinado-Baker *et al.*, 1992). Um destes locais é o abdómen e, para se alimentar, o ácaro fêmea perfura a membrana abdominal intersegmentar do seu hospedeiro (Strick e Madel, 1988, citado por Sammataro *et al.*, 2000), injectando um fluido provavelmente de origem salivar (Gelbe *et al.*, 1987, citado por Denholm, 1999). Normalmente, sobre a prepupa ou pupa esta perfuração ocorre num local situado sobre a quinta estérnite, o qual é impedido de cicatrizar pela acção repetida de alimentação da fundadora (varroa adulta fêmea em estado activo de reprodução) e pela sua descendência (Donzé e Guerin, 1994; Sammataro *et al.*, 2000).

Na Figura 2.5 pode observar-se a aparência do ácaro *V. destructor* e o local mais frequente da sua alimentação (indicado por um \*) nas células de criação.

No que se refere à invasão dos alvéolos com criação, podemos afirmar que existem vários factores que determinam a ocorrência deste processo. Aspectos particulares da invasão alveolar devem ser salientados para uma melhor compreensão deste fenómeno. Uma fase importante no ciclo de vida do parasita *V. destructor* é a escolha do tipo de alvéolo de criação das abelhas para a sua reprodução (De Jong *et al.*, 1985; Martin, 1994). Este aspecto tem sido frequentemente estudado, verificando-se uma maior ocorrência relativa de ácaros nos alvéolos de cria de zângãos (Le Conte *et al.*, 1989; Fuchs, 1990; Le Conte *et al.*, 1990; Martin, 1995a). Corroborando este facto, Boot *et al.* (1995) concluíram que os ácaros invadem os alvéolos com crias de zângãos com uma frequência 11,6 vezes maior do que o fazem com crias de obreiras crias de obreiras, ao analisarem colónias que foram manipuladas no sentido de terem apenas criação de zângãos.



**Figura 2.5.** Representação esquemática da estrutura espacial da reprodução das varroas em alvéolos com criação no estado de pupa (Adaptado de Donze *et al.*, 1998).

Outros factores que influenciam os ácaros no processo de selecção dos diferentes alvéolos que vão invadir estão relacionados com a idade, o sexo e a casta das larvas, a arquitectura do favo (diâmetro e profundidade, ou seja, a distancia entre as margens exteriores dos alvéolos e a superfície da larva) e o tamanho dos alvéolos (De Jong *et al.*, 1985; Cobey e Lawrence 1988; Le Conte *et al.*, 1989; Trouiller *et al.*, 1992; Boot, 1994; Boot *et al.*, 1995; Kuenen e Calderone, 2000; Piccirillo e De Jong, 2003). Neste sentido, Boot *et al.* (1995) referiram que os alvéolos de criação de zangão (que têm margens com um relevo superior ao nível normal dos favos) são mais atractivos para a varroa do que os alvéolos de obreiras, sugerindo que esta saliência física dos alvéolos ajuda os

ácaros no reconhecimento destes como o seu habitat mais favorável. Por outro lado, Trouiller *et al.* (1992) afirmaram que a atracção dos ácaros pelas larvas de idade e sexo mais adequada parece ter também por base mecanismos de natureza química (mediadores químicos). No entanto, este aspecto da invasão celular é ainda controverso. Cobey e Lawrence (1988) postularam que o sistema endócrino da abelha e a reprodução do ácaro podem estar correlacionados. Le Conte *et al.* (1989) atribuíram a maior atracção da varroa por larvas de zângãos, aos ésteres metil e etil dos ácidos gordos de cadeia plana (em particular ao éster metil palmitato), os quais foram encontrados em maiores quantidades na criação de zângão, comparativamente à de obreira. Posteriormente, Le Conte *et al.* (1991) referiram que o éster metil palmitato era uma feromona, a qual (associada às temperaturas dos alvéolos de criação de zângão) indicava as condições favoráveis para a reprodução do ácaro. No entanto, Boot (1994) refutou esta teoria, afirmando que vestígios de metil palmitato foram encontrados apenas em 2 das 17 análises que foram realizadas (utilizando um olfactómetro) para medir a atracção dos ácaros pelas substâncias voláteis emitidas pela criação. Vários mediadores químicos potencialmente interessantes foram isolados da cria das abelhas melíferas (Le Conte *et al.*, 1989; Le Conte *et al.*, 1991; Trouiller *et al.*, 1992; Donzé e Guerin, 1994; Donzé *et al.*, 1998), mas as suas funções têm que ser melhor compreendidas para que estes compostos possam ser usados como parte de uma estratégia integrada de luta contra a varroa (Le Conte *et al.*, 1991; Donzé *et al.*, 1998; Kuenen e Calderone, 2000).

Estudos recentes (Calderone e Lin, 2001; Nazzi *et al.*, 2001; Nazzi *et al.*, 2002; Nazzi *et al.*, 2004) demonstraram que ao nível do alimento larvar da criação existem (“atraentes”) químicos que parecem estar envolvidos na ocorrência da invasão alveolar da criação pela varroa.

A invasão das células de criação é ainda determinada por outros factores tais como (1) o período de operculação da criação do hospedeiro, que varia em função das espécies de abelhas (Moretto *et al.*, 1991; Rosenkranz *et al.*, 1993); (2) o genótipo dos ácaros (De Guzman *et al.*, 1999); (3) a distância entre a larva e as margens alveolares (Boot *et al.*, 1995; Martin e Kryger, 2002) e (4) o estado da cera dos quadros de criação (Piccirillo e De Jong, 2004).

### 2.4.2.3. Ciclo reprodutivo

O ciclo reprodutivo da fêmea do ácaro *V. destructor* em alvéolos de criação de obreiras de *A. mellifera* ocorre durante um período aproximado de 19 dias. A fêmea do ácaro, entra nos alvéolos de criação, para se reproduzir, cerca de 24 horas antes da sua operculação (Ifantidis, 1988; Harris *et al.*, 2003). Este período reprodutivo tem uma duração de 12,5 dias e coincide com o período de operculação da criação de obreira (Harris *et al.*, 2003).

Aproximadamente 60 a 70 horas após a operculação, a fêmea adulta do ácaro inicia a ovoposição (Ifantidis, 1983; Steiner *et al.*, 1995) colocando os ovos nas paredes dos alvéolos, onde são também colocadas as suas fezes (que actuam como local de agregação para os ácaros imaturos e como local de acasalamento; Donze e Guerin, 1994 e Martin, 1994). Normalmente, o primeiro ovo desenvolve-se num macho haplóide, sendo os seguintes quatro a cinco ovos diplóides (originando fêmeas) postos em sucessivos intervalos de cerca de 30 horas após o início da postura (Ifantidis, 1983; Ifantidis *et al.*, 1999; Donzé e Guerin, 1994; Martin, 1994, 1997a, b; Garrido e Rosenkranz, 2003).

Tem sido postulado que um estímulo do hospedeiro (ou seja, da criação recentemente operculada) parece activar a oogenese do ácaro fêmea (Garrido *et al.*, 2000). Recentemente Garrido e Rosenkranz (2003) confirmaram este facto e, afirmaram ainda que, este estímulo proveniente do hospedeiro parece regular não só a reprodução do ácaro como também intervém na sequência dos sexos da sua descendência.

O ciclo biológico do ácaro fêmea e macho compreende várias fases: o estado de ovo, o estado larvar, o estado pupal (protoninfa e deutoninfa) e o estado adulto. O período de metamorfose oscila entre sete a oito dias, para o ácaro fêmea e entre cinco a seis dias para o ácaro macho (Donzé e Guerin, 1994; Martin e Kemp, 1997). O período de metamorfoses do macho é inferior ao da fêmea de forma a favorecer o processo de reprodução, uma vez que este acasala sucessivamente com cada uma das suas irmãs “adultas” que vão surgindo (Ifantidis, 1983; Donze e Guerin, 1994; Martin, 1994; Martin e Kemp, 1997). Este tipo de acasalamento “incestuoso” só será eventualmente interrompido em caso de parasitismo múltiplo (larvas/pupas infestadas por duas ou mais varroas reprodutoras), onde o acasalamento pode ocorrer entre não-irmãos (Donze e

Guerin, 1994; Martin, 1997a, b). Desta forma, a diversidade genética deste parasita é baixa (Kraus *et al.*, 2003).

O ciclo de vida do ácaro macho é completado dentro dos alvéolos de criação, morrendo após várias cópulas (Martin, 1997a, b; Kralj e Otis, 1999; Kraus *et al.*, 2003), aparentemente porque são incapazes de se alimentar (Delfinado e Baker, 1974, 1984). Os ácaros fêmea que não acasalaram apenas produzirão descendentes machos (Sammataro *et al.*, 2000). No momento em que a jovem abelha adulta emerge do alvéolo, o ácaro fêmea e a sua descendência adulta também deixam os alvéolos, transferindo-se para a abelha e iniciando o seu ciclo forético (Martin e Kemp, 1997; Kralj e Otis, 1999) (Figura 2.6).

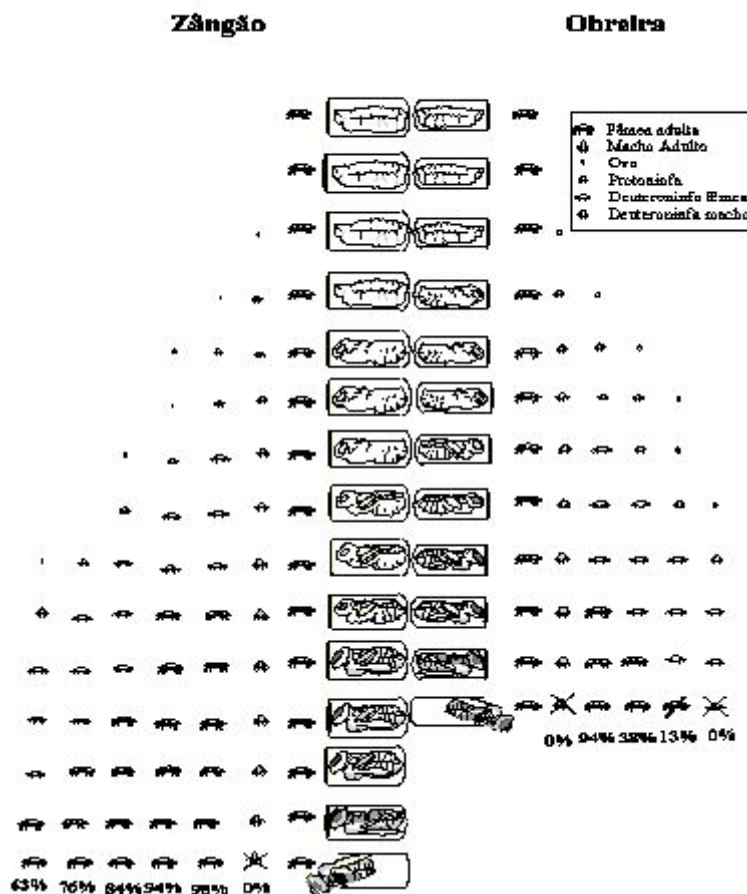


Figura 2.6. Desenvolvimento diário da descendência de *V. destructor* em criação de zângão e de obreira de *A. mellifera* (adaptada de Martin, 1997)

Apenas as fêmeas adultas do ácaro sobrevivem fora dos alvéolos de criação, iniciando a sua fase forética (isto é, período em que as fêmeas adultas do ácaro

permanecem sobre as abelhas adultas), por um período médio de quatro a cinco dias, antes de invadirem, novamente, outros alvéolos com criação para iniciar um outro ciclo reprodutivo (De Jong *et al.*, 1984; Kraus *et al.*, 1986; Sammataro *et al.*, 2000).

Cada ácaro fêmea pode, em média, efectuar 2 a 3 ciclos reprodutivos (Martin e Kemp, 1997), embora o número de ciclos possa variar em função das diferentes raças de abelhas (Kralj e Otis, 1999).

No entanto, elas podem sobreviver sobre as abelhas adultas por longos períodos (vários meses) sem se reproduzir (Rath, 1990). Quando separadas do seu hospedeiro vivo, apenas sobrevivem entre 18 a 70 horas (De Guzman *et al.*, 1993).

Segundo Branco *et al.* (1999) a taxa de crescimento real de uma população de varroas em colónias de abelhas melíferas portuguesas pode ser determinada pela monitorização do seu crescimento exponencial através do tempo.

Na região em estudo, a dinâmica populacional do ácaro caracteriza-se por um crescimento gradual durante a Primavera, para alcançar o seu pico provavelmente no fim do Verão como ocorre em países de climas temperados (Fries *et al.*, 1994; Fries e Perez-Escala, 2001). Geralmente, um grande número de colónias pode sucumbir durante o mês de Agosto ou Setembro, enquanto que outras podem sucumbir durante o Inverno. No Nordeste de Portugal, geralmente com a invernção das colónias, entre Novembro a Fevereiro, constata-se uma diminuição considerável na população de ácaros. Contrariamente à caracterização descrita, para climas mediterrâneos (nomeadamente para o Sul de Portugal), por autores como Branco *et al.* (1999) e Murilhas (2002), os quais referem que nestes climas a dinâmica populacional do ácaro é caracterizada por um crescimento exponencial devido ao facto de existir criação ao longo de todo o ano.

### **2.4.3. Meios de Controlo da Varroose**

Naturalmente, as abelhas melíferas possuem mecanismos de defesa naturais, designadamente: (1) a sua cutícula quitinosa que serve de barreira entre o meio ambiente interno e externo; (2) a microflora intestinal da abelha, que pode proteger cada abelha individualmente contra as doenças infecciosas (Gilliam *et al.*, 1988; Jacobs *et al.*, 1990; Dustmann, 1993; Glinski e Jarosz, 1995); (3) os mecanismos de defesa celular (hemócitos) e as reacções humorais (enzimas e factores antimicrobianos), que podem

contribuir para a resistência às infecções (Jacobs *et al.*, 1990); (4) peças anatómicas, como o proventriculo, que lhes permite filtrar os esporos ingeridos (Dustmann, 1993); (5) as respostas individuais, associadas com a curta duração da vida das abelhas e a sua rápida substituição por outros elementos saudáveis, que podem limitar a propagação das infecções entre as abelhas de uma colónia (Boecking e Spivak, 1999); e (6) os comportamentos etológicos individuais ou colectivos (Arathi *et al.*, 2000).

Entre os mecanismos de defesa das abelhas melíferas deve-se salientar também o comportamento higiénico, como um dos exemplos mais estudados de defesa comportamental das abelhas às doenças. Este comportamento tem sido identificado, avaliado e seleccionado como um dos principais mecanismos de defesa natural das abelhas relativamente às doenças da criação (nomeadamente aos agentes bacterianos e fúngicos), uma vez que contribui para a redução da massa infectante da colónia. A partir da década de 1960, a utilização de “abelhas higiénicas” evidenciou excelentes resultados no controlo das loques (americana e europeia) e da ascosferiose (Rothenbuher, 1964a, b; Thompson, 1964; Trump *et al.*, 1967; Rothenbuher *et al.*, 1968; Message, 1979; Message e Gonçalves, 1980; Taber, 1982; Gilliam *et al.*, 1983; Spivak e Gilliam, 1993; Sammataro, 1996; Palacio *et al.*, 2000; Invernizzi, 2001). Posteriormente, foi também considerado um mecanismo de defesa relativamente à varroose (Peng *et al.*, 1987b; Boecking e Drescher, 1992; Spivak, 1996; Spivak e Gilliam, 1998b; Boecking e Spivak, 1999; Flores *et al.*, 2001). A utilização de abelhas seleccionadas para manifestar um eficiente comportamento higiénico parece ser um relevante contributo para o controlo destas patologias. A sua crescente importância advém da aparente ineficácia e das múltiplas consequências nefastas atribuídas à principal forma de controlo: a utilização de químicos a nível (inter) nacional.

Este aspecto, e agora especificando para o caso concreto da varroose, é evidenciado pela constatação de que vários têm sido os produtos químicos utilizados na tentativa de controlar esta ectoparasitose. A sua utilização massiva foi originada pela necessidade urgente de desenvolver, e pôr em prática, medidas de controlo efectivas, após a invasão da Europa Ocidental por esta desastrosa parasitose.



### 2.4.3.1 Controlo Químico

Após a detecção dos primeiros casos de varroose em abelhas europeias (no ano de 1964, em Ossuria junto à Chechénia), os apicultores e os técnicos do sector utilizaram todo o tipo de produtos acaricidas disponíveis para o controlo desta patologia. A “primeira geração” de tratamentos para o controlo da varroose foi desenvolvida, na década de 1970, em países da Europa Central, principalmente na Alemanha (Pajuelo, 2000). As formas de aplicação mais comuns baseavam-se, então, no uso de aerossóis, sprays, e pós (por fumigação, pulverização e/ou polvilhação), os quais actuavam poucos dias (3 a 4) após a aplicação (Ben Hamida, 1997; Pajuelo, 2000).

Entretanto, foram desenvolvidos novos métodos químicos que conduziram à alteração das formas de aplicação. O primeiro acaricida sintético foi o Clordimeforme, que depois foi abandonado devido a problemas de resíduos (Ruttner *et al.*, 1980). Possivelmente, o primeiro tratamento utilizado na maior parte dos países europeus, foi o Folvex VA<sup>®</sup> (cujo princípio activo é o bromopropilato), desenvolvido em 1975 na Europa, baseado noutro acaricida já existente (“Folvex”), para o tratamento da noseose (Ben Hamida, 1997; Pajuelo, 2000). O Folvex VA<sup>®</sup>, ainda que bem tolerado pelas abelhas adultas e pela criação (Klepsh *et al.*, 1983), apresentava várias desvantagens. Entre estas, dificuldades de aplicação e uma eficácia reduzida ao momento da sua aplicação (Pajuelo, 2000). Por sua vez, quando fumigado, originava resíduos nos produtos apícolas, nomeadamente na cera e no mel (Wallner, 1999).

Na década de 1980 foi desenvolvido e comercializado o Perizin<sup>®</sup> (cujo princípio activo é o coumafós) (Ritter, 1988), um precursor da “segunda geração” de tratamentos utilizados no controlo da varroose. A forma de aplicação era fácil e rápida (solução de água com açúcar, que por aspersão/gotejamento se aplicava sobre as abelhas) e que, supostamente tinha um efeito sistémico. O seu elevado preço, a inicial falta de disponibilidade do produto no mercado e uma elevada mortalidade inicial de abelhas devido à toxicidade do produto, foram alguns dos problemas relacionados com a sua utilização (Ben Hamida, 1997; Pajuelo, 2000). No Norte de Itália (Lombardia), chegou a ser comprovada a detecção de populações de ácaros resistentes ao Perizin<sup>®</sup> (Spreafico *et al.*, 2001).

Outro dos produtos comerciais que também surgia na mesma altura foi o Apitol<sup>®</sup> (um derivado do tiazol). De aplicação e efeitos semelhantes ao coumafós, não teve também êxito comercial devido às mesmas razões anteriormente descritas para o Perizin<sup>®</sup> (Ritter, 1988). Na década de 1980, foi também utilizado o amitraz (aplicado sob diferentes formas de vaporização) comercializado sob a designação de “Tactic”. Posteriormente, e com o mesmo princípio activo (amitraz), foi registrado o “Anti-varroa Schering”, que também era aplicado sob a forma de vaporização (Pajuelo, 2000).

A “segunda geração” de tratamentos surgiu pela necessidade de encontrar produtos de maior eficácia e períodos de actividade mais prolongados (designados como métodos de libertação lenta). Surgem novas formas de aplicação, nomeadamente impregnando princípios activos em tiras de plástico ou madeira, a partir das quais estes eram libertados lentamente (Ben Hamida, 1997). Entre estes produtos, surge o Apistan<sup>®</sup> [designação comercial para o princípio activo fluvalinato, contido em tiras de policloreto de vinilo (PVC)] (Borneck e Merle, 1988). Rapidamente o Apistan se tornou num dos produtos mais amplamente utilizados em todo o mundo. Contudo, produtos comerciais com fluvalinato desenvolvidos para a produção vegetal (Klartan<sup>®</sup> e Mavrik<sup>®</sup>), foram também adoptados por muitos apicultores. Estes produtos não estavam homologados para uso apícola mas foram amplamente administrados, usando tiras de madeira impregnadas com quantidades de fluvalinato pouco controladas, o que, possivelmente, originou vários relatos da sua ineficácia (Ben Hamida, 1997).

De forma similar, tiras construídas em polietileno e contendo flumetrina (designação comercial de Bayvarol<sup>®</sup>) começaram a ser comercializadas em alguns países Europeus.

Nos últimos anos, surgiram “novas formulações” comerciais. O Apivar<sup>®</sup> (amitraz impregnado em tiras de plástico), comercializado em vários países Europeus (Richez e Le Conte, 1995; Floris *et al.*, 2001) e o CheckMite<sup>®</sup> (coumafós), correntemente utilizado nos Estados Unidos (Spivak e Reuter, 2001), são exemplos dessas “novas formulações”.

Actualmente, alguns dos acaricidas mais comumente utilizados a nível mundial são o Apistan<sup>®</sup>, o Bayvarol<sup>®</sup>, o Apivar<sup>®</sup>, o Perizin<sup>®</sup>, o Apitol<sup>®</sup> e o CheckMite<sup>®</sup> (Santiago *et al.*, 2000; Floris *et al.*, 2001; Spivak e Reuter, 2001; Martin, 2004; Mutinelli e Baggio, 2004).

Em Portugal apenas existem dois acaricidas sintéticos homologados para o controlo da varroose (o Apivar<sup>®</sup> e o Apistan<sup>®</sup>), ainda que outros produtos, não autorizados para uso apícola, possam eventualmente estar a ser utilizados por vários apicultores nacionais.

#### **2.4.3.2 Via alternativa de controlo da Varroose**

Neste contexto, e considerando todas as consequências nefastas que (in) directamente lhe possam ser atribuídas (por exemplo, presença de resíduos no mel, acumulação de resíduos na cera/própolis e o aparecimento de populações de ácaros resistentes) (Milani, 1999; Wallner, 1999; Martin, 2004; Bogdanov, 2006), nos últimos anos tem sido intensificada a investigação, aplicada à utilização de produtos orgânicos, como uma via de controlo alternativo à varroose.

Segundo Colin (1997) existem três categorias de produtos naturais que podem ser utilizados como uma via alternativa de controlo da Varroose.

Na primeira categoria estão incluídas as moléculas produzidas pelo metabolismo animal (Colin, 1997), ou seja, os ácidos orgânicos, tais como o ácido fórmico e o ácido láctico (Sabatini *et al.*, 1994; Imdorf *et al.*, 1996). Embora não seja de origem animal, a utilização do ácido oxálico como acaricida tem sido uma prática corrente nos últimos anos (Gregorc e Planinc, 2001, 2002; Gregorc e Poklukar, 2003), particularmente na região central de Itália, pela sua alta eficácia e baixos riscos de resíduos no mel (Mutinelli *et al.*, 1997; Marinelli *et al.*, 2004).

Na segunda categoria de produtos naturais, utilizados para o controlo da Varroose, estão incluídos os extractos de plantas aromáticas ou oleaginosas (Colin, 1997; Sammataro *et al.*, 1998). As principais moléculas activas obtidas a partir de óleos essenciais são: o timol, o mentol, a camfora e o eucaliptol (Colin, 1990). O timol foi uma das primeiras moléculas utilizadas eficazmente no controlo da varroose (Lodesani *et al.*, 1990 e Chiesa, 1991). Surgiram também formulações comerciais como o Apilife/Var<sup>®</sup>, baseado em misturas contendo várias proporções de timol, mentol, cânfora e eucaliptol (Imdorf *et al.*, 1996) e o Apiguard (produto comercial à base de timol) (Trouiller e Watkins, 2001; Mattila e Otis, 1999; Mattila *et al.*, 2000).

Na terceira categoria estão incluídos os métodos ou produtos permitidos em agricultura biológica (Colin, 1997), como os sais de cobre, sendo considerado o gluconato cúprico como o menos perigoso para as abelhas (Guiraud *et al.*, 1989).

Vários estudos sobre estes produtos naturais, principalmente o timol e o ácido fórmico, mostraram alguns resultados promissores (Gregorc e Planinc, 2001, 2002; Gregorc e Poklukar, 2003; Marinelli *et al.*, 2004; Mattila e Otis, 1999; Mattila *et al.*, 2000; Eguaras *et al.*, 2001). Porém, a utilização de produtos naturais, como uma via de controlo alternativo à varroose, apresenta, também algumas limitações e consequências nefastas. Entre estas, a elevada variabilidade na eficácia da maioria das substâncias orgânicas e a dificuldade (algumas vezes perigosidade) de aplicação dos distintos métodos pelos apicultores. Por outro lado, a morosidade de aplicação de alguns destes produtos, a necessidade de uma maior frequência de visitas ao apiário e o efeito da temperatura no momento de aplicação (e, possivelmente, também a dificuldade de eleição do melhor produto ou sistema de aplicação face devido às diferentes formulações e alternativas comerciais existentes), são algumas das principais limitações associadas à sua utilização (Eguaras *et al.*, 2001; Rice *et al.*, 2004)

Pode-se assim afirmar que, na maioria dos países europeus, nomeadamente em Portugal, a varroose continua a ser a patologia que maiores danos provoca à apicultura, havendo uma especial atenção na definição das principais estratégias de controlo que devem ser seguidas.

Neste contexto, pode-se afirmar que o ácaro *V. destructor* tem provocado enormes perdas, obrigando à utilização de tratamentos químicos de síntese para evitar a morte das colónias e a perda dos apiários. Estes tratamentos têm ajudado a conter a situação, embora tenham originado novos problemas, especialmente o aparecimento de resíduos nos produtos apícolas e a resistência da varroa às principais substâncias activas utilizadas (Milani, 1999; Wallner, 1999; Spreafico *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2002; Martin, 2004; Mutinelli e Baggio, 2004; Bogdanov, 2006). Estes problemas levaram ao desenvolvimento de vários programas de investigação usando distintas vias alternativas para o controlo desta patologia. Estas concentram-se essencialmente, em três áreas: (1) controlo químico e/ou biológico; (2) técnicas de manejo (biotécnicas) que podem ajudar a limitar o crescimento da população de varroas nas colónias e, 3) actuação a nível da genética, incluindo trabalhos sobre os mecanismos de defesa contra a varroa

apresentados pelas abelhas melíferas. Estes mecanismos de defesa podem ser agrupados em: a) comportamento higiénico das colónias; b) mecanismo de auto-limpeza ou limpeza de grupo; c) reprodução diferencial do parasita; d) atractividade da criação para o ácaro fêmea e e) duração do período de operculação. Várias variáveis com impacto sobre cada um destes mecanismos de defesa podem ser englobadas em programas de investigação para selecção de colónias de abelhas mais tolerantes à varroa (Vandame, 1996; Vandame *et al.*, 1998; 2000; Guzmán-Novoa *et al.*, 1999; Boecking e Spivak, 1999).

Face a todas estas limitações anteriormente referidas (quer ao nível do controlo químico, quer ao nível controlo alternativo), nos últimos anos, têm surgido alguns trabalhos (Ellis, 2001; Sammataro *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2004) no sentido de desenvolver uma estratégia integrada para o controlo desta patologia, baseada na combinação dessas várias formas de controlo (químico e/ou biológico, biotécnicas e actuação a nível da genética). Esta parece ser actualmente uma opção viável e desejável.

## **2.5 Mecanismos de tolerância da espécie *A. mellifera* ao ácaro *V. destructor***

A relação de equilíbrio entre o ácaro *V. jacobsoni* e a *A. cerana* tem sido usada como um modelo para estudo da tolerância das abelhas *A. mellifera*, relativamente ao ácaro *V. destructor*. A abelha asiática (*A. cerana*) manifesta comportamentos defensivos que ajudaram a manter o número de ácaros controlados dentro de limites toleráveis pelas colónias. Estes mecanismos, incluem factores relacionados com o ciclo reprodutivo dos ácaros fêmeas e diferentes comportamentos defensivos das abelhas desta espécie frente aos ácaros, comparativamente à *A. mellifera* (Rath, 1999).

Os factores que têm sido indicados como limitantes da reprodução dos ácaros englobam a preferência das fêmeas reprodutoras do ácaro pelos alvéolos de criação dos zangãos. Esta preferência pode estar relacionada com menores períodos de operculação nesta espécie, quer na criação de obreira, quer na de zangão. Consequentemente, a maioria das varroas apresentam taxas reprodutivas muito baixas nos alvéolos de criação de obreiras (comparativamente à *A. mellifera*), sendo a sua reprodução efectiva

praticamente limitada ao ciclo sazonal da produção de zângãos no interior da colónia (o que representa uma muito baixa percentagem dos potenciais hospedeiros) (Boecking e Drescher, 1994; Fries *et al.*, 1994).

Além disso, as obreiras de *A. cerana* manifestam diferentes comportamentos defensivos, nomeadamente um elevado comportamento de auto-limpeza ou limpeza de grupo e um elevado comportamento higiénico (o que lhes permitem removerem os ácaros rapidamente; Peng *et al.*, 1987a; b; Rath e Drescher, 1990; Büchler *et al.*, 1992; Rosenkranz *et al.*, 1993; Büchler, 1994, 1997). Estes factores permitem compreender as razões pelas quais esta parasitose causa pequenos danos ao seu hospedeiro original (*A. cerana*).

No entanto, como já anteriormente foi referido, as colónias de *A. mellifera* morrem geralmente no intervalo de um a três anos após o início de uma infestação (Chastel *et al.*, 1991; Murilhas, 1998; Thompson *et al.*, 2002). Neste caso, o nível a que todos estes factores são expressos permitem o rápido crescimento populacional da *V. destructor* em colónias de *A. mellifera* (Denholm, 1999). Por exemplo, nos zângãos a fase de operculação é maior (comparativamente ao observado em colónias de *A. cerana*), permitindo o completo desenvolvimento aumentando, em muito, o número de fêmeas férteis produzidas pr ciclo reprodutivo (Martin, 1995b; Danka *et al.*, 1997; Kralj e Otis, 1999). Por outro lado, a temperatura nos alvéolos de criação das colónias de *A. mellifera* parece ser mais propícia ao ciclo reprodutivo da varroa (Le Conte e Arnold, 1988; Le Conte *et al.*, 1990).

Acresce que, apesar das colónias de *A. mellifera* de origem europeia manifestarem também o comportamento higiénico, a expressão com que o fazem é muito limitada quando comparado com a da *A. cerana* (Peng *et al.*, 1987a; Boecking e Drescher, 1990, 1992; Boecking *et al.*, 1993; Boecking e Ritter, 1993; Boecking e Drescher, 1994; Büchler, 1994, 1997; Spivak, 1996; Boecking e Spivak, 1999). Estudos recentes Ibrahim e Spivak (2006) demonstram que o comportamento higiénico perante alvéolos de criação de obreira infestada pela varroa pode ser um importante factor de tolerância à varroose em colónias de abelhas melíferas ocidentais. O mesmo sucede relativamente ao comportamento de auto-limpeza ou limpeza de grupo (Peng *et al.*, 1987a; Moretto *et al.*, 1991; Büchler *et al.*, 1992; Boecking e Ritter, 1993; Moretto *et al.*, 1993 Rosenkranz *et al.*, 1997; Aumeier, 2001).

Resumidamente pode-se assim afirmar que a dinâmica populacional deste ácaro é determinantemente influenciada pelas inter-relações hospedeiro-parasita. As diferenças de susceptibilidade da *A. mellifera* relativamente à varroose reflectem-se nos elevados níveis de infestação frequentemente observados nesta espécie. A dinâmica populacional da varroa envolve vários processos: a imigração das varroas que parasitam as abelhas forrageiras, a invasão dos alvéolos de criação, a reprodução, a emigração de varroas para outras colónias e, finalmente, a sua taxa de mortalidade. Cada um destes processos pode ser influenciado por factores, tais como os mecanismos de defesa das abelhas contra o parasita, a reprodução diferencial do ácaro e a adaptabilidade do ácaro ao seu hospedeiro (Boecking e Ritter, 1994; Boecking e Spivak, 1999).

A duração do período de operculação da criação das abelhas (que poderá ser limitante para a taxa de reprodução do ácaro), a atractividade pela criação de obreiras de diferentes origens genéticas ou a presença de ácaros fêmeas inférteis nos alvéolos de criação têm sido discutidos como factores que podem limitar o crescimento populacional do ácaro (Moritz, 1985; Büchler *et al.*, 1992; Danka *et al.*, 1997; Harbo e Harris, 1999; Boecking e Spivak, 1999). Adicionalmente, o número de ciclos reprodutivos, o número de fêmeas descendentes (por cada fêmea fundadora) e a duração do período forético, influenciam também o crescimento populacional dos ácaros (Fries *et al.*, 1994).

Nesta perspectiva, um maior comportamento higiénico poderá ser um importante contributo para o controlo da varroose, na medida em que a remoção da criação parasitada pode, teoricamente, limitar o crescimento das populações de ácaros nas colónias. Aspectos relevantes por essa limitação podem incluir (1) ácaros imaturos (que podem ser danificados ou mortos como consequência do comportamento de remoção de formas juvenis pelas obreiras) que não finalizam o seu desenvolvimento (diminuindo, assim, o número médio de descendentes por fêmea reprodutora); (2) varroas reprodutoras que podem ser danificadas, removidas ou mortas durante o processo de remoção de formas juvenis (com a consequente diminuição do número de fêmeas reprodutoras); ou (3) a redução do número de ciclos reprodutivos por varroa durante o seu ciclo de vida (Rath e Drescher, 1990; Fries *et al.*, 1994).

Assim, o comportamento higiénico tem sido uma das características mais amplamente utilizadas, como critério de selecção, em vários programas de

melhoramento genético que visam aumentar a tolerância da *A. mellifera* às patologias apícolas. Existem vários exemplos da utilização de linhas de abelhas higiénicas e dos seus benefícios. Na década de 1980, foram selecionadas rainhas higiénicas nos Estados Unidos (Califórnia) com fins comerciais (Taber, 1982; Taber e Gilliam, 1987). Na Dinamarca, após 4 anos de selecção e melhoramento genético, rainhas obtidas a partir de linhas higiénicas de abelhas foram comercialmente avaliadas pelos apicultores dinamarqueses. As colónias nas quais estas rainhas foram introduzidas apresentaram uma elevada redução na incidência de ascosferiose, relativamente às colónias originais dos seus apiários (9,1% versus 71,4% respectivamente) (Holm, 1985 e Spivak e Gilliam, 1998a). Neste âmbito, foram também iniciados programas de melhoramento genético, em outros países, como por exemplo no Chile (Kefuss, 1993, 1995; Kefuss *et al.*, 1996), na Austrália (Oldroyd, 1996), na Argentina (Palacio *et al.*, 2000) ou na Alemanha (Büchler, 2000). Paralelamente, programas de melhoramento genético recorrendo à metodologia de morte da criação pelo frio, para identificar e seleccionar o comportamento higiénico como um factor de tolerância às doenças da criação (loque americana e ascosferiose) e à varroose foram iniciados, a partir de 1993, nos Estados Unidos por vários investigadores Spivak e Gilliam (1993) e Spivak e Reuter (1998c). Uma linha de colónias higiénicas resultantes deste projecto, designada como “linha higiénica de Minesota”, foi avaliada em apiários comerciais. Os resultados (relativos ao período compreendido entre 1996 e 1998) demonstraram que as colónias com rainhas selecionadas destas linhas apresentavam uma redução no nível de incidência destas patologias e no nível de infestação com *V. destructor* (ainda que menos evidente), quando comparadas com colónias não selecionadas. Além disso, estas colónias produziram quantidades iguais ou superiores de mel, pelo que, aparentemente, esta característica pode ser seleccionada sem comprometer a produção de mel (Spivak *et al.*, 1995; Spivak e Reuter, 1998b, c; 2001, 2005).

Paralelamente, outras linhas de investigação desenvolvidas nos Estados Unidos, avaliaram e selecionaram linhas de abelhas higiénicas a partir de abelhas importadas da Rússia (região de Primorsky), as quais mostraram um elevado grau de higiene comparativamente a colónias locais (Rinderer *et al.*, 1993, 1999, 2001a, b; Danka *et al.*, 1995; De Guzman *et al.*, 2001a, b, 2002b).



No sentido de investigar os mecanismos relativos à supressão da reprodução da *V. destructor* e determinar como as abelhas podem reduzir o sucesso reprodutivo deste ácaro, foi desenvolvido outro programa de selecção e melhoramento genético. A supressão da reprodução do ácaro é um dos factores de tolerância e tem sido referido como um carácter associado a colónias de abelhas que sobreviveram à varroose, e que é hereditário ( $h^2=0,46$ ) (Harbo e Hoopingarner, 1997; Harbo e Harris, 1999a). Este programa desenvolvido em Baton Rouge (Estados Unidos da América) entre 1999 e 2000, visava avaliar se as rainhas seleccionadas conferiam às suas colónias um nível aceitável de tolerância. Ao serem criadas em condições normais de produção (por quatro produtores de rainhas em diferentes localidades; Texas, Louisiana, Michigan e Ohio) e acasaladas naturalmente com zângãos não seleccionados das diferentes regiões, poderiam ser produzidas para fins comerciais. Foram assim seleccionadas linhas higiénicas (“Suppression of Mite Reproduction - SMR”), as quais apresentavam uma redução no nível de infestação com varroa, quando acasaladas naturalmente com os zângãos das diferentes localidades (Harbo, 1996; Harbo e Harris, 1999a, b; 2001).

Segundo Spivak e Reuter (2005) a partir de 2001 foi utilizado um outro critério de selecção (a supressão da reprodução do ácaro; “SMR”) associado à “linha higiénica de Minesota”. Após a avaliação da “linha higiénica SMR” em apiários comerciais, estes autores verificaram que existia uma redução elevada do nível de infestação com varroa nestas colónias quando comparadas com a “linha higiénica de Minesota” inicial ou com colónias não seleccionadas. Sugeriram assim que a combinação das duas características (comportamento higiénico e SMR) poderá simultaneamente aumentar o grau de expressão do comportamento higiénico e auxiliar na supressão da reprodução de um número relevante de varroas, facto este, recentemente confirmado por Ibrahim e Spivak (2006).

### **2.5.1 Comportamento higiénico em abelhas melíferas**

O estudo dos mecanismos genéticos inerentes ao comportamento higiénico em colónias de abelhas *A. mellifera* figura entre os estudos clássicos sobre o comportamento animal (Rothenbuher, 1964). Uma das razões mais plausíveis da sua importância reside no facto do comportamento higiénico das abelhas melíferas ser o

único entre os insectos sociais. Este comportamento único pode ser uma adaptação ditada pela reutilização dos alvéolos porque, ao contrário de outros insectos sociais como o abelhão (*Bombus spp.*) e as abelhas sem ferrão (*Meliponini spp.*), as abelhas melíferas reutilizam os alvéolos após a emergência da criação, em vez de construírem novos alvéolos. Alguns outros insectos como, por exemplo, as abelhas solitárias *Nomia melanderi* e *Lasioglossum versatum*, são conhecidos por, normalmente, deixarem a criação doente (sepultada) sob os alvéolos operculados, não sendo estes reutilizados (Spivak e Gilliam, 1993).

As primeiras observações detalhadas sobre o comportamento higiénico em abelhas melíferas e sobre a possibilidade de seleccionar abelhas resistentes à loque americana (*P. l. larvae*) foram efectuadas por Park e seus colaboradores nos anos 30, ao verificarem que as larvas e pupas mortas por esta doença, frequentemente, eram extraídas dos alvéolos (Newton e Ostasiewski, 1986; Taber, 1995; Kefuss *et al.*, 1996; Spivak e Gilliam, 1998). Na década de 1950, Ruthenbuhler iniciou uma longa e produtiva pesquisa sobre os mecanismos de resistência à loque americana e sobre o comportamento higiénico. Estes estudos culminaram com a publicação, a partir de 1964, das famosas seis séries de artigos sobre os mecanismos genéticos do comportamento higiénico em abelhas melíferas (Spivak e Gilliam, 1998). Este trabalho foi reconhecido como um clássico do efeito da hereditariedade Mendeliana dos genes sobre o comportamento (Alcock, 1993 e Gould, 1982, citados por Spivak e Gilliam, 1998), demonstrando ambos os efeitos, genético e ambiental, desta característica tão importante economicamente (Spivak e Gilliam, 1998).

O comportamento higiénico é constituído basicamente por duas componentes, a desoperulação dos alvéolos contendo cria morta (ou doente) operculada e a remoção dos conteúdos desses mesmos alvéolos. Rothenbuhler (1964) propôs um modelo de dois-*loci* para a hereditariedade do comportamento higiénico, com cada *locus* a controlar a expressão de cada uma das componentes deste comportamento. Segundo este modelo, o comportamento higiénico é controlado por dois pares de genes independentes e recessivos, um para a desoperulação e o outro para a remoção da criação doente (ou morta) existente nesses alvéolos (Woyke, 1976; Message e Gonçalves, 1980; Gilliam *et al.*, 1983; Holm, 1985; Newton e Ostasiewski, 1986; Rinderer e Collins, 1986; Moritz, 1988; Gilliam, 1990; Moritz e Southwick, 1992; Kefuss *et al.*, 1996; Spivak, 1996).

Assim, de acordo com este modelo de dois-*loci*, deverá existir uma classe de abelhas higiénicas homozigóticas para um dos *locus*, que manifestará o comportamento de desoperculação dos alvéolos com cria morta (ou doente) e outra classe de abelhas higiénicas para o outro *locus* que deverá manifestar o comportamento de remoção do conteúdo dos alvéolos desoperculados. Abelhas que sejam homozigóticas para ambos os *loci* deverão, conseqüentemente, estar predispostas geneticamente para executarem ambos as componentes deste comportamento (desoperculação e remoção).

Ruthenbuhler determinou as bases genéticas de tão complexo comportamento ao verificar que colónias de abelhas higiénicas eliminavam rapidamente as larvas doentes, enquanto que outras colónias não o faziam considerando que o comportamento higiénico era o principal mecanismo de defesa contra a loque americana (Message, 1979; Gilliam *et al.*, 1983; Holm, 1985; Milne, 1985; Newton e Ostasiewski, 1986; Rinderer e Collins, 1986; Moritz e Southwick, 1992; Page e Laidlaw, 1992; Spivak e Gilliam, 1993; Kefuss *et al.*, 1996; Spivak e Gilliam, 1998a, b) e a ascosferiose [(Gilliam *et al.*, 1983; Milne, 1983; Gilliam *et al.*, 1988; Murray, 1993) (Palacio *et al.*, 2000)]. É considerado também um dos potenciais mecanismos de defesa relativamente à varroose (Sammataro, 1996; Spivak e Gilliam, 1998; Boecking e Spivak, 1999).

Este princípio hereditário foi posteriormente reavaliado e considerado como "simplista". De facto, Moritz (1988) propôs um modelo multi-*loci* (três-*loci*) sugerindo que o comportamento higiénico seria o resultado de um mecanismo genético muito mais complexo do que uma "simples segregação Mendeliana". Um modelo idêntico, baseado no pressuposto de que o comportamento higiénico seria controlado por 3 pares de genes recessivos (sendo dois responsáveis pela detecção e desoperculação, respectivamente e, um terceiro par, responsável pela remoção da criação) foi posteriormente proposto por Gramacho (1999).

Recentemente, surgiram neste domínio alguns estudos que recorreram ao uso de técnicas moleculares. Um novo mapa genético foi construído e utilizado para identificar quantos *loci* podem influenciar este comportamento. Foram detectados 7 *loci* associados ao comportamento higiénico. Individualmente, cada um dos *loci* apenas contribui, numa percentagem relativamente baixa, para a expressão deste comportamento. As bases genéticas do comportamento higiénico são assim muito mais complexas do que

inicialmente se julgou e devem ser mais investigadas através da genética quantitativa (Lapidge *et al.*, 2002; Wilkes e Oldroyd, 2002).

Deste modo, apesar da indiscutível relevância dos estudos de Ruthenbuhler e dos seus seguidores, actualmente ainda não estão totalmente clarificados os mecanismos genéticos que regem o comportamento higiénico, assim como, quais os estímulos que estarão envolvidos neste processo.

O comportamento higiénico parece ser uma resposta generalizada das abelhas melíferas aos agentes patogénicos e parasitas que sobre elas incidem. Todavia, a sua expressão parece ser influenciada por múltiplos factores, principalmente os factores ambientais. Por exemplo, a idade das obreiras (Thompson, 1964), a população da colónia, o fluxo de néctar (Momot e Rothenbuhler, 1971), a temperatura, a humidade e condições (ceras novas ou velhas) dos quadros de criação (Message, 1979; Message e Gonçalves, 1980).

Existem também outros factores que podem influenciar na dimensão da expressão do comportamento higiénico, os quais estão relacionados com o processo de reconhecimento dos alvéolos com criação doente, morta ou parasitada. Na realidade, ainda não se conhece o processo utilizado pelas obreiras para determinar qual a criação parasitada dentro dos alvéolos operculados. Os estímulos que, possivelmente, regulam este reconhecimento são essencialmente sinais olfactivos, emanados pela criação doente, pelo ácaro (Boecking e Spivak, 1999) ou por ambos (ácaro e criação doente).

Assim, a identificação desta criação pode ser efectuada principalmente por três tipos de factores (ou pelas suas interações). Sinais químicos (compostos químicos voláteis) emanados da criação doente, parasitada ou morta, que podem ser percebidos pelas abelhas como “odor anormal” (Titera e Kokkoris, 1994; Spivak e Downey, 1998; Gramacho *et al.*, 1999; Nazzi *et al.*, 2002, 2004). Os compostos polares da cutícula dos ácaros também podem eventualmente ser sentidos pelas obreiras (Aumeier e Rosenkranz, 2001; Martin *et al.*, 2001, 2002). Estímulos ou sinais mecânicos (movimentos anormais e/ou vibrações no interior do alvéolo com criação parasitada), podem também ser detectados pelas abelhas. Admite-se também a possibilidade de sinais acústicos estarem envolvidos neste processo (Boecking e Drescher, 1994). Finalmente alguns autores admitem também o envolvimento de sinais térmicos. A explicação plausível para este tipo de estímulos, baseia-se na possibilidade

das abelhas detectarem a diferenças entre o calor produzido por uma pupa saudável e uma doente ou parasitada (Gramacho *et al.*, 1997).

### 2.5.2. Metodologias para detecção do comportamento higiénico

A literatura sobre as metodologias utilizadas para avaliar o nível de comportamento higiénico mostrado pelas colónias é extensa. Alguns dos estudos mais importantes sobre as metodologias desenvolvidas para avaliar o comportamento higiénico em abelhas melíferas são referidos seguidamente (Quadro 2).

**Quadro 2.2.** Principais metodologias utilizadas na avaliação do comportamento higiénico

Autor	Metodologia
(Park, 1936)	Inserção de uma secção de favo contendo criação morta (ou restos de criação morta) com <i>P. l. larvae</i> ; Inoculação com esporos de <i>P. l. larvae</i> de uma secção de favo de criação (favo teste).
(Rothenbuher, 1964b) (Thompson, 1964)	Morte da criação com gás cianídrico.
(Gonçalves e Kerr, 1970)	Morte da criação (secção de favo 5x10 cm) por congelação.
(Newton e Ostasiewski, 1986)	Morte da criação por punção.
(Taber e Gilliam, 1987)	Inoculação de múmias de <i>A. apis</i> (após a sua maceração).
(Titera e Kokkoris, 1994)	Morte da criação por injeção de água, etanol, solução salina, restos de zangão e de ácaros <i>V. destructor</i> em solução salina.
(Spivak e Reuter, 1998a)	Morte da criação com azoto liquido.

As colónias podem ser “facilmente identificadas” para este comportamento higiénico, mediante a realização de ensaios de campo (Spivak e Downey, 1998; Taber, 1998), recorrendo à inoculação directa do agente patogénico (Gilliam *et al.*, 1988) ou de

ácaros (Boecking e Drescher, 1990; Spivak, 1996; Boecking e Spivak, 1999; Flores *et al.*, 2001).

#### **2.5.2.1. Teste de morte da criação com gás cianídrico**

No ano de 1964, Jones e Rothenbuhler foram os primeiros investigadores a utilizar gás cianídrico para matar a criação, em vez da utilização de secções de favo com restos de criação morta pela loque americana Rothenbuhler (1964b) e Momot e Rothenbuhler (1971). Esta metodologia surgiu devido a problemas inerentes à disseminação desta patologia através da inoculação de colónias com esporos do agente patogénico. No entanto, o uso de gás cianídrico é ilegal na maioria dos países, pelo que, métodos menos perigosos para matar a criação foram posteriormente desenvolvidos (Spivak e Gilliam, 1998a).

#### **2.5.2.2. Teste de morte da criação por congelação**

O primeiro estudo que utilizou o frio como agente para morte da criação foi realizado no Brasil, por Gonçalves e Kerr (1970), baseado na congelação de uma secção de favo com criação (5x10 cm) durante 48 horas (posteriormente descongelado à temperatura ambiente, ou a 34°C, durante 6 horas). O tempo total considerado para avaliação do nível de remoção da cria morta foi de 48 horas. Posteriormente, o princípio básico desta metodologia foi utilizado por diferentes investigadores, com algumas alterações. Concretamente, na área da secção do favo amostrado, no período de congelação, no período de tempo total considerado para a avaliação da remoção da criação morta e, inclusivamente, usando diferentes processos de morte da criação. Newton *et al.* (1975) foram os primeiros a utilizar o teste de morte da criação por congelação para rastrear colónias nos Estados Unidos, no sentido de avaliar o seu comportamento higiénico. Nos seus estudos congelaram um quadro inteiro com criação operculada (durante 24 a 72 horas, a -17°C) e, posteriormente, colocaram-no na colónia a testar, anotando o tempo necessário para que as obreiras procedessem à remoção da

criação morta. Taber (1982) modificou esta metodologia usando um “favo teste” com 5x6 cm, contendo aproximadamente 100 larvas e pupas por cada lado. Este “favo teste” foi cortado de um quadro de criação do interior do ninho, congelado a -20°C (durante 24 horas) e depois introduzido de novo na colmeia a testar. Foram classificadas como higiénicas, as colónias que removeram a criação morta por congelação no intervalo de 48 horas (aquelas que demoraram mais de 6 a 7 dias foram classificadas como não higiénicas; Spivak e Downey, 1998).

Este é, possivelmente, o método mais efectivo para avaliar o comportamento higiénico e um dos mais amplamente utilizados a nível mundial (Woyke *et al.*, 2004; Spivak e Reuter, 2005).

### **2.5.2.3. Teste de morte da criação por punção**

Posteriormente, foi desenvolvida uma nova metodologia por Newton e Ostasiewski (1986) utilizando, na avaliação do comportamento higiénico, a morte da criação por punção efectuada com um alfinete entomológico. Este ensaio envolvia o sacrifício de 21 crias (prepupas e pupas em alvéolos operculados) através da introdução de um alfinete entomológico pelo opérculo, em três lotes de sete crias operculadas, situadas aleatoriamente num quadro com criação operculada. Estes lotes foram identificados mediante a utilização de pionéses de diferentes cores. Este método não pressupõe um trabalho tão intensivo como o método de morte por congelação e, além disso, não provoca tanto prejuízo no quadro a testar, razão pela qual tem sido considerado um dos testes mais efectivos para avaliar a expressão do comportamento higiénico em colónias de abelhas melíferas (Boecking e Drescher, 1998; Spivak e Reuter, 1998b; Gramacho e Gonçalves, 1999; Palacio *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2001; Woyke *et al.*, 2004). No entanto, os orifícios (criados para punção) que permanecem na cera do opérculo dos alvéolos operculados e a exposição da hemolinfa da larva ou pupa perfurada podem aumentar a percentagem de remoção da criação pelas obreiras (Spivak e Downey, 1998), conduzindo a resultados provavelmente incorrectos. Outro problema associado a esta metodologia é que a criação pode não ser morta pelo alfinete (Spivak e Downey, 1998; Gramacho *et al.*, 1999).

#### **2.5.2.4. Teste de morte da criação através da injeção de ácaros ou zângãos macerados em solução salina**

Posteriormente, uma nova metodologia foi desenvolvida por Titera e Kokkoris (1994), injectando a criação operculada com água, com solução salina, com etanol, com uma solução salina contendo ácaros macerados e/ou com uma solução salina contendo zângãos macerados. A solução salina com ácaros macerados não estimulou o comportamento de limpeza efectuado pelas obreiras, mas com os zângãos macerados provocou uma forte reacção.

#### **2.5.2.5. Teste de morte da criação por congelação com azoto líquido**

A partir de 1996, o método de morte da criação por congelação foi simplificado pelo uso de azoto líquido para congelar uma secção de favo directamente no quadro (Spivak e Reuter, 1998a, b e c). Para aplicar esta metodologia é necessário adquirir ou construir de um tubo cilíndrico e oco sobre o qual se derrama o azoto líquido para congelar uma secção de criação operculada. Pode usar-se um tubo em PVC de 3 polegadas de diâmetro e, pelo menos, 4 polegadas de altura (porque o azoto líquido entra em ebulição em contacto com a criação). Para congelar a criação é necessário uma quantidade mínima de, aproximadamente, 284 cm<sup>3</sup> de azoto líquido (para cerca de 160 alvéolos de criação de obreira operculada). Uma quantidade inferior poderá não matar toda a criação e poderá induzir uma margem inaceitável de erro nos resultados da avaliação do comportamento higiénico. Como procedimento básico, recomenda-se a selecção de um quadro de criação operculada com, pelo menos, 3 polegadas de diâmetro e com um número inferior a 30 alvéolos de criação desoperculada no seu interior. Seguidamente, dever-se-á colocar o quadro com a criação seleccionada na horizontal (sobre um suporte) e derramar cuidadosamente o azoto líquido dentro do tubo de PVC. Deve-se esperar algum tempo (cerca de 5 minutos), para que o tubo descongele e se possa retirar (Spivak e Reuter, 1998a, 2005).

A utilização do azoto líquido elimina a variabilidade da manipulação e do descongelamento da secção dos favos teste e reduz o número de vezes que uma colónia tem de ser aberta. É de fácil aquisição, devida á sua disponibilidade de mercado. Além



disso, a utilização de azoto líquido é a forma mais eficaz de congelar criação (Oldroyd, 1996; Spivak e Downey, 1998; Spivak e Gilliam, 1998a). Estas evidências podem ser comprovadas pela sua ampla utilização em alguns programas de selecção e melhoramento genético realizados em vários países (Wilkes e Oldroyd, 2002; De Guzman *et al.*, 2002b). No entanto, esta metodologia tem os potenciais perigos associados à manipulação do azoto líquido. Por esta razão, Boecking e Spivak (1999) e Gramacho *et al.* (1999) defendem que o método de morte por punção e por congelação pelo frio são as metodologias de campo mais fidedignas/seguras para avaliar o nível de resposta de colónias de abelhas melíferas em termos de comportamento higiénico. Recentemente, Spivak e Reuter (2005) reafirmam as suas convicções de que as duas melhores metodologias para avaliar o comportamento higiénico são, sem dúvida, os testes de morte da criação pelo frio.

### **2.5.3. Métodos para detectar factores de tolerância à varroose**

A propagação da varroose a nível mundial despoletou o desenvolvimento de várias linhas de investigação destinadas ao controlo da doença. A maioria delas centraram-se na luta contra o parasita *V. destructor*, quer através do uso de acaricidas de síntese, quer através do uso de produtos alternativos (como por exemplo, alguns óleos essenciais). Todavia, foram igualmente desenvolvidas outras linhas de investigação centradas na biologia do ácaro e na sua relação com as abelhas. A partir do final da década de oitenta, o uso de acaricidas de síntese (nomeadamente do fluvalinato) parecia proporcionar um tratamento eficaz e de longo prazo para o controlo da varroa. Consequentemente generalizou-se a sua utilização, o que provocou um relativo abandono destas linhas de investigação fundamentais. Porém, esta utilização repetida e generalizada de acaricidas sintéticos originou (desde o início da década de 90), populações de varroa resistentes ao fluvalinato (Lodesani *et al.*, 1995) e, posteriormente, também resistências cruzadas à flumetrina e à acrinatrina (Milani, 1995, 1999). Novos casos de fenómenos de resistência aos acaricidas (piretróides e organofosfatos) mais utilizados internacionalmente na luta contra a varroa foram surgindo em populações Europeias e Americanas de varroa, nomeadamente na Suíça, na

França, na Alemanha, na Finlândia, na Bélgica, na Espanha, no Reino Unido, nos Estados Unidos, na Argentina e em Israel (Trouiller, 1998, 2001; Thompson *et al.*, 2002; Martin, 2004). Paralelamente, a presença de varroas resistentes a outras moléculas [como o amitraz (Elzen *et al.*, 2000) e, mais recentemente, o coumafós], foi também detectada no norte de Itália (Spreafico *et al.*, 2001) e nos Estados Unidos (Elzen e Westervelt, 2000, 2002).

É importante salientar que uma das maiores limitações no combate a esta patologia advém, assim, da constatação de que os tratamentos químicos e biológicos têm demonstrado várias limitações ao nível do seu controlo, porque a utilização repetida em tratamentos consecutivos com os mesmos princípios activos tem dado origem ao aparecimento de resistências da varroa às substâncias químicas utilizadas (Milani, 1999; Martin, 2004). Consequentemente, a sua eficácia diminui, originando o aparecimento de resíduos nos produtos apícolas (Wallner, 1999; Bogdanov, 2006). Tal facto, tem questionado a segurança alimentar desses mesmos produtos e, provavelmente, poderá traduzir-se na sua desvalorização comercial.

Deste modo, os fenómenos recentes de resistência da varroa a estes acaricidas sintéticos (e a outros entretanto desenvolvidos) comprovaram os limites da sua utilização. O controlo químico da varrose pode oferecer ainda uma solução temporal aos apicultores, mas não constitui, *per se*, uma solução a longo prazo, pelo que, continua a ser necessário encontrar urgentemente uma relação estável hospedeiro-parasita.

Consequentemente, têm sido intensificadas as linhas de investigação dirigida à selecção de colónias baseada nos mecanismos de tolerância às patologias (principalmente à varrose), cujos principais critérios de selecção visam melhorar o comportamento higiénico e outros mecanismos relativos à reprodução diferencial destes ácaros. Estes estudos pretendem analisar e determinar os principais factores de tolerância (fertilidade das varroas reprodutoras, duração do período de operculação, atractividade da criação, comportamento de auto-limpeza ou limpeza de grupo e comportamento higiénico) das abelhas à varroa, com o objectivo de seleccionar linhas higiénicas de abelhas europeias mais tolerantes (Vandame, 1996; Vandame *et al.*, 1998; De Guzman *et al.*, 2002a; Harris *et al.*, 2002; Spivak e Reuter, 2005; Ibrahim e Spivak, 2006).

Uma dessas linhas de investigação que vem sendo desenvolvida baseia-se no estudo do comportamento higiénico, como um dos factores de tolerância das populações de *A. mellifera* ao ácaro *V. destructor*. Nesta linha de investigação têm sido utilizadas distintas metodologias de infestação de alvéolos de criação de obreiras. O princípio destas metodologias consiste na capacidade desta espécie para detectar e remover esta criação parasitada. A avaliação deste parâmetro pode ser efectuada segundo a constatação de dois comportamentos distintos. Remoção dos parasitas e das crias de obreiras dos alvéolos operculados (comportamento I) e detecção e desoperulação dos alvéolos com criação parasitada que voltam a ser reoperculados pelas abelhas sem eliminar as crias (comportamento II) (Peng *et al.*, 1987; Boecking e Drescher, 1990; Boecking *et al.*, 1993; Boecking e Ritter, 1994; Büchler, 1994; Boecking e Spivak, 1999; Flores *et al.*, 2001), ainda que, em alguns casos os ácaros sejam removidos pelas abelhas (Tewarson *et al.*, 1992; Rosenkranz *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 2001). No comportamento II, as varroas podem deixar os alvéolos através do opérculo que foi temporariamente removido, facto este observado pela primeira vez em colónias de *A. cerana* (Rath e Drescher, 1990; Rosenkranz *et al.*, 1993) e, posteriormente, confirmado também em *A. mellifera* (Boecking e Drescher, 1992; Boecking *et al.*, 1992, 1993; Boecking e Ritter, 1993, 1994).

#### **2.5.3.1. Métodos de “parasitação” com ácaros vivos ou com ácaros mortos**

Os métodos de infestação de alvéolos de criação diferem entre si dependendo do agente patogénico e/ou partículas inertes que são inoculadas nas colónias experimentais. No que se refere à varroose, as metodologias que têm sido frequentemente utilizadas baseiam-se na introdução de ácaros mortos (por congelação, lavados com álcool como o etanol e o pentano, ou recolhidos sobre os detritos existentes nos estrados das colmeias) (Flores *et al.*, 2001, 2003), na infestação com ácaros vivos (Boecking e Drescher, 1991, 1992; Boecking *et al.*, 1992; Tewarson *et al.*, 1992; Boecking *et al.*, 1993; Boecking e Ritter, 1993; Rosenkranz *et al.*, 1993; Boecking e Drescher, 1994; Spivak, 1996; Flores *et al.*, 2001, 2003) ou na introdução de formigas (Aumeier *et al.*, 1996) em alvéolos com criação operculada. Estes métodos variam, entre si, em função do número de ácaros introduzidos, do processo de morte dos ácaros, da sua origem (da mesma

colmeia, de outras colmeias e/ou apiários) e do processo de recolha (abelhas adultas e/ou criação destas).

Dos principais resultados obtidos nestes estudos, alguns autores revelaram que a *A. cerana* reconhece e reage aos alvéolos infestados com ácaros e que, aparentemente, expressa o mesmo grau de comportamento higiênico, perante a infestação com varroas vivas ou a introdução de varroas mortas (Rath e Drescher, 1990). Também tem sido constatado este comportamento de remoção na espécie *A. mellifera*, ainda que, com uma menor expressão (Büchler, 1994; Boecking e Spivak, 1999; Flores *et al.*, 2001, 2003).

Recentemente, este mesmo comportamento foi constatado em colónias de *A. m. iberiensis*, examinadas 24 horas após a infestação de alvéolos de criação de obreiras com ácaros vivos e mortos (Flores *et al.*, 2001, 2003).

#### **2.5.3.2. Métodos de testagem de partículas inertes**

Algumas partículas inertes (sementes de girassol, papel de filtro, etc.) também têm sido introduzidas na criação operculada (Boecking e Spivak, 1999). De igual modo, pupas tratadas com hemolinfa ou outros fluidos corporais parecem induzir um forte estímulo que leva a que as obreiras desoperquem e removam as pupas impregnadas com estes fluidos (Spivak e Downey, 1998).

## 2.6. Referências bibliográficas seleccionadas

Adams, J.; Rothman, E. D.; Kerr, W. E. e Paulino, Z. L. 1977. Estimation of sex alleles and queen matings from diploide male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics* **86**: 583-596.

Anderson, D. L. e Fuchs, S. 1998. Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **37**: 69-78.

Anderson, D. L. e Trueman, J. W. H. 1999. Are there different species of *Varroa jacobsoni*? In: Proceedings of the XXXVI<sup>th</sup> Apimondia Congress Vancouver, Vancouver, Canada. pp 59-62.

Anderson, D. L. e Trueman, J. W. H. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* **24**: 165-189.

Arathi, H. S.; Burns, I. e Spivak, M. 2000. Ethology of hygienic behaviour in honey bee *Apis mellifera* L. (Hymeniptera: Apidae): behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology* **106**: 365-379.

Arathi, H. S. e Spivak, M. 2001. Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behaviour in honeybee, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour* **62**: 57-66.

Aumeier, P. 2001. Bioassay for grooming effectiveness towards *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees. *Apidologie* **32**: 81-90.

Aumeier, P. e Rosenkranz, P. 2001. Scent or movement of *Varroa destructor* mites does not elicit hygienic behaviour by Africanized and Carniolan honey bees. *Apidologie* **32**: 253-263.

Ayasse, M.; Paxton, R. e Tengö, J. 2001. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **46**: 31-78.

Bailey, I. e Ball, B. V. 1991. Honey Bee Pathology.(2<sup>nd</sup> Ed.) Academic Press, London.

Ball, B. V. 1993. The damaging effects of *Varroa jacobsoni* infestation. In: Matheson, A. (Ed.) Living with Varroa. pp 9-13. International Bee Research Association, Cardiff, UK.

Ball, B. V. 1994. Host-parasite-pathogen interactions. In: Matheson, A. (Ed.) New perspectives on varroa. pp 5-11. International Bee Research Association, Cardiff, UK.

Bankova, V. S.; De Castro, S. L. e Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**: 3-15.

Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S. e Sabatini, A. G. 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Naturforsch* **57c**: 530-533.

Bankova, V. 2003. Propolis: quality and standards. In: Proceedings of the XXXVIII<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia. pp 182-183.

Belchior, L. 1996. Varroosis. *Apicultor* **4**: 7-9.

Ben Hamida, T. 1997. Chemotherapy against *Varroa jacobsoni*: efficiency and side effects. In: CIHEAM (Ed.) Cahiers Options méditerranéennes. The varroaosis in the Mediterranean region No. 21. pp 77-86. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM), Zaragoza, Spain.

Beye, M.; Hasselmann, M.; Fondrik, M. K.; Page, R. E. e Oholt, S. D. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-typt protein. *Cell* **114**: 419-429.

Boecking, O. e Drescher, W. 1990. The reaction of worker bees in different *Apis mellifera* colonies to *Varroa* infested brood cells. In: Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology, Ghent, Belgium. pp 41-42.

Boecking, O. e Drescher, W. 1991. Response of *Apis mellifera* L. colonies infested with *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **22**: 237-241.

Boecking, O. e Drescher, W. 1992. The removal response of *Apis mellifera* L. colonies to brood in wax and plastic cells after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud. and to freeze-killed brood. *Experimental and Applied Acarology* **16**: 321-329.

Boecking, O. e Drescher, W. 1994. Rating of signals that trigger *Apis mellifera* L. bees to remove mite-infested brood. *Apidologie* **25**: 459-461.

Boecking, O. e Drescher, W. 1998. Research on *Varroa* resistant traits in European honey bee races, EUROBEE AIR3-CT94-1064, EU, Brussels.

Boecking, O.; Rath, W. e Drescher, W. 1992. *Apis mellifera* removes *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* from sealed brood cells in the topics. *American Bee Journal* **132**: 732-734.

Boecking, O.; Rath, W. e Drescher, W. 1993. Grooming and removal behavior-strategies of *Apis mellifera* and *Apis cerana* bees against *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal* **133**: 117-119.

Boecking, O. e Ritter, W. 1993. Grooming and removal behavior of *Apis mellifera* intermissa in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* **32**: 127-134.

Boecking, O. e Ritter, W. 1994. Current status of behavioral tolerance of the honey bee *Apis mellifera* to the mite *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal* **134**: 689-694.

Boecking, O. e Spivak, M. 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**: 141-158.

Bogdanov, S. 2004. Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta* **38**: 334-341.

Boot, W. J.; Calis, J. N. e Beetsma, J. 1992. Differential periods of varroa mite invasion into worker and drone cells of honey-bees. *Experimental and Applied Acarology* **16**: 295-301.

Boot, W. J. 1994. Methyl palmitate does not elicit invasion of honeybee brood cells by varroa mites. *Experimental and Applied Acarology* **18**: 587-592.

Boot, W. J.; Calis, J. e Beetsma, J. 1995. Dutch-Vietnamese working group on reproductive behaviour of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* in colonies of the honeybee species *Apis mellifera* and *A. cerana*, Department of Entomology, Wageningen Agricultural University, Moc Chau, Vietnam.

Borneck, R. e Merle, B. 1988. New tests for Varroa control with Apistan. Present status of varroaosis in Europe and progress in varroa mite control. In: Proceeding of a Meeting of the EC Expert's Group, Udine, Luxembourg. pp 315-330.

Bowen-Walker, P. L.; Martin, S. J. e Gunn, A. 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology* **73**: 101-106.

Branco, M. R.; Kid, N. A. C. e Pickard, R. S. 1999. Development of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis mellifera iberica* in a Mediterranean climate. *Apidologie* **30**: 491-503.

Büchler, R.; Drescher, W. e Tornier, I. 1992. Grooming behavior of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Experimental and Applied Acarology* **16**: 313-319.

Büchler, R. 1994. Varroa tolerance in honey bees - occurrence, characters and breeding. *Bee World* **75**: 54-70.

Büchler, R. 1997. Field test on Varroa tolerance of the Kirchhainer population. *Apidologie* **28**: 191-193.

Büchler, R. 2000. Design and success of a German Breeding Program for Varroa tolerance. *American Bee Journal* **140**: 662-665.

Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chemical Toxicology* **36**: 347-363.

Calderone, N. W. 1998. Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie* **29**: 127-158.

Calderone, N. W. e Lin, S. 2001. Behavioural responses of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to extracts of larvae, cocoons and brood food of worker and drone bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Physiological Entomology* **26**: 341-350.

Calderone, N. W. e Page, R. E. 1988. Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **22**: 17-25.

Calderone, N. W. e Page, R. E. 1991. Evolutionary genetics of division of labor in colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). *American Naturalist* **138**: 69-92.

Calderone, N. W. e Page, R. E. 1992. Effects of interactions among genotypically diverse nestmates on task specialization by foraging honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **30**: 219-226.

Cardenal Galván, J. A.; Gómez Pajuelo, A. e López-Sepúlveda, E. C. G. 1988. Using fluvalinate inserts in Varroa control. In: Present status of varroa control in Europe and progress in the varroa mite control. Proceedings of a meeting of the EC Experts' Group, Udine, Italy



Cartel, B. 2005. Estivage, pillage et orphelinage. <http://www.apiservices.com/abeille-de-france/articles/estivage.htm> Visitada em 25/10/2005.

Chiesa, F. 1991. Effective control of varroatosis using powdered thymol. *Apidologie* **22**: 135-145.

Chioveanu, G.; Ionescu, D. e Mardare, A. 2004. Control of nosemosis - the treatment with "Protofil". *Apiacta* **39**: 31-38.

Cobert, S. A. 2003. Nectar sugar content: estimating standing crop and secretion rate in the field. *Apidologie* **34**: 1-10.

Cobey, S. e Lawrence, T. 1988. Varroa mite: potencial methods of control. *American Bee Journal* **160**: 112-117.

Colin, M. E. 1990. Essential oils for controlling honey bee varroosis. *Journal of Applied Entomology* **110**: 19-25.

Colin, M. E. 1997. Alternative control of the Varroosis. In: CIHEAM (ed.) The varroosis in the Mediterranean Region. Cahiers Options Méditerranéennes No. 21. pp 87-98. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM), Zaragoza, Spain.

Colin, M. E.; García Fernández, P. e Ben Hamida, T. 1999. Varroosis. In: M.E.Colin, Ball, B. V. e Kilani, M. (Eds.) Bee disease diagnosis. Serie B: Etude et Recherches. pp 117-120. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM), Zaragoza, Spain.

Crailsheim, K. e Riessberger-Gallé, U. 2001. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie* **32**: 91-103.

Crane, E. 1978. The varroa mite. *Bee World* **59**: 164-167.

Crane, E. 1990a. The bees used in beekeeping, and background information. In: Crane, E. (ed.) Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources No. I. pp 3-81. Heinemann Newnes, Oxford.

Crane, E. 1990b. Honeybees plant resources, and products from the hive. In: Crane, E. (ed.) Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources No. V. pp 427-451. Heinemann Newnes, Oxford.

Crane, E. 1990c. The newer hive products: pollen, propolis, royal jelly, bee venom, bee brood. In: Crane, E. (Ed.) *Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources No. V*. pp 452-472. Heinemann Newnes, Oxford.

Crozier, R. H. 1977. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **22**: 263-288.

Danka, R. G.; Rinderer, T. E.; Kuznetsov, V. N. e Delatte, G. T. 1995. A USDA-ARS project to evaluate resistance to *Varroa jacobsoni* by honey bees of Far-Eastern Russia. *American Bee Journal* **135**: 746-748.

Danka, R. G.; Villa, J. D.; Harbo, J. R. e Rinderer, T. E. 1997. Initial evaluation of industry-contributed honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal* **137**: 221-222.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E. e Beaman, L. D. 1993. Survival of *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari, Varroidae) away from its living host *Apis mellifera* L. *Experimental and Applied Acarology* **17**: 283-290.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E. e Stelzer, J. A. 1999. Occurrence of two genotypes of *Varroa jacobsoni* Oud. in North America. *Apidologie* **30**: 31-36.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E.; Delatte, G. T.; Stelzer, J. A.; Williams, J. L.; Beaman, L. D.; Kuznetsov, V.; Bernard, S. J.; Bigalk, M. e Tubbs, H. 2001a. Multi-state field trials of ARS Russian honey bees. *American Bee Journal* **141**: 810-812.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E.; Stelzer, J. A.; Beaman, L. e Harper, C. 2001b. An evaluation of Far-eastern Russian honey bees and other methods for the control of tracheal mites. *American Bee Journal* **141**: 737-741.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E. e Collins, A. M. 2002a. Attractiveness of Africanized honey bee brood from Southern Texas to *Varroa destructor* infestation. *American Bee Journal* **142**: 130-132.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E.; Stelzer, J. A.; Beaman, L.; Delatte, G. T. e Harper, C. 2002b. Hygienic behavior by honey bees from Far-eastern Russia. *American Bee Journal* **142**: 58-60.

De Jong, D.; Morse, R. A. e Eickwort, G. C. 1982a. Mite pests of honey bees. *Annual Review of Entomology* **27**: 229-252.

De Jong, D.; De Jong, P. H. e Gonçalves, L. S. 1982b. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* **21**: 165-167.

De Jong, D.; Gonçalves, L. S. e Morse, R. A. 1984. Dependence on climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. *Bee World* **65**: 117-121.

De Jong, D.; Message, D. e Issa, M. R. 1985. The influence of cell size on infestation rates by the mite *Varroa jacobsoni*. In: Proceedings of the XXX<sup>th</sup> International Apicultural Congress, Nagoya, Japan.

De Jong, D. 1990. Mites: Varroa and other parasites of brood. In: Morse, R. A. e Nowogrodski, R. (Eds.) Honey Bee Pests, Predators and Diseases. pp 200-218. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.

De La Rúa, P.; Galián, J. e Serrano, J. 1998. Mitochondrial variability of honeybees populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology* **7**: 1543-1547.

De La Rúa, P.; Galián, J. e Serrano, J. 1999. Variabilidad mitocondrial en poblaciones de abejas de la miel del Sureste Peninsular. *Investigación Agraria Producción y Sanidad Animal* **14**: 24-30.

De La Rúa, P.; Galián, J.; Serrano, J. e Moritz, R. F. A. 2001. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from Canary Islands. *Molecular Ecology* **10**: 1733-1742.

Delfinado, M. D. e Baker, E. W. 1974. Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina). *Journal of Washington Academic Science* **64**: 4-10.

Delfinado-Baker, M. e Aggarwal, K. 1987. A new Varroa (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). *International Journal of Acarology* **13**: 233-237.

Delfinado-Baker, M. e Houck, M. A. 1989. Geographical variation in *Varroa jacobsoni* (Acari, Varroidae): application of multivariate morphometric techniques *Apidologie* **20**: 345-348.

Denholm, C. H. 1999. Inducible honey bee viruses associated with *Varroa jacobsoni*. PhD. Thesis, Keele University, Staffordshire, UK.

Donzé, G. e Guerin, P. M. 1994. Behavioral attributes and parental care of Varroa mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **34**: 305-319.

Donzé, G.; Fluri, P. e Imdorf, A. 1998. A look under the cap: the reproductive behaviour of *Varroa* in the capped brood the honey bee. *American Bee Journal* **138**: 528-533.

Duay, P.; De Jong, D. e Engels, W. 2003. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiple infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie* **34**: 61-65.

Dustmann, J. H. 1993. Natural defense mechanisms of a honey bee colony against diseases and parasites. *American Bee Journal* **133**: 431-434.

Eguaras, M.; Del Hoyo, M. L.; Palacio, M. A.; Ruffinengo, S. e Bedascarrasbure, E. L. 2001. A new product with formic acid for *Varroa jacobsoni* Oud. control in Argentina. I. Efficacy. *Journal of Veterinary Medicine* **48B**: 11-14.

Ellis, J. D. J. 2001. The future of varroa control: integrating current treatments with the latest advancements. *American Bee Journal* **141**: 127-131.

Elzen, P. J.; Baxter, J. R.; Spivak, M. e Wilson, W. T. 2000. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* **31**: 437-441.

Elzen, P. J. e Westervelt, D. 2002. Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida. *American Bee Journal* **142**: 291-292.

Farre, R.; Frasset, I. e Sánchez, A. 2004. El própolis y la salud. *Archivos Pharmaceutica* **45**: 21-43.

Flores, J. M.; Ruiz, J. A.; Ruz, J. M.; Puerta, F. e Bustos, M. 2001. Hygienic behavior of *Apis mellifera iberica* against brood cells artificially infested with varroa. *Journal of Apicultural Research* **40**: 29-34.

Flores, J. M.; Puerta, F.; Ruiz, J. A. e Calero, M. J. 2003. A note on the use of dead *Varroa* mite in the study of the removal behaviour of the honey bee. *Revista Ibérica de Parasitología* **63**: 5-8.

Floris, I.; Satta, A.; Garau, V. I.; Melis, M.; Cabras, P. e Aloul, N. 2001. Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*. *Apidologie* **32**: 577-585.

Fries, I.; Camazine, S. e Sneyd, J. 1994. Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World* **75**: 5-28.

Fries, I. e Perez-Escala, S. 2001. Mortality of *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies during winter. *Apidologie* **32**: 223-229.

Fuchs, S. 1990. Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud. in colonies of *Apis mellifera carnica*. *Apidologie* **21**: 193-199.

Fukuda, H. e Sekiguchi, F. 1966. Seasonal change of the honeybee worker longevity in Sapporo, North Japan, with notes of some factors affecting the life span. *Japanese Journal of Ecology* **16**: 206-212.

Fukuda, H. e Sakagami, S. F. 1968. Worker brood survival in honeybees. *Research in Population Ecology* **10**: 31-39.

Fukuda, H. e Ohtani, T. 1977. Survival and life span of drone honeybees. *Research in Population Ecology* **19**: 51-68.

Garcia-Amoedo, L. R. e Almeida-Muradian, L. B. 2002. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real. *Quim Nova* **25**: 676-679.

Garedew, A.; Lamprecht, I.; Schmolz, E. e Schricker, B. 2002. The varroacidal action of propolis: a laboratory assay. *Apidologie* **33**: 41-50.

Garedew, A.; Schmolz, E. e Lamprecht, I. 2004. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**: 419-430.

Garrido, C.; Rosenkranz, P.; Stürmer, M.; Rübsam, R. e Büning, J. 2000. Toluidine blue staining as a rapid measure for initiation of oocyte growth and fertility in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **31**: 559-566.

Garrido, C. e Rosenkranz, P. 2003. The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*. *Experimental and Applied Acarology* **31**: 269-273.

Gary, N. E. 1975. Activities and behavior of honey bees. In: Graham, J. M. (Ed.) *The hive and the honeybee* No. III. pp 185-264. Dandant & Sons, Hamilton, Illinois, USA.

Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. *Bee World* **60**: 58-84.

Gilliam, M.; Taber, S. e Richardson, G. V. 1983. Hygienic behaviour of honey bees in relation to Chalkbrood disease. *Apidologie* **14**: 29-39.

Gilliam, M.; Taber, S.; Lorenz, B. J. e Prest, B. D. 1988. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **52**: 314-325.

Glinski, Z. e Jarosz, J. 1995. Mechanical and biochemical defences of honey bees. *Bee World* **76**: 110-118.

Gómez Pajuelo, A. 2000. Tratamentos químicos frente a varroa en España. In: Jornadas sobre varroa, Moncada, Valencia. pp 1-10.

Gonçalves, L. S. e Kerr, W. E. 1970. Noções sobre genética e melhoramento em abelhas. In: Anais do 1º Congresso brasileiro de Apicultura, Florianópolis, SC. Brasil. pp 8-36.

Goodwin, M. 2004. Introduction and spread of varroa in New Zealand. *Bee World* **85**: 26-28.

Gramacho, K. P. e Gonçalves, L. S. 1999. Fatores que interferem nas actividades de abelhas *Apis mellifera* relacionadas ao comportamento higiênico. In: Anais do IV Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto, Brasil. pp 58-65.

Gramacho, K. P.; Gonçalves, L. S.; Rosenkranz, P. e De Jong, D. 1999. Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. *Apidologie* **30**: 367-374.

Gordon, D. M. 1996. The organization of work in social insect colonies. *Nature* **380**: 121-124.

Gregorc, A. e Planinc, I. 2001. Acaricidal effect of oxalic acid in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* **32**: 333-340.

Gregorc, A. e Planinc, I. 2002. The control of *Varroa destructor* using oxalic acid. *Veterinary Journal* **163**: 306-310.

Gregorc, A. e Poklukar. 2003. Rotenona and oxalic acid as alternative acaricidal treatments for *Varroa destructor* in honeybee colonies. *Veterinary Parasitology* **111**: 351-360.

Guiraud, G.; Nectoux, M.; André, J. F.; Bounias, M. e Popeskovic, D. 1989. Evaluation of cupric sulphate as an acaricide against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* **28**: 201-207.

Guzmán-Novoa, E.; Vandame, R. e Arechavaleta, M. E. 1999. Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apidologie* **30**: 173-182.

Harbo, J. R. 1996. Evaluating colonies of honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. *Bee Science* **4**: 100-105.

Harbo, J. R. e Harris, J. W. 1999a. Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Economic Entomology* **92**: 261-265.

Harbo, J. R. e Harris, J. W. 1999b. Selecting honey bee for resistance to *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **30**: 183-196.

Harbo, J. R. e Harris, J. W. 2001. Resistance to *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varridae) when mite-resistant queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) were free-mated with unselected drones. *Journal of Economic Entomology* **94**: 1319-1323.

Harbo, J. R. e Hoopinger, R. A. 1997. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) in the United States that express resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Economic Entomology* **90**: 893-898.

Harris, J.; Rinderer, T. E.; Kuznetsov, V.; Danka, R.; Delatte, G.; De Guzman, L. e Villa, J. 2002. Imported Russian Honey bees: Quarantine and initial selection for varroa resistance. *American Bee Journal* **31**: 591-596.

Harris, J. W.; Harbo, J. R.; Villa, J. D. e Danka, R. G. 2003. Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) during a 10-year period. *Journal of Environmental Entomology* **32**: 1305-1312.

Holm, S. N. 1985. Breeding Honeybees for Resistance to Chalkbrood Disease. In: Proceedings of the XXX<sup>th</sup> International Apicultural Congress of Apimondia, Nagoya, Japan. pp 100-102.

Ibrahim, A. e Spivak, M. 2006. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* **37**: 31-40.

Ifantidis, M. D. 1983. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in the worker and drone honeybee cells. *Journal of Apicultural Research* **22**: 200-206.

Ifantidis, M. D. 1988. Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honeybee brood cells. *Apidologie* **19**: 387-396.

Ifantidis, M. D.; Karamanidou, A. e Katikou, P. 1999. Juvenile mortality of the female descendants in the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in worker brood of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* **38**: 25-32.

Imdorf, A.; Charrière, J. D.; Maquelin, C.; Kilchenmann, V. e Bachofen, B. 1996. Alternative varroa control. *American Bee Journal* **63**: 189-193.

Invernizzi, C. 2001. Resistencia a la enfermedad de la cría yesificada por colonias de *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higiénico (Hymenoptera, Apidae). *Iheringia* **91**: 109-114.

Jacobs, F. J.; Lenaerts, A.; De Graaf, D. e Casteels, P. 1990. Humoral reactions of honeybees in relation to Varroa and Nosema disease of honeybees. In: Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology, Gent, Belgium. pp 120-124.

Jean-Prost, P. 1989. Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena. (3ª Ed.), Madrid, España.

Kefuss, J. A. 1978. Influence of photoperiod on the behaviour and brood rearing activities of the honeybee. *Journal of Apicultural Research* **17**: 137-228.

Kefuss, J. 1993. Breeding bees tolerant to varroa. *American Bee Journal* **133**: 53-54.

Kefuss, J. A. 1995. Honey bee hygienic behavior: France, Tunisia and Chile. *Apidologie* **26**: 325-327.

Kefuss, J.; Taber, S.; Van Pouecke, J. e Rey, F. 1996. A practical method to test for disease resistance in honey bees. *American Bee Journal* **136**: 31-32.

Klepsh, H.; Maul, V.; Peterson, N.; Koeniger, N. e Götz, W. 1983. Feldersuch zur Varroatose bekämpfung mit Folbex VA neu. *Die Biene* **119**: 54-57.

Knutson, L. V. e Murphy, W. L. 1990. Insects: Diptera (Flies). In: Morse, R. A. e Nowogrodzki, K. (eds.) Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. pp 119-134. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.

Koeniger, G.; Koeniger, N. e Fabricius, M. 1979. Some detailed observations of the mating in honeybee. *Bee World* **60**: 53-57.

Kralj, J. e Otis, G. W. 1999. Practical selection to breed bees with rapid development to enhance resistance to varroa mites. *American Bee Journal* **140**: 191-193.

Kraus, B.; Koeniger, N. e Fuchs, S. 1986. Recognition and preference of bees of specific age by *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **17**: 257-266.



Kraus, F. B.; Neumann, P.; Scharpenberg, H.; Van Praag, J. e Moritz, R. F. A. 2003. Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera*). *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 914-920.

Kuenen, L. P. S. e Calderone, N. W. 2000. Varroa mite infestations in elevated honey bee brood cells: effects of context and cast. *Journal of Insect Behavior* **13**: 201-215.

Kumazawa, S.; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Hamasaka, T. e Nakayama, T. 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical Pharmacology Bulletin* **51**: 740-742.

Laidlaw, H. H. e Page, R. E. 1986. Mating designs. In: Rinderer, T. E. (Ed.) Bee genetics and breeding. pp 323-344. Academic Press, Orlando.

Lapidge, K. L.; Oldroyd, B. P. e Spivak, M. 2002. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften* **89**: 565-568.

Le Conte, Y. e Arnold, G. 1988. A study of the thermopreferendum of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **19**: 155-164.

Le Conte, Y.; Arnold, G.; Trouiller, H.; Masson, B.; Chappe, B. e Ourisson, G. 1989. Attraction of the parasitic mite Varroa to the drone larvae of the honey bees by simple aliphatic esters. *Science* **245**: 638-639.

Le Conte, Y.; Arnold, G. e Desenfant, P. H. 1990. Influence of brood temperature and hygrometry variations on the development of the honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Environmental Entomology* **19**: 1780-1785.

Le Conte, Y.; Arnold, G.; Trouiller, H.; Hervet, C.; Masson, B.; Chappe, B. e Ourisson, G. 1991. Semiochemicals involved in the honey bee- varroa mite relationship: Kairomones and brood pheromones. In: Goodman, L. J. e Fisher, R. C. (Eds.) The Behaviour and Physiology of Bees. pp 69-76. CAB International, Wallingford.

Lodesani, M.; Bergomi, S.; Pellacani, A.; Carpana, E. e Rabitti, T. 1990. Prove sperimentali per la valutazione dell'efficacia e per la determinazione dei reidui di alcuni prodotti impiegati nella lotta alla varroasi. *Apicoltura* **6**: 105-130.

Lodesani, M.; Colombo, M. e Spreafico, M. 1995. Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* **26**: 67-72.

Loper, G. M.; Wolf, W. W. e Taylor, O. R. 1987. Detection and monitoring of honeybee drone congregation areas by radar. *Apidologie* **18**:163-172.

Loper, G. M.; Wolf, W. W. e Taylor, O. R. 1988. The use of radar to document honey-bee (*Apis mellifera*) drone flight behavior. In: Needham, G. R., Page, R. E., Delfinado-Baker, M. e Bowman, C. D. (Eds.) Africanized honeybees and bee mites. pp 193-198. Ellis Horwood, Chichester.

Marcucci, M. C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie* **26**: 83-89.

Marinelli, E.; Pulcini, P.; Morgia, C.; De Pace, F.; Allegrini, F. e Persano, O. L. 2004. Oxalic acid by *Varroa* to varroa control in central Italy. *Apiacta* **37**: 39-43.

Martin, S. 1994. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology* **18**: 87-100.

Martin, S. J. 1995a. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology* **19**: 199-210.

Martin, S. J. 1995b. Reproduction of *Varroa jacobsoni* in cells of *Apis mellifera* containing one or more mother mites and the distribution of these cells. *Journal of Apicultural Research* **34**: 187-196.

Martin, S. J. 1997a. Life and death of *Varroa*. In: Munn, P. e Jones, R. (Eds.) Fight the Mite. pp 10. International Bee Research Association (IBRA), Cardiff, UK.

Martin, S. J. 1997b. *Varroa jacobsoni* population biology research in the U.K. *American Bee Journal* **137**: 382-384.

Martin, S. J. e Kemp, D. 1997. Average number of reproductive cycles performed by *Varroa jacobsoni* in honey bees (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research* **36**: 113-123.

Martin, S.; Holland, K. e Murray, M. 1997. Non-reproduction in the honeybee mite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology* **21**: 539-549.

Martin, C.; Provost, E.; Roux, M.; Bruchou, C.; Crauser, D.; Clement, J.-L. e Le Conte, Y. 2001. Resistance of the honey bee, *Apis mellifera* to the acarian parasite *Varroa destructor*: behavioural and electroantennographic data. *Journal of Physiological Entomology* **26**: 362-370.

Martin, C.; Provost, E.; Bagnères, A.-G.; Roux, M.; Clement, J.-L. e Le Conte, Y. 2002. Potencial mechanism for detection by *Apis mellifera* of the parasitic mite *Varroa destructor* inside sealed brood cells. *Journal of Physiological Entomology* **27**: 175-188.

Martin, S. J. 2004. Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World* **85**: 67-69.

Mattila, H. R. e Otis, G. W. 1999. Trials of Apiguard, a thymol-based miticide. Part 1. Efficacy for control of parasitic mites and residues in honey. *American Bee Journal* **139**: 947-952.

Mattila, H. R.; Otis, G. W.; Daley, J. e Schulz, T. 2000. Trials of Apiguard, a thymol-based miticide. Part 2. Non-target effect on honey bees. *American Bee Journal* **140**: 68-70.

Maurizio, A. 1975. How bees make honey. In: Crane, E. (Ed.) Honey, a comprehensive survey. p 77-105, London, Heinemann.

Message, D. 1979. Efeito de condições ambientais no comportamento higiénico em abelhas Africanizadas *Apis mellifera*. MS Thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Ribeirão Preto, Brasil.

Message, D. e Gonçalves, L. S. 1980. Efeito das condições climáticas e da colónia no comportamento higiénico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). In: Anais do 5º Congresso Brasileiro de Apicultura e III Congresso Latino Ibero-Americano de Apicultura, Universidade Federal de Viçosa, Brasil. pp, 140-147.

Milani, N. 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* **26**: 415-429.

Milani, N. 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* **30**: 229-234.

Momot, J. P. e Rothenbuhler, W. C. 1971. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *Journal of Apicultural Research* **10**: 11-21.

Moretto, G.; Gonçalves, L. S. e De Jong, D. 1991. The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud infestations in Brazil. *Apidologie* **22**: 197-203.

Moretto, G.; Gonçalves, L. S. e De Jong, D. 1993. Heritability of Africanized and European honey bee defensive behaviour against the mite *Varroa jacobsoni*. *Revista Brasileira de Genética* **16**: 71-77.

Moritz, R. F. A. e Southwick, E. E. 1992. Bees as Superorganisms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Moustafa, H. H. 2001. L'Apiculture en Afrique. Les pays du nord, de l'est, du nord-est et de l'ouest du continent. *Apiacta* **1**: 34-38.

Murilhas, A. M. 1998. The tolerance of four commercial strains of honey bee (*Apis mellifera* L.) to infestation by *Varroa jacobsoni* Oud. in Mediterranean conditions. PhD Thesis, University of Wales - Cardiff School of Biosciences, Cardiff, UK.

Murilhas, A. M. 2002. *Varroa destructor* infestation impact on *Apis mellifera carnica* capped worker brood production, bee population and honey storage in a Mediterranean climate. *Apidologie* **33**: 271-281.

Mutinelli, F.; Baggio, A.; Capolung, F.; Piro, R. e Biasion, L. 1997. L'acido ossalico nella lotta alla varroasi. *L'Ape Nostra Amica* **4**: 4-7.

Mutinelli, F. e Baggio, A. 2004. Use of medical drugs against varroosis. *Apiacta* **39**: 53-62.

Nanneli, R. 1996. Caratteri morfologici essenziali per una rapida identificazione dei diversi stadi di *Varroa jacobsoni* Oud. *Apicoltura* **2**: 95-119.

Nazzi, F.; Milani, N.; Della Vedova, G. e Nimis, M. 2001. Semiochemicals from larval food affect the locomotory behaviour of the varroa mite. *Apidologie* **32**: 149-155.

Nazzi, F.; Milani, N. e Vedova, G. D. 2002. (Z)-8-Heptadecene from infested cells reduces the reproduction of *Varroa destructor* under laboratory conditions. *Journal of Chemical Ecology* **28**: 2181-2190.

Nazzi, F.; Vedova, G. D. e D'agaro, M. 2004. A semiochemical from brood cells infested by *Varroa destructor* triggers hygienic behaviour in *Apis mellifera*. *Apidologie* **35**: 65-70.

Negri, G.; Marcucci, M. C.; Salatino, A. e Salatino, M. L. F. 1998. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie* **29**: 305-314.

Neumann, P. e Moritz, R. F. A. 2000a. Testing genetic variance hypotheses for the evolution of polyandry in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* **47**: 271-279.

Neumann, P.; Moritz, R. F. A. e Mautz, D. 2000b. Colony evaluation is not affected by drifting of drone and worker honeybees (*Apis mellifera* L.) at a performance testing apiary. *Apidologie* **31**: 67-69.

Newton, D. C. e Ostasiewski, N. J. J. 1986. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *American Bee Journal* **126**: 278-281.

Oldroyd, B. P. 1996. Evaluation of Australian commercial honey bees for hygienic behaviour, a critical character for tolerance to chalkbrood. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **36**: 625-629.

Oldroyd, B. P. 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends of Ecological Evolution* **14**: 312-315.

Page, R. E. e Erickson, E. H. 1988. Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **23**: 117-126.

Page, R. E. J. e Laidlaw, H. H., JR. 1992. Honey Bee Genetics and Breeding. In: Graham, J. M. (Ed.) *The Hive and the Honey Bee*. pp 235-260. Dandant & Sons, Hamilton, Illinois, USA.

Pajuelo, A. G. 2000. Tratamentos químicos frente a varroa em Espanha. In: *Jornadas sobre Varroa*, Moncada, Espanha. pp 1-9.

Palacio, M. A.; Figini, E. E.; Ruffinengo, S. R.; Rodriguez, E. M.; Del Hoyo, M. L. e Bedascarrasbure, E. L. 2000. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* **31**: 471-478.

Park, O. W. 1936. Disease resistance and American foulbrood. *American Bee Journal* **76**: 12-14.

Patricio, E. F. L. R. A.; Cruz Lopés, L.; Maile, R. e Morgan, E. D. 2003. Secretions of stingless bees: the Dufour glands of some *Frieseomellita* species (Apidae: Meliponinae). *Apidologie* **34**: 359-365.

Peng, Y. S.; Fang, Y.; Xu, S. e Ge, L. 1987a. The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology* **49**: 54-60.

Peng, Y. S. C.; Fang, Y. Z.; Xu, S. Y.; Ge, L. S. e Nasr, M. E. 1987b. Response of foster Asian honeybee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honeybee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology* **49**: 259- 264.

Pfeiffer, K. J. e Crailsheim, K. E. 1998. Drifting of honeybees. *Insectes Sociaux* **45**: 113-233.

Piccirillo, G. A. e De Jong, D. 2003. The influence of brood comb cell size on the reproductive behavior of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in Africanized honey bee colonies. *Genetics and Molecular Research* **2**: 36-42.

Piccirillo, G. A. e De Jong, D. 2004. Old honey bee brood combs are more infested by the mite *Varroa destructor* than are new brood combs. *Apidologie* **35**: 359-364.

Rath, W. e Drescher, W. 1990. Response of *Apis cerana* Fabr. towards brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud. and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie* **21**: 311-321.

Rath, W. 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**: 97-100.

Rehm, S. M. e Ritter, W. 1989. Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the development period. *Apidologie* **20**: 339-343.

Rice, N. D.; Winston, M. L. e Higo, H. A. 2004. Integrate pest management for the parasitic mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) in colonies of honey bees (*Apis mellifera*). *American Bee Journal* **144**: 791-795.

Richez, P. e Le Conte, Y. 1995. Efficacité thérapeutique d'une nouvelle formulation (Apivar) destinée au traitement de la varroase de l'abeille. *Abeilles et Fleurs* **807**: 12-13.

Rinderer, T. E.; De Guzman, L. I. e Kulinčević, J. M. 1993. The breeding, importing, testing and general characteristics of Yugoslavian honey bees bred for resistance to *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal* **133**: 197-200.

Rinderer, T. E.; Delatte, G. T.; De Guzman, L.; Williams, J.; Stelzer, J. A. e Kuznetsov, V. N. 1999. Evaluations of the Varroa-resistance of honey bees imported from Far-Eastern Russia. *American Bee Journal* **139**: 287-290.

Rinderer, T. E.; De Guzman, L. I.; Delatte, G. T.; Stelzer, J. A.; Lancaster, V. A.; Kuznetsov, V.; Beaman, L.; Watts, R. e Harris, J. W. 2001a. Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees from Far-Eastern Russia. *Apidologie* **32**: 1-14.

Rinderer, T. E.; De Guzman, L. I.; Delatte, G. T.; Stelzer, J. A.; Williams, J. L.; Beaman, L. D.; Kuznetsov, V.; Bigalk, M.; Bernard, S. J. e Tubbs, H. 2001b. Multi-state field trials of ARS Russian honey bees. 1. Responses to *Varroa destructor* 1999, 2000. *American Bee Journal* **141**: 658-661.

Ritter, W. 1988. Medications registered in Western Europe for varroaosis control. *Apidologie* **19**: 113-116.

Robinson, G. E. 1992. Regulation of division of labour in insect societies. *Annual Review of Entomology* **37**: 637-665.

Rosenkranz, P.; Tewarson, N. C.; Singh, A. e Engels, W. 1993. Differential hygienic behavior towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to the mites. *Journal of Apicultural Research* **32**: 89-93.

Rosenkranz, P.; Fries, I.; Boecking, O. e Stumer, M. 1997. Damaged Varroa mites in the debris of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies with and without hatching brood. *Apidologie* **28**: 427-437.

Rothenbuher, W. C. 1964a. Behavior genetics of nest cleaning behavior in honeybees I. Responses of four inbred lines to disease killed brood. *Animal Behaviour* **12**: 578-583.

Rothenbuher, W. C. 1964b. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. *American Zoologist* **4**: 111-123.

Rothenbuher, W. C.; Kulinčević, J. M. e Kerr, W. E. 1968. Bee Genetics. *Annual Review of Genetics* **2**: 413-438.

Ruttner, F. 1973. Die Bienenrassen des mediterraneens beckens. *Apidologie* **4**: 171-172.

Ruttner, F. 1975. Races of Bees. In: Graham, J. M. (Ed.) *The Hive and the Honey Bee*. pp 19-38. Dandant & Sons, Hamilton, Illinois, USA.

Ruttner, F.; Ritter, W. e Götz, W. 1980. Chemotherapie der varroatose über die hämolymph der biene. *Allgemeine Deutsche Imkerzeitung* **14**: 160-166.

Ruttner, F. 1988. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Sabatini, A. G.; Marcazan, G. L.; Colombo, R. e Garagnani, M. 1994. Applicazione di un metodo enzimatico per la determinazione dell'acido formico e dell'acido lattico presenti nel miele. *Apicoltura* **9**: 135-145.

Sabatini, A. G.; Caboni, M. F.; Marconi, E. e Lercker, G. 2003. Royal jelly: quality and standards. In: *Proceedings of the XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress*, Ljubljana, Slovenia. pp 394-395.

Sahinler, N.; Timur, M. e Gull, A. 2003. Chemical composition of propolis from Hatay region. In: *Proceedings of the XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress*, Ljubljana, Slovenia. pp 160-161.

Sakofski, F. 1990. Quantitative investigations on transfer of *Varroa jacobsoni* Oud. In: *Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology*, Ghent, Belgium. pp 70-72.

Salamanca Grosso, G.; Rivera, F. A. e Salamanca Grosso, J. M. 2001. Características y propiedades de la apitoxina de *Apis mellifera* como potencial terapéutico usos y limitaciones. <http://www.apiservices.htm>. Visitada em 13/10/2005.

Sammataro, D. 1996. Mechanisms of bee resistance/tolerance to Varroa mites. *American Bee Journal* **136**: 567-568.

Sammataro, D.; Degrandi-Hoffman, G.; Needham, G. e Wardel, G. 1998. Some volatile plant oils as potential control agents for varroa mites (Acari: Varroidae) in honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae). *American Bee Journal* **138**: 681-685.

Sammataro, D.; Gerson, U. e Needham, G. 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Annual Reviews of Entomology* **45**: 519-548.

Sammataro, D.; Hoffman, G. D.; Wardell, G.; Finley, J. e Ostiguy, N. 2004. Testing a combination of control tactics to manage *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population levels in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *International Journal of Acarology* **30**: 71-76.



Santiago, E.; Albornoz, J.; Dominguez, A. e Izquierdo, J. I. 1986. Etude biométrique des populations d'abeille (*Apis mellifera*) du nord-ouest de L'Espagne. *Apidologie* **16**: 71-92.

Santiago, G. P.; Otero-Colina, G.; Sánchez, D. M.; Guzmán, M. E. R. e Vandame, R. 2000. Comparing effects of three acaricides on *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) using two application techniques. *Florida Entomologist* **83**: 468-476.

Schmid-Hempel, P. e Wolf, T. 1988. Foraging effort and life span of workers in a social insect. *Journal of Animal Ecology* **57**: 509-522.

Seeley, T. D. 1977. Life history strategy of the honey bee, *Apis mellifera*. *Oecologia* **32**: 109-118.

Seeley, T. D. e Visscher, P. K. 1985. Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction. *Ecological Entomology* **10**: 81-88.

Seeley, T. D. 1995. The wisdom of the hive: the social physiology of the honey bees. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Spivak, M. e Gilliam, M. 1993. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research* **32**: 147-157.

Spivak, M. Reuter, G. S. e Lamb, M. 1995. Frequency of hygienic behavior in naturally mated daughters of a hygienic breeder queen. *American Bee Journal* **135**: 830-831.

Spivak, M. 1996. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **27**: 245-260.

Spivak, M. e Downey, D. L. 1998. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **91**: 64-70.

Spivak, M. e Gilliam, M. 1998a. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa mites. Part II. Studies on hygienic behavior since the Rothenbuhler era. *Bee World* **79**: 169-186.

Spivak, M. e Gilliam, M. 1998b. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World* **79**: 124-134.

Spivak, M. e Reuter, G. 1998a. The Hygienic Queen. *Bee Culture* **126**: 23-25.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 1998b. Honey bee hygienic behavior. *American Bee Journal* **138**: 283-286.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 1998c. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie* **29**: 291-302.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 2001. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology* **94**: 326-331.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 2005. A sustainable approach to controlling honey bee diseases and varroa mites. <http://www.sare.org/publications/factsheet/0305.htm>. Visitada a 15/09/05.

Spreafico, M.; Eördegh, F. R.; Bernardinelli, I. e Colombo, M. 2001. First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie* **32**: 49-55.

Steiner, J.; Diehl, P. A. e Vlimant, M. 1995. Vitellogenesis in *Varroa jacobsoni*, a parasite of honey bees. *Experimental and Applied Acarology* **19**: 411-422.

Stone, M.; McKenzie, L. e Parsot, G. 2000. Exotic bee disease confirmed in South Auckland. <http://www.maf.govt.nz/MAFnet/press/110400bee.htm>. Visitada em 07/03/2003.

Szczesna, T. e Rybac-Chmielewska, H. 2003. Study of a polipeptide component from honey bee venom *Apis mellifera* L. by RP-HPLC. In: Proceedings of the XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia. pp 240-241.

Taber, S. 1982. Bee behavior. Determining resistance to brood diseases. *American Bee Journal* **122**: 422-425.

Taber, S. e Gilliam, M. 1987. Test for resistance to chalkbrood disease, *Ascosphaera apis*, of honeybees. In: The XXXIst International Congress of Apiculture, Warsaw, Poland. pp 145-148.

Taber, S. 1998. Resistance to disease. *American Bee Journal* **138**: 47-48.

Thompson, V. C. 1964. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. *Journal of Apicultural Research* **3**: 25-30.

Thompson, H. E.; Brown, M. A.; Ball, R. F. e Bew, M. H. 2002. First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the U.K. *Apidologie* **33**: 357-366.

Titera, D. e Kokkoris, J. 1994. Effect of the microinjections into the brood cells on the opening and cleaning behaviour of honeybees. *Apidologie* **25**: 503-504.

Trouiller, J. 1998. Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in Western Europa. *Apidologie* **29**: 537-549.

Trouiller, J. 2001. Monitoring *Varroa* resistance to pyrethroids (1994-2001). *Bee Craft*: 15-17.

Trouiller, J. e Watkins, M. 2001. Experimentation on Apiguard - a controlled realise gel of thymol against honeybee diseases. In: Proceedings of the 37th International Apicultural Congress, Durban, South Africa

Trump, R. F.; Thompson, V. C. e Rothenbuher, W. C. 1967. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees V. Effect of previous experience and composition of mixed colonies on response to disease-killed brood. *Journal of Apicultural Research* **3**: 25-30.

Vandame, R. 1996. Importance de l'hybridation de l'hôte dans la tolérance à un parasite. Cas de l'acararien parasite *Varroa jacobsoni* chez les races d'abeilles *Apis mellifera* européenne et africanisée, en clima tropical humide du Mexique. PhD Thesis, Institut d'Analyse des Systèmes Biologiques et Socio-économiques, Lyon, France.

Vandame, R.; Colin, M. e Colina, G. O. 1998. Abejas europeas y abejas africanizadas en México: la tolerancia a *Varroa jacobsoni*. <http://www.apiservices.com/articulos/vandame/index.htm>. Visitada em 25/02/2003.

Vandame, R.; Colin, M.; Morand, S. e Otero-Colina, G. 2000. Levels of compatibility in a new hos-parasite association: *Apis mellifera/Varroa jacobsoni*. *Canadian Journal of Zoology* **78**: 2037-2044.

Vespa, C. 2004. Serious results. <http://www.chlopan.com/> Visitada em 22/10/2005.

Wallner, K. 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* **30**: 235-248.

Wilkes, K. e Oldroyd, B. P. 2002. Breeding hygienic disease resistant bees. US-39A, Rural Industries Research & Development Corporation (RIRDC), Sydney, Australia.

William, B. 2003. Marketing apitherapy products and the challenge of government regulation. In: Proceedings of the XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia, 24-29 August 2003. pp 148-149.

Wilson, E. O. 1985. The sociogenesis of insect colonies. *Science* **228**: 1489-1495.

Winston, M. 1987. The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, London, England.

Witherell, P. C. 1972. Flight activity and natural mortality of normal and mutant drone honeybees. *Journal of Apicultural Research* **11**: 65-75.

Woyke, J.; Wilde, J. e Reddy, C. C. 2004. Open-air-nesting honey bees *Apis dorsata* and *Apis laboriosa* differ from the cavity-nesting *Apis mellifera* and *Apis cerana* in brood hygienic behaviour. *Journal of Invertebrate Pathology* **86**: 1-6.

Zhang, Z.-Q. 2000. Notes on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) parasitic on honeybees in New Zealand. *Systematic & Applied Acarology Special Publications* **5**: 9-14.

## Capítulo 3

# Comportamento higiénico de colónias de abelhas *A. mellifera* de origem portuguesa como um mecanismo de tolerância à varroose

---

### 3.1. Introdução

As colónias de abelhas melíferas são susceptíveis a várias patologias que reduzem e/ou anulam a sua produtividade.

As abelhas melíferas têm mecanismos de defesa naturais contra as patologias apícolas, sendo de destacar, entre estes, o comportamento higiénico. O conceito de comportamento higiénico tem sido utilizado para descrever um processo que envolve duas componentes, e que é executado por algumas obreiras após a detecção de larvas ou pupas, doentes ou mortas, nos quadros de criação. A primeira componente deste processo é a desoperculação (a eliminação, quando existente, da cobertura de cera que reveste os alvéolos) dos alvéolos de criação, seguida pela remoção dos corpos existentes no seu interior (Spivak e Gilliam, 1998a, b; Spivak e Reuter, 2005).

Um dos métodos mais efectivos para avaliar o comportamento higiénico é o método de morte da criação por congelação. A sua aplicação em colónias de abelhas

melíferas é uma das fases prévias frequentemente implementadas em programas de selecção. Estes programas utilizam o comportamento higiénico como um dos principais factores de tolerância às principais patologias apícolas, contribuindo, desta forma, para a redução de focos infecciosos, para menores níveis de infestação com varroa e para assim incrementar assim o potencial produtivo das colónias.

Vários trabalhos experimentais demonstraram que as colónias que manifestam um elevado comportamento higiénico aumentam a sua resistência à Loque Americana (*P. larvae*) e à Ascosferiose (*A. apis*) (Palacio *et al.*, 2000; Spivak e Reuter, 2001). No que diz respeito à varroose, após a maior disponibilidade comercial e maior receptividade de muitos apicultores por rainhas de várias linhas higiénicas, começam a surgir resultados que demonstram que o comportamento higiénico poderá ser também, um mecanismo de tolerância relativo à varroose (Spivak 1996; Rinderer *et al.*, 1999; Wilkes e Oldroyd, 2002; Spivak e Reuter, 2005). No capítulo 1 foi referido que o ácaro *V. destructor* é a principal causa de morte das colónias em Portugal. Por isso, o sector apícola nacional tem sentido a necessidade de criar novas estratégias de maneio, que permitam colmatar os graves problemas sanitários, que conduzem ao desenvolvimento de patologias, principalmente da varroose.

Razão pela qual, é importante desenvolver metodologias que permitam contribuir para o seu controlo, de forma a minimizar as perdas económicas resultantes das mesmas.

Vários testes têm sido descritos e utilizados para quantificar o comportamento higiénico de uma colónia, como descrito anteriormente no Capítulo 2. Este comportamento é avaliado de acordo com a rapidez exibida por uma colónia para limpar uma amostra de criação morta ou doente.

O teste utilizado na realização deste trabalho consistiu na morte da criação por congelação, baseado na metodologia desenvolvida por Gonçalves e Kerr (1970). Esta metodologia foi escolhida, pois trata-se de uma metodologia relativamente expedita e de fácil utilização pelos apicultores comparativamente às restantes.

Neste âmbito, seria de grande interesse estudar, a evolução da resposta higiénica de populações de abelhas melíferas portuguesas, ao longo do ano, entre as diferentes estações de maior labor apícola. Pretende-se, assim, determinar se o comportamento higiénico é um componente de tolerância, que permita às colónias higiénicas, sem

selecção prévia, manter alguma uniformidade em condições normais de produção. Dado que o uso de abelhas identificadas e, posteriormente, seleccionadas para manifestar um eficiente comportamento higiénico, aparece como uma alternativa no controlo desta patologia.

O objectivo geral deste estudo foi o de observar se entre as colónias de abelhas melíferas portuguesas também existem colónias com elevado comportamento higiénico. Em caso afirmativo, estas poderão ser usadas posteriormente para melhorar colónias de abelhas de elevados níveis de comportamento higiénico, como um dos mecanismos de tolerância às patologias apícolas. Para atingir o objectivo geral anteriormente referido foi necessário:

1) Analisar as inter-relações entre a desoperculação média dos alvéolos e a remoção média da criação morta efectuada pelas colónias, nos distintos períodos de controlo efectuados e nas diferentes estações do ano (Estudo 1).

2) Analisar as inter-relações entre a remoção média da criação morta pelas colónias, para identificar qual o período de observação em que poderíamos encontrar maiores diferenças entre colónias na manifestação do comportamento higiénico.

3) Identificar, a partir da resposta obtida ao teste de limpeza aplicado, o perfil higiénico de cada colónia, de forma à sua classificação por nível de higiene (colónias higiénicas e não higiénicas) (Estudo 1), para comparação com outros tipos de métodos que se analisarão no Capítulo 4.

4) Analisar a evolução do perfil comportamental manifestado pelas colónias higiénicas, e não higiénicas (às 24 horas) por ano e entre anos. Comprovar se existem diferenças por estações do ano, em cada ano e entre anos. No sentido de determinar se existe alguma consistência na manifestação do comportamento higiénico pelas mesmas colónias entre os diferentes anos (Estudo 2).

### 3.3. Material e métodos

Este trabalho inclui dois estudos. No Estudo 1, foram examinadas diferentes colónias para quantificar o seu comportamento higiénico, em diferentes estações (Primavera, Verão e Outono) do ano civil de 2001. Para tal foi utilizado um teste baseado na morte de criação de obreira por congelação.

No Estudo 2, que decorreu em 2002 e 2003, foi analisada a resposta das colónias (agrupadas por nível de higiene), ao teste aplicado, de forma a estudar a sua evolução por estações do ano, em cada ano e entre anos.

O presente estudo foi realizado no apiário da ESAB entre os meses de Maio a Outubro dos anos civis de 2001, 2002 e 2003 (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Apiário experimental da ESAB

No Estudo 1 foram utilizadas 12 colónias nas quais foram realizados 3 ensaios: um na Primavera, um no Verão e outro no Outono de 2001. Todas as rainhas nasceram em 2001 e foram marcadas de acordo com o Código Internacional de Cores.



No Estudo 2 foram realizados 6 ensaios, distribuídos também pela Primavera, Verão e Outono. Neste caso, utilizaram-se 8 colónias em 2002 e 8 colónias em 2003.

Todas as colónias estavam alojadas em colmeias de modelo Langstroth, com 10 quadros por ninho, com estrados adaptados para a recolha de ácaros, e mantidas no sistema tradicional de produção (Figura 3.2). Todas as colónias derivaram de enxames locais com rainhas acasaladas naturalmente.



**Figura 3.2.** Pormenor do modelo de colmeias (Langstroth) existentes no apiário com estrados para a recolha de ácaros

O maneo das colónias foi conservador (isto é, não se aplicaram estratégias de intensificação de produções). Além disso, houve uma grande preocupação no sentido de prevenir o processo de enxameação durante Primavera. Para esse efeito foram consideradas essencialmente duas medidas. A primeira visou o corte da extremidade das asas anteriores das rainhas, de forma a evitar que estas levarem voo com os seus respectivos enxames, procedimento este que ocorreu momentos após a sua marcação. A segunda medida teve como princípio aumentar o espaço disponível para a postura da rainha e armazenamento de reservas, ao nível das colónias, este procedimento foi efectuado, aproximadamente, duas semanas antes da sua possível necessidade.

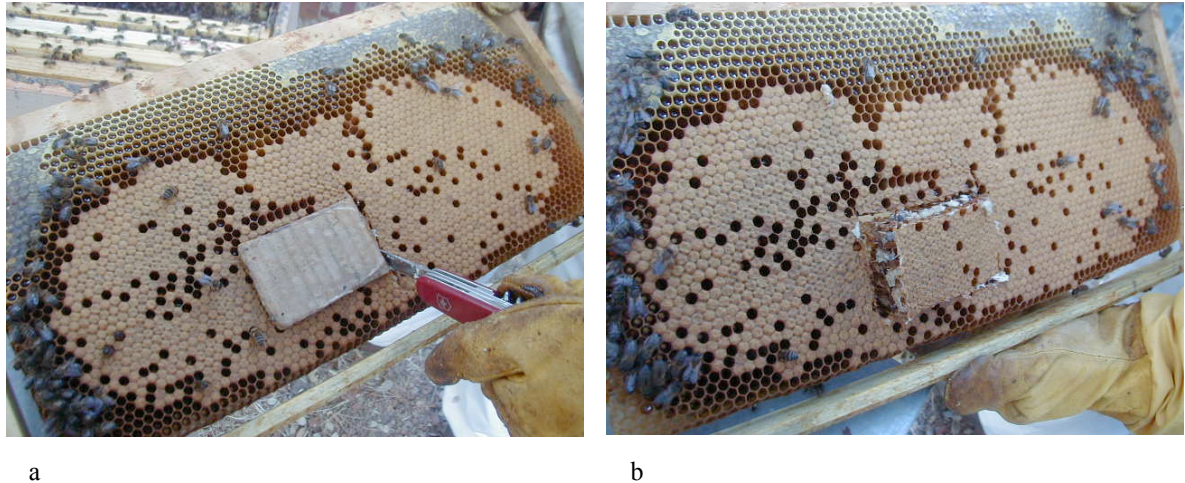
No início da Primavera dos anos de 2001, de 2002 e de 2003 foram realizados tratamentos preventivos para redução do crescimento populacional das varroas. Neste sentido, todas as colónias foram tratadas com duas tiras de Apistan® (Fluvalinato, 800 mg por tira), após a quantificação prévia dos respectivos graus de infestação com varroa. O grau de infestação foi determinado em abelhas adultas, segundo o método adoptado por Vandame (1996).

Antes do início de cada ensaio, ou seja, na Primavera, não foram praticamente detectados ácaros em nenhuma das colónias. No entanto, com o decurso do tempo ocorreu a reinfestação de todas as colónias, devido a causas naturais (tais como a deriva e a pilhagem entre colónias).

### **3.3.2. Avaliação do comportamento higiénico**

O comportamento higiénico tem sido definido como o tempo necessário para uma colónia detectar, desopercular e remover uma secção de favo de 7 cm × 6,5 cm com crias de obreiras, no estado de pupas, mortas por congelação. Neste trabalho a idade da criação foi estimada visualmente de acordo com a metodologia proposta por Rembold *et al.* (1980). A criação utilizada encontrava-se no estado de pupas, brancas com olhos pigmentados, vermelho acastanhado, 7 dias pós operculação.

Assim, foram seleccionados quadros de criação típicos com reservas de pólen e mel nos extremos, e com uma área de criação que compreendia aproximadamente dois terços de criação de obreira operculada e um terço de criação aberta. A proporção de criação referida era respeitada sempre que possível. Porém, em casos extremos, o máximo da relação entre a criação operculada e a criação aberta foi de 1:0 e o mínimo foi de 1:1). Cada secção de favo, contendo aproximadamente 140 pupas em cada lado, foi cortada (Figura 3.3 a e b) e colocada em sacos de plástico com a identificação da colmeia, hora e data de colheita (Figura 3.4 a).



**Figura 3.3.** Marcação e corte da secção de favo (a) e remoção da secção cortada (b)

Após a colheita, as secções de favo foram transportadas para o laboratório e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (Figura 3.4 b), tal como o proposto por Taber (1982), Spivak e Gilliam (1993), Spivak (1996), Woyke *et al.* (2004) e Spivak e Reuter (2005). Após este período, as secções de favo foram retiradas do congelador e descongeladas à temperatura ambiente, durante aproximadamente 6 horas Gonçalves e Kerr (1970), antes de serem novamente colocadas nas respectivas colónias.



**Figura 3.4.** Acondicionamento e identificação das amostras (a) e sua congelação (b)

Contavam-se directamente os alvéolos operculados nas secções de favo seleccionadas para o estudo do comportamento higiénico. A criação não foi anotada como removida, se o alvéolo estava desoperculado mas ainda restava alguma parte da criação morta no interior do mesmo.

O comportamento higiénico total (CHT) e o comportamento higiénico parcial (CHP) foram determinados, em cada período de observação, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$CHT = \frac{x - y - z}{x} \times 100 \text{ e } CHP = \frac{x - y}{x} \times 100, \text{ onde}$$

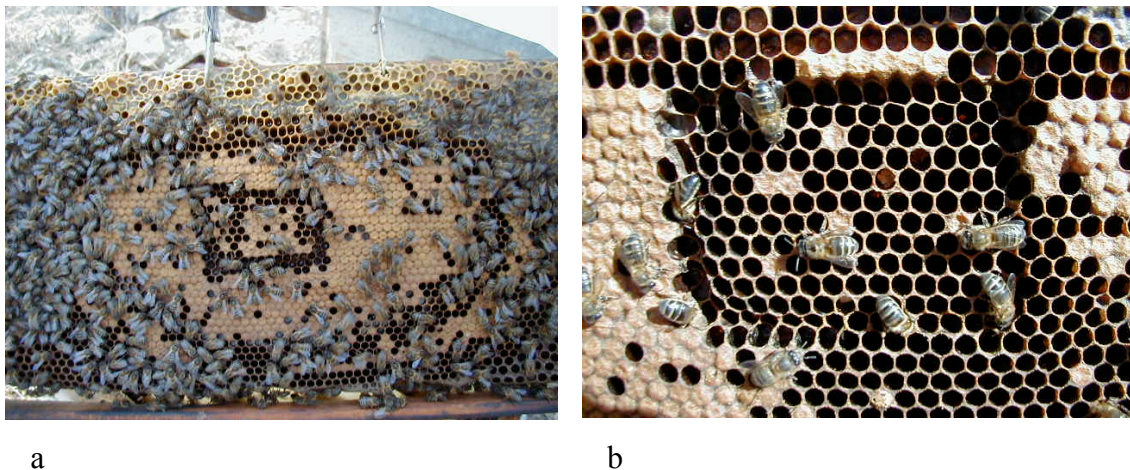
(x) = número total de alvéolos operculados inicialmente, em cada uma das secções de favo;

(z) = número de alvéolos totalmente desoperculados com criação morta;

(y) = o número total de alvéolos que permaneciam operculados.

Para tal foram utilizadas folhas de acetato que foram marcadas com diferentes cores (uma para cada período de observação) e diferentes símbolos (para identificar a operculação, desoperculação e remoção). Desta forma, o CHT e o CHP foram quantificados usando os valores registados em cada período de observação.

O tempo necessário para a remoção da criação morta por congelação foi considerado como uma medida da habilidade das abelhas para detectar, desopercular e remover a criação morta (Figura 3.5 a e b).



**Figura 3.5.** Resposta higiénica das colónias à secção de favo com criação morta às 24 horas (a) e às 48 horas (b)

As colónias foram agupadas em dois níveis de higiene: higiénicas (H) e não higiénicas (NH), segundo o valor médio do comportamento higiénico total (CHT) manifestado nos ensaios realizados no primeiro ano de estudo (2001), em função dos

distintos períodos de controlo (24, 48, 96 e 168 horas). As colónias foram consideradas higiénicas quando limpavam uma percentagem média igual ou superior a 80% de criação morta ( $CHT \geq 80\%$ ), às 24 horas, em ambos os lados da secção do favo, no total dos três ensaios efectuados em 2001. As colónias foram consideradas não higiénicas quando, no mesmo período de tempo e para o mesmo período de observação, foi registado um valor médio percentual inferior a 80% ( $CHT < 80\%$ ) seguindo a classificação proposta por Gonçalves e Kerr (1970) e Palacio *et al.* (2000).

### 3.3.3. Métodos de análise estatística

A análise estatística dos resultados do teste de morte da criação por congelação foi efectuada através do software SAS (1998).

Para a comparação múltipla entre os valores médios da percentagem de desoperculação e remoção nos diferentes períodos de observação e por estação do ano utilizou-se a análise de variância não paramétrica com o procedimento NPAR1WAY, tendo-se previamente testado a normalidade da distribuição (teste W de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). Como as variáveis não satisfizeram os pressupostos da análise de variância, mesmo depois de ensaiadas várias transformações, as médias foram comparadas pelo teste não paramétrico de Friedman. As diferenças das médias de remoção entre os períodos de observação e entre estações foram comparadas duas a duas, utilizando o teste Wilcoxon Matched Pairs (Estudo 1)

Para a comparação múltipla entre as percentagens médias de remoção, por nível de higiene e por estação do ano, nos diferentes períodos de observação, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis. As médias do comportamento higiénico por grupo, foram comparadas duas a duas, utilizando o teste de Mann-Whitney.

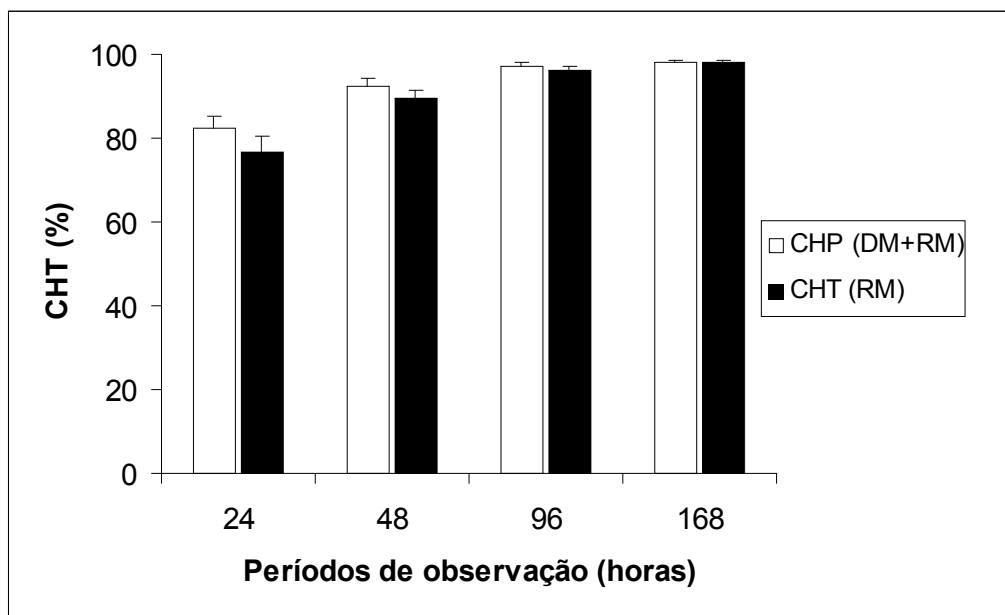
A avaliação da associação entre as duas componentes do comportamento higiénico (desoperculação e remoção), nos diferentes períodos de observação, foi obtida pelo coeficiente de correlação de Spearman's.

### 3.4. Resultados

#### 3.4.1. Estudo 1 – Resposta higiénica das colónias à introdução duma secção de favo com criação de obreira morta nos ensaios realizados em 2001

Na Figura 3.6 constam as percentagens médias gerais registadas para as duas componentes do comportamento higiénico, por período de observação em 2001.

**Figura 3.6. Estudo 1** – Valores observados (média  $\pm$  erro padrão da média, %) para o CHP (total de alvéolos desoperculados) e para o CHT (total de alvéolos desoperculados e respectivas pupas removidas), registados por período de observação, no total das colónias estudadas e nas diferentes estações do ano 2001 (n=36).



**Figura 3.6. Estudo 1** – Valores observados (média  $\pm$  erro padrão da média, %) para o CHP (total de alvéolos desoperculados) e para o CHT (total de alvéolos desoperculados e respectivas pupas removidas), registados por período de observação, no total das colónias estudadas e nas diferentes estações do ano 2001 (n=36).

O comportamento higiénico parcial, correspondendo à desoperculação dos alvéolos com criação morta por congelação, apresentou valores médios que variaram entre 82,2% às 24 horas e 98,3% às 168 horas. No que respeita à percentagem média de remoção da criação morta, esta variou entre 76,8% às 24 horas e 97,9% às 168

horas. Apesar de não se apresentarem dados relativos às observações para além das 168 horas, recolheu-se informação que permite afirmar que, em algumas colónias, foram necessárias 336 horas para a remoção total da criação morta, em todos os alvéolos de ambos os lados das secções de favos amostradas.

Note-se a semellhança do padrão de variação entre os dois comportamentos manifestados pelas obreiras (CHP e CHT) por período de observação. No entanto, esta variação foi mais evidente nas observações realizadas às 24 horas, principalmente para o comportamento higiénico total.

Assim, no sentido de analisar as inter-relações entre os valores médios dos comportamentos manifestados pelas colónias, foram calculados os coeficientes de correlação entre as percentagens médias de desoperculação e de remoção total da criação morta por congelação, por período de observação (24, 48, 96 e 168 horas), bem como entre o valor médio do comportamento higiénico total nos mesmos períodos de observação, em 2001 (Quadro 3.1).

**Quadro 3.1.** Estudo 1 – Coeficientes de correlação entre o nível de desoperculação total (CHP) e o nível de remoção total (CHT) de criação morta por congelação, por período de observação obtido em 2001.

	CHP24	CHP48	CHP96	CHP168
CHT24	0,957***			
CHT48		0,960***		
CHT96			0,941***	
CHT168				0,985***
	CHT24	CHT48	CHT96	
CHT48	0,925***			
CHT96	0,715***	0,776***		
CHT168	0,630***	0,701***	0,902***	

r = Coeficiente de correlação de Spearman; \*\*\* - Significativo para 0,001.

Os coeficientes de correlação obtidos entre as duas componentes do comportamento higiénico nos distintos períodos de controlo foram elevados e positivos. Às 24 horas as duas componentes do comportamento higiénico apresentaram correlações elevadas e positivas entre si (0,957;  $P < 0,001$ ), indicando que quanto maior é a percentagem média total de alvéolos desoperculados, maior é a percentagem média de

remoção da criação morta. Este aspecto é especialmente evidente às 168 horas, com uma correlação elevada e positiva entre as duas componentes do comportamento higiénico (0,985;  $P < 0,001$ ).

Por outro lado, observaram-se também correlações elevadas e positivas entre a remoção média total das crias mortas por congelação e os distintos períodos de controlo efectuados (todas superiores a 0,630) (Quadro 3.2). Salientou-se o elevado coeficiente de correlação entre o nível médio de remoção de criação morta entre as 24 e as 48 horas (0,925;  $P < 0,001$ ), indicando que as colónias que manifestam uma elevada capacidade higiénica às 24 horas também a manifestam às 48 horas. Desta forma, o período de observação das 24 horas revela-se aparentemente mais indicado para a classificação das colónias por níveis de higiene.

No Quadro 3.2 apresenta-se a remoção média, o mínimo e o máximo da criação morta nos diferentes períodos de controlo e no total de colónias testadas entre estações, no ano de 2001.

**Quadro 3.2.** Estudo 1 – Valores observados (média  $\pm$  erro padrão da média, mínimo e máximo; %) do CHT (total de alvéolos desoperculados e pupas removidas), registados por período de observação entre as estações do ano de 2001 (n=12).

CHT	Média	Epm	Mínimo	Máximo
Primavera				
24 horas	68,9	6,90	35,90	99,62
48 horas	85,2	4,90	49,18	100,00
96 horas	95,5	2,27	77,57	100,00
168 horas	97,9	1,11	89,71	100,00
Verão				
24 horas	81,3	4,32	54,44	100,00
48 horas	92,3	2,80	77,82	100,00
96 horas	96,0	1,50	86,69	100,00
168 horas	97,8	0,97	91,13	100,00
Outono				
24 horas	80,3	6,45	29,07	100,00
48 horas	90,3	3,69	68,99	100,00
96 horas	96,64	1,48	87,21	100,00
168 horas	98,2	0,98	91,86	100,00

Nota: Para um dado período de observação não existem diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre estações.

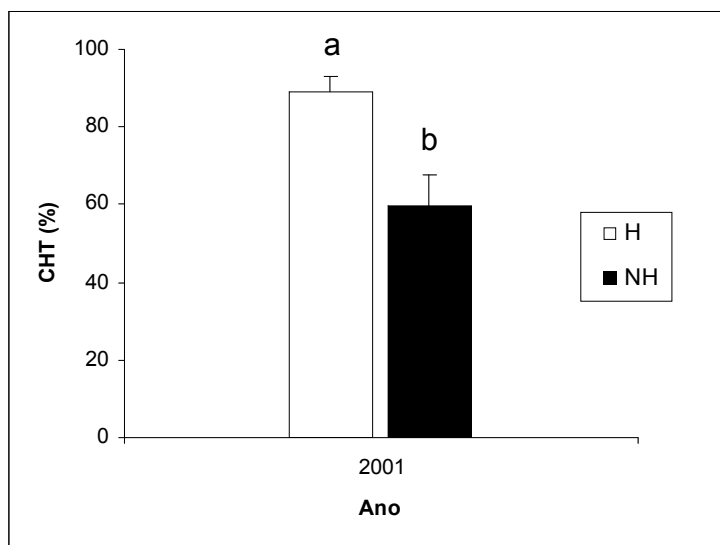
Às 24 horas, a percentagem média de limpeza das 12 colónias foi de 68,9% na Primavera, 81,3% no Verão e de 80,3% no Outono. Foi no período de observação das 24 horas que as colónias apresentaram uma maior variação na sua resposta à remoção



da criação morta, entre as diferentes estações do ano. Considerando o mesmo período de observação, a Primavera e o Outono são as estações do ano em que a resposta higiénica entre colónias apresentou uma maior variação. No entanto, em períodos de registo iguais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre a resposta higiénica das 12 colónias às estações do ano.

Assim, e apesar dos registos se efectuarem em distintos períodos de controlo, consideramos que as observações efectuadas às 24 horas são as que melhor reflectem a eficiência do teste de limpeza aplicado, segundo o critério de selecção do comportamento higiénico anteriormente definido. Este pressuposto fundamenta-se numa maior variação da percentagem média do comportamento higiénico total manifestado entre as várias colónias. Além disso, as colónias que manifestam um elevado comportamento higiénico às 24 horas também o manifestam às 48 horas, possibilitando a avaliação deste comportamento num menor período de tempo.

Assim, as colónias foram agrupadas por níveis de higiene em função do perfil comportamental manifestado e registado no período correspondente às 24 horas (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Estudo 1 – Valores observados (média  $\pm$  erro padrão da média, %) em termos de comportamento higiénico total de sete colónias classificadas como higiénicas (H) e cinco como não higiénicas (três testes efectuados em cada colónia em 2001). a, b – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,001$ ).

Com base nos resultados do comportamento higiénico total foram classificadas como higiénicas (H) 7 colónias, uma vez que, todas elas removeram mais do que 80%

de criação morta por congelação às 24 horas. Cinco colónias foram consideradas não higiénicas (NH), uma vez que todas elas removeram menos do que 80 % de criação morta nas primeiras 24 horas. As diferenças médias observadas entre as colónias H (89,0%) e NH (59,8%) foram estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ). Neste período de observação, o perfil higiénico parece ainda ter sido relativamente mais homogéneo entre as colónias higiénicas (por comparação com as colónias não higiénicas), sugerindo uma maior variabilidade na manifestação deste comportamento entre as colónias não higiénicas.

### 3.4.2. Estudo 2 – Relação entre a percentagem média de remoção da criação de obreira morta por congelação em colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) por anos e entre anos

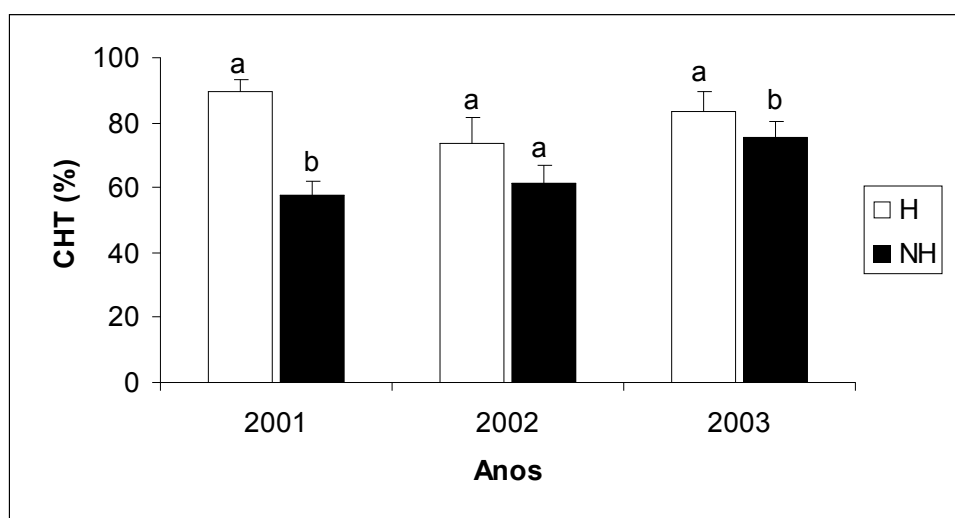
#### 3.4.2.1. Comparação da resposta higiénica de colónias H e NH, em cada ano

Em 2002 e 2003, foram novamente efectuados os testes do comportamento higiénico (na estação da Primavera, Verão e Outono) nas mesmas colónias avaliadas em 2001, no sentido de analisar a evolução deste comportamento ao longo do tempo.

Desta vez, utilizou-se apenas o período de observação das 24 horas, por ter sido considerado (ver secção anterior) que este era o mais efectivo para a classificação das colónias por nível de comportamento higiénico.

Além disso, para comparar respostas comportamentais entre anos, apenas se utilizaram 8 colónias por grupo (H e NH), sendo estas as que aparentemente mantiveram as mesmas rainhas ao longo deste triénio. Assinale-se, ainda assim, as expectáveis flutuações ao nível do “pool” genético paternal, resultantes do sistema de acasalamento natural das rainhas.

A Figura 3.8 mostra o perfil comportamental entre as colónias H e NH, às 24 horas, por ano de estudo.



**Figura 3.8.** Estudo 1 – Valores observados (média  $\pm$  erro padrão da média, %) do comportamento higiénico total manifestado pelas 4 colónias higiénicas (H) e 4 não higiénicas (NH) (três testes efectuados a todas as colónias, por ano de estudo). <sup>a, b</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

Em 2001, a percentagem média do comportamento higiénico total obtido para as colónias H, foi maior em cerca de 32,0% do que a percentagem média obtida para as colónias NH, sendo as diferenças observadas entre os dois níveis de higiene estatisticamente significativas ( $P < 0,001$ ).

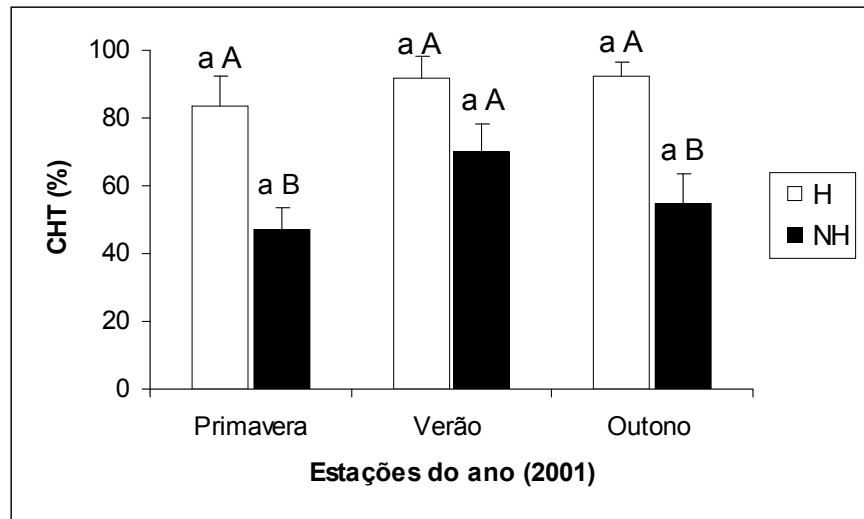
Comparativamente a 2001, em 2002, observou-se um menor nível de comportamento higiénico nas colónias H (73,8%), e mais próximo do observado nas colónias NH (61,2%). Possivelmente, devido à variabilidade manifestada entre as colónias de cada nível (com um erro padrão de 7,84 e 5,45, respectivamente por colónias H e NH) na resposta à percentagem de remoção da criação morta por congelação não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre os dois grupos de colónias. Esta maior variabilidade poderá estar relacionada com o facto de algumas colónias classificadas como higiénicas não terem mantido este padrão comportamental ao longo deste ano e, desta forma, terem contribuído para uma diminuição da expressão geral deste comportamento nesse nível de higiene. Associada a esta diferenciação comportamental entre colónias, poderá ter estado a composição genética das subpopulações de obreiras que nasceram neste ano, em cada colónia, resultantes de rainhas que não foram previamente pré-seleccionadas para esta característica e que acasalaram livremente. Portanto, sem o controlo prévio de linhas maternas e paternas, situação esta característica em apiários mantidos em sistemas de produção tradicional.

Em 2003, o padrão de variação do comportamento higiénico total registado entre as colónias higiénicas e não higiénicas foi semelhante ao verificado em 2001. Ainda assim, as colónias H limpam 83,7% de criação morta por congelação às 24 horas, correspondendo a mais 8 pontos percentuais comparativamente às colónias NH (75,7%). As diferenças observadas na remoção total da criação morta por congelação foram estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre colónias H e NH, provavelmente devido também a uma menor variabilidade manifestada neste ano entre os grupos de colónias H e NH. Ainda que, tendencialmente, tenha existido um padrão comportamental semelhante ao longo de todo o período de estudo, não se ignoram algumas limitações inerentes a este tipo de estudo, nomeadamente a possibilidade de as colónias estudadas em 2002 e 2003 não serem exactamente as mesmas (isto é,

representarem proporções diferentes das várias linhas paternas) que foram estudadas em 2001. Isto, apesar da sua marcação e de outras medidas consideradas indicadas (por exemplo, corte de asas e medidas de manejo para prevenção/controlo da enxameação).

### 3.4.2.2. Respostas anuais das colónias H e NH entre estações do ano

Em 2001, o padrão de variação do comportamento higiénico total, foi tendencialmente semelhante entre as diferentes estações do ano quer para colónias H, quer para NH (Figura 3.9).



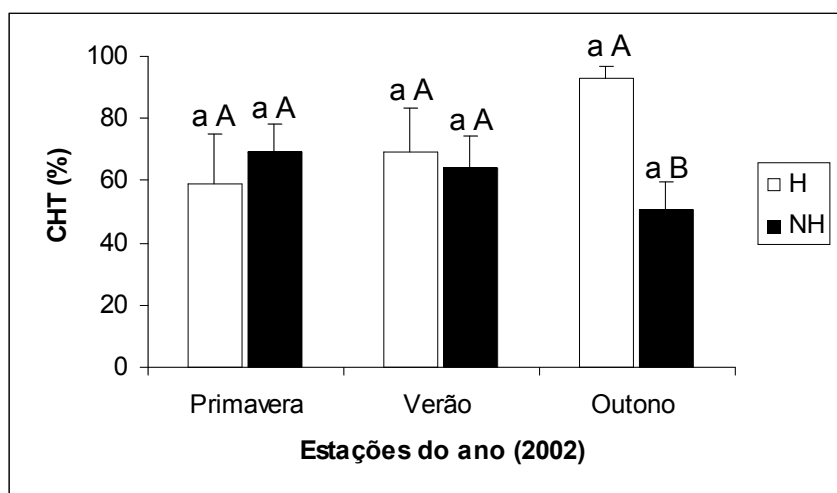
**Figura 3.9.** Estudo 2 – Valor médio de comportamento higiénico total observado às 24 horas (média  $\pm$  erro padrão da média, %) em 4 colónias higiénicas (H) e 4 não higiénicas (NH), entre estações do ano de 2001. <sup>A, B</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>a, b</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras minúsculas iguais, não são estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

No ano de 2001, as colónias H apresentaram uma percentagem média de CHT significativamente mais elevada ( $P < 0,05$ ) na Primavera ( $83,7 \pm 8,58\%$ ) e no Outono ( $92,6 \pm 3,88\%$ ) do que as colónias NH ( $47,3 \pm 5,94\%$  e  $54,7 \pm 8,67\%$ , respectivamente), não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) no Verão, entre estes dois grupos de colónias (Figura 3.9).

Deve referir-se ainda que, por nível de higiene, observou-se globalmente em 2001 uma diferenciação estatisticamente não significativa ( $P > 0,05$ ) entre as três estações do ano. De facto, as colónias H mantiveram níveis elevados e relativamente uniformes de

comportamento higiénico entre a Primavera, Verão e o Outono. Têndencia semelhante foi observada nas colónias NH que mantiveram globalmente muito menores níveis de higiene (e mais variáveis entre estações). Deste modo, o comportamento manifestado pelas colónias esteve em correspondência com o respectivo padrão para cada nível de higiene e, neste pressuposto, o efeito “estação do ano”, não aparenta ser dominante, possibilitando a avaliação das colónias através deste teste em qualquer uma destas estações do ano.

No período de estudo correspondente ao ano 2002, as diferenças globais nos níveis médios de comportamento higiénico entre colónias H e NH foram menos acentuados (do que em 2001) e estiveram associados a uma variabilidade consideravelmente superior em cada um dos dois grupos de colónias (H e NH) (Figura 3.10).



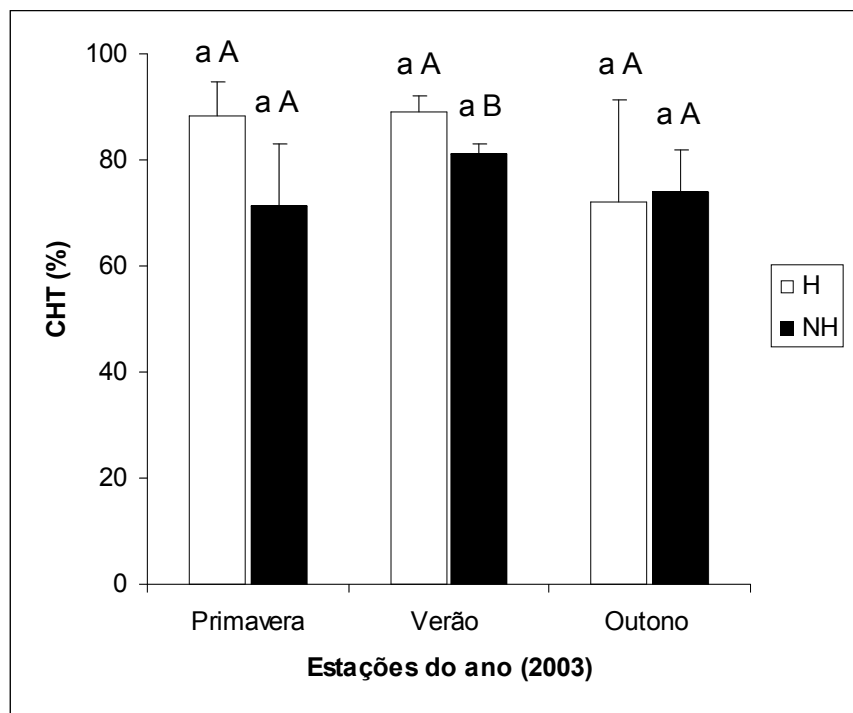
**Figura 3.10.** Estudo 2 – Valor médio de comportamento higiénico total observado às 24 horas (média  $\pm$  erro padrão da média, %) em 4 colónias higiénicas (H) e 4 não higiénicas (NH), entre estações do ano de 2002. <sup>A, B</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>a, b</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras minúsculas iguais, não são estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

As diferenças na percentagem média do comportamento higiénico total, observado entre as colónias H e NH (93,0 e 50,5%, respectivamente), só foram acentuadamente mais elevadas e estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ), no Outono de 2002. Saliente-se, porém, que a Primavera e o Verão foram as estações do ano em que se verificou uma maior variabilidade associada à expressão deste comportamento dentro e entre grupos de colónias (H e NH). De facto, o grupo de colónias H chegou a

apresentar (na Primavera) uma percentagem média de remoção (59,0%), inferior à observada no grupo das colónias NH (69,2%), o que significa que algumas destas colónias não mantiveram os elevados padrões de comportamento higiénico associado a este nível de higiene.

Quer as colónias H, quer as colónias NH manifestaram níveis semelhantes (e estatisticamente não significativos,  $P > 0,05$ ) de comportamento higiénico ao longo das diferentes estações do ano. Para esta situação poderá ter contribuído decisivamente a elevada variabilidade observada na expressão deste comportamento entre as colónias de cada nível de higiene.

Globalmente, o perfil higiénico manifestado pelas colónias H e NH, durante 2003 revelou-se tendencialmente superior ao observado em anos anteriores (Figura 3.11).



**Figura 3.11.** Estudo 2 – Valor médio de comportamento higiénico total observado às 24 horas (média  $\pm$  erro padrão da média, %) em 4 colónias higiénicas (H) e 4 não higiénicas (NH), entre estações do ano de 2003. <sup>A,B</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>a,b</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras minúsculas iguais, não são estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

Globalmente, as percentagens médias relativas à resposta higiénica foram mais elevadas nas colónias H. Todavia, na Primavera e no Outono devido, possivelmente, a uma maior variação na expressão deste comportamento em colónias H e NH, não se

verificaram diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre estes dois grupos de colónias. Ao contrário, no Verão, as colónias H manifestaram uma capacidade de limpeza ligeiramente superior (88,9%) e estatisticamente significativa ( $P<0,05$ ) relativamente às NH (81,3%), possivelmente associada a uma menor variabilidade na expressão deste comportamento por nível de higiene.

Salienta-se ainda que, por nível de higiene, em 2003 observou-se globalmente um padrão de variação nos níveis de comportamento higiénico, sem uma diferenciação estatisticamente significativa ( $P>0,05$ ) entre as três estações do ano.

### 3.4.2.3. Comparação da resposta higiénica das colónias H e NH, entre anos

No Quadro 3.3 encontram-se as percentagens médias (média  $\pm$  erro padrão da média, %) do comportamento higiénico total, observado às 24 horas, no total de colónias testadas por nível de higiene entre anos.

**Quadro 3.3.** Estudo 2 – Nível global do comportamento higiénico total observado às 24 horas (média  $\pm$  erro padrão da média, %), relativo ao número total de colónias testadas nos 3 anos de estudos (n=12).

CHT	Ano	Média	Epm
Colónias H	2001	89,3	3,62 a
	2002	73,8	7,84 a
	2003	83,7	5,85 a
Colónias NH	2001	57,4	4,88 a
	2002	61,2	5,45 a
	2003	75,7	4,52 b

a, b – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras diferentes diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ).

Nas colónias H, apesar do nível de comportamento higiénico ter sido mínimo no ano de 2002 (73,8%, inclusivamente aquém do limite mínimo de 80% inicialmente considerado para a sua classificação como colónias H), as diferenças entre os três anos de estudo não foram estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). Provavelmente devido ao elevado erro padrão associado ao comportamento revelado pelas colónias no ano 2002.

Contrariamente, nas colónias NH, os níveis médios de comportamento higiénico total foram mais elevados nos dois últimos anos, sendo as diferenças registadas na



remoção total de criação morta por congelação estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre 2001 e 2002 *versus* 2003. Isto significa que aparentemente houve, uma grande variação nos níveis de comportamento higiénico manifestado por algumas colónias, que em face de uma nova reclassificação poderiam transitar dos grupos H e NH definidos com base nos resultados de 2001.

#### 3.4.2.4. Resposta higiénica das colónias H e NH entre estações de anos diferentes (2001 a 2003)

O padrão de variação do comportamento higiénico total manifestado pelas colónias higiénicas e não higiénicas para cada uma das estações do ano em que se efectuaram os testes foi semelhante entre os diferentes anos em que ocorreu este estudo (Quadro 3.4).

**Quadro 3.4.** Estudo 2 – Nível médio (média  $\pm$  erro padrão da média, %) de comportamento higiénico total observado às 24 horas, por nível de higiene, por estação do ano e entre anos (n=4).

CHT	Ano	Primavera		Verão		Outono	
		Média	Epm	Média	Epm	Média	Epm
Colónias H	2001	83,7	8,58	91,7	6,32	92,6	3,88
	2002	59,0	15,95	69,3	14,35	93,0	3,66
	2003	88,3	6,92	88,9	3,02	72,2	19,00
Colónias NH	2001	47,3	5,94	70,1	7,87	54,7	8,67
	2002	69,2	9,21	64,0	10,12	50,5	8,81
	2003	71,5	11,60	81,3	1,65	73,8	8,14

Nota – Não se verificaram diferenças médias estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) por nível de higiene, estação do ano ou entre anos de estudo.

Apesar do perfil comportamental manifestado pelas colónias H na Primavera, ter sido, relativamente semelhante todos os anos, o menor nível de comportamento higiénico médio manifestado por estas colónias, nesta estação, correspondeu ao ano de 2002 (59,0%). Tendências semelhantes foram também observadas neste grupo de colónias entre as três estações de Verão, registando-se o menor comportamento higiénico médio no Verão de 2002 (63,9%). Entre as três estações de Outono, foi no Outono de 2003 que se observou o valor médio mínimo para a mesma variável (72,2%).

Todavía, neste grupo de colónias (H) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) de níveis de comportamento higiênico, nas várias estações do ano que possam ser atribuídas ao ano de estudo.

No caso das colónias NH, estas mantiveram também um padrão de comportamento higiênico relativamente semelhante ao longo dos três anos para cada uma das estações, comparativamente ao nível máximo de comportamento higiênico estabelecido para este grupo de colónias ( $CHT<80,0\%$ ). Salienta-se, porém, a exceção verificada no nível de expressão deste comportamento entre o Verão de 2003 e o dos restantes anos, no qual estas colónias manifestaram a resposta higiênica mais elevada (81,3%). Todavía, a diferenciação não é considerada estatisticamente significativa ( $P>0,05$ ) para nenhuma das estações do ano em particular, quando comparadas com as dos restantes dois anos de estudos.

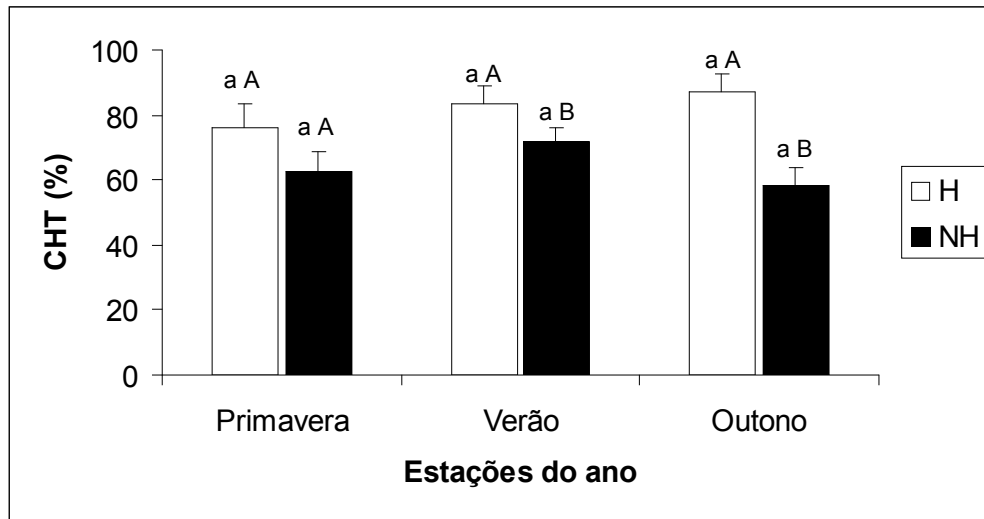
Tomando em conta estes valores, poderá afirmar-se que aparentemente as colónias em cada um dos níveis de higiene (H e NH) manifestaram comportamentos similares, para a mesma estação do ano, nos três anos de estudo.

Os valores médios do nível de comportamento higiênico total registado às 24 horas, no total de colónias amostradas por nível de higiene e por estação do ano (utilizando os anos como repetições) apresentam-se na Figura 3.12.

O nível médio do comportamento higiênico total manifestado pelas colónias higiênicas (nos três anos de estudo), revelou um padrão de variação semelhante, não sendo as diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre as várias estações do ano em que os testes foram realizados. Tendência semelhante foi observada nas colónias não higiênicas, uma vez que não foram também observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre a Primavera, o Verão e o Outono nos níveis médios deste comportamento.

Analisando o valor médio do nível de comportamento higiênico total por cada estação do ano (no total dos 3 anos de estudos), pode-se afirmar que a Primavera foi a estação do ano em que o perfil comportamental entre colónias H e NH apresentou maiores semelhanças, não sendo as diferenças observadas estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). Porém, deve-se salientar que, nesta estação, as colónias H revelaram simultaneamente o menor nível médio de comportamento higiênico (com um mínimo individual (colónia) de remoção das pupas mortas por congelação de 76,0%) e a maior

variação na sua resposta higiénica. Este facto sugere que nem todas as colónias inicialmente agrupadas neste nível (H) mantiveram níveis semelhantes de comportamento higiénico durante as Primaveras dos três anos de estudos.



**Figura 3.12.** Estudo 2 – Nível global de comportamento higiénico total médio observado às 24 horas (média  $\pm$  erro padrão da média, %) em 4 colónias higiênicas (H) e 4 não higiênicas (NH) na globalidade dos 3 anos de estudo, entre estações do ano. <sup>A, B</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>a, b</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras minúsculas iguais, não são estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

No Verão, ao contrário do observado na estação anterior, as colónias higiênicas removeram uma percentagem média de pupas mortas por congelação significativamente superior (83,3) às não higiênicas (71,8). O mesmo padrão comportamental entre os dois grupos de colónias (H e NH) foi observado no Outono, no qual, as colónias H limpam uma percentagem média de alvéolos operculados com criação morta por congelação significativa superior ( $P < 0,05$ ) em 28,8 pontos percentuais. Apesar, da variação manifestada em cada grupo de colónias (H e NH), o padrão comportamental das colónias higiênicas e não higiênicas mostrou-se menos variável no Verão e no Outono dos três anos de estudos, sugerindo assim serem estas estações mais indicadas para a realização dos testes de avaliação do comportamento higiénico. Ainda assim, deve ser novamente referido que estes resultados deverão ser considerados com alguma prudência, na medida em que é desconhecido até que ponto as mesmas colónias usadas ao longo dos três anos de estudos são, pela peculiaridade do sistema de acasalamento

inerente aos sistemas tradicionais de produção apícola, “geneticamente semelhantes” na sua constituição.

### **3.5. Discussão**

#### **3.5.1. Resposta higiénica das colónias à introdução duma secção de favo com criação morta por congelação nos ensaios realizados em 2001**

Na presença de uma secção de favo com criação morta por congelação, as colónias utilizadas no presente estudo, manifestaram as duas componentes do comportamento higiénico: a desoperculação dos alvéolos com criação morta (comportamento higiénico parcial, CHP) e a posterior remoção das crias mortas desses alvéolos desoperculados (comportamento higiénico total, CHT).

O estudo realizado em 2001 sugere que o tempo necessário para a avaliação do comportamento higiénico pode variar entre 24 até mais de 168 horas, com taxas médias de desoperculação e remoção incompletas. A variabilidade observada nos intervalos de tempo necessários para a avaliação dos níveis de comportamento higiénico corrobora as observações de vários autores em estudos de índole semelhante (Gonçalves e Kerr, 1970; Newton *et al.*, 1975; Message e Gonçalves, 1980a, b; Gilliam *et al.*, 1983; Murray, 1993; Spivak e Gilliam, 1993; Kefuss *et al.*, 1996; Waite *et al.*, 2003). No entanto, estes autores apenas se têm referido ao tempo proposto para a avaliação das colónias (período de tempo em que as colónias estão sob observação) e não ao tempo total utilizado pelas abelhas para a completa limpeza do conteúdo dos alvéolos utilizados nas respectivas secções de favo com criação morta. Neste estudo verificou-se que o tempo necessário para a limpeza total da criação morta por congelação, à semelhança do observado por Newton e Ostasiewski (1986), poderá atingir as 336 horas.

Contudo, deve-se salientar, que no total dos ensaios realizados em 2001 as colónias do presente estudo revelaram, às 24 horas, elevados níveis de expressão do CHP e do CHT (82,2 e 76,8%, respectivamente), observando-se simultaneamente uma maior variação entre colónias neste período de observação. A elevada expressão do CHP indica que os alvéolos operculados com criação morta por congelação foram mais rapidamente detectados e desoperculados em 24 horas, do que a criação neles contida foi completamente removida. Desta forma, a variável CHT foi a utilizada para a avaliação do comportamento higiénico das colónias, pois permite quantificar o total de

alvéolos completamente limpos (isto é, formas imaturas neles contidas totalmente removidas) pelas obreiras de uma dada colónia. Aliás, estas duas componentes do comportamento higiênico, correlacionaram-se positivamente, sugerindo um padrão de evolução temporal idêntico entre as duas componentes do comportamento higiênico. Estes resultados não contrariam vários outros estudos (Message e Gonçalves, 1980a, b; Milne, 1982, 1985; Newton e Ostasiewski, 1986) que têm referenciado correlações genéticas positivas entre estas duas componentes do comportamento higiênico. Contrastam, porém, com os resultados reportados por Arathi *et al.* (2000) que obtiveram uma correlação negativa e elevada entre as duas componentes do comportamento higiênico. Estes autores atribuíram esta correlação a diferentes frequências na execução de ambas as tarefas (desoperulação e remoção) pelas obreiras que manifestam o comportamento higiênico, estando estas, possivelmente, associadas à sua própria composição genética.

Milne (1985) obteve estimativas moderadas da heritabilidade genética para os comportamentos de desoperulação ( $h^2 = 0,14$ ) e de remoção ( $h^2 = 0,02$ ), enquanto que, Boecking *et al.* (2000) calcularam os valores da heritabilidade para o comportamento de remoção da criação morta (por punção) em  $h^2 = 0,36$ . Estes valores da heritabilidade permitem afirmar que os efeitos ambientais podem afectar fortemente a expressão do comportamento higiênico e, desta forma, constituem uma hipótese para a explicação das variações encontradas, no âmbito do presente estudo, na execução de ambas as componentes deste comportamento.

No presente trabalho observam-se, também, correlações positivas elevadas entre a taxa média de remoção da criação morta por congelação (CHT) e a taxa média de desoperulação dos alvéolos com criação morta (CHP) nos distintos períodos de observação. Estes resultados corroboram a opinião de Boecking e Spivak (1999) e Newton e Ostasiewski (1986) quando referem que as colónias de abelhas melíferas demonstram uma maior facilidade de identificação e remoção de criação morta por congelação (ou punção), comparativamente ao conseguido com a sua própria criação naturalmente morta. O elevado coeficiente de correlação ( $r = 0,925$ ), verificado ao nível do CHT entre as 24 e as 48 horas, sugere que as colónias de abelhas melíferas portuguesas que manifestam uma elevada capacidade higiénica às 48 horas também a manifestam às 24 horas.

Assim, e por questões de ordem prática (tempo para conclusão do teste) pode concluir-se pelo período de 24 horas como o mais indicado para a avaliação do nível de comportamento higiénico em apiários que integram sistemas tradicionais de produção apícola. Dado que as colónias deste trabalho foram escolhidas ao acaso sem a avaliação prévia deste comportamento, poder-se-á esperar que no universo de colónias existentes na Nordeste Transmontano, se possa produzir uma distribuição similar no nível de comportamento higiénico. Todavia, esta hipótese deverá confirmar-se com um maior número de colónias, considerando-se esta informação como referencial de partida válido para, pelo menos, outros estudos de tipo, desenvolvidos em condições semelhantes.

Em cada ano de estudo, pretendemos também avaliar se existia alguma inter-relação entre a estação do ano e o nível de execução do CHT pelas obreiras. Para tal, os testes de limpeza foram realizados em diferentes estações do ano (excepto no Inverno, período apícola caracterizado, na região, pela paragem de postura das rainhas e pela formação do cacho pelas abelhas). Foi importante analisar esta eventual inter-relação dado que as colónias de abelhas melíferas executam diferentes actividades e possuem diferentes níveis de criação ao longo das várias estações do ano (em algumas situações, as colónias possuem elevados níveis de criação e relativamente pouca população adulta, noutras situações dá-se o inverso).

É interessante salientar os elevados níveis de CHT registados no Outono de 2001, atendendo a que é nesta altura que a proporção de criação nas colónias nesta região do país atinge o seu nível mínimo. São vários os factores que podem contribuir para explicar a variabilidade do CHT entre as estações do ano estudadas. Em primeiro lugar as características climáticas associadas a cada estação. Estudos prévios Momot e Rothenbuhler (1971), Message (1979) e Message e Gonçalves (1980a, b) suportam esta possibilidade ao identificarem as condições ambientais (incluindo as condições climáticas) como possíveis fontes de variação que podem influenciar o nível de expressão do comportamento higiénico. Em segundo lugar, a composição genotípica de uma colónia pode também influenciar o nível de expressão do CHT, quer ao nível da colónia, quer ao nível do indivíduo (obreira). Ao nível da colónia, porque a proporção de abelhas que possuem maior comportamento higiénico depende do genótipo da rainha, dos zângãos com quem ela acasalou e das proporções em que o sémen de cada um desses zângãos é utilizado na fecundação dos óvulos. Ao nível

individual pela proporção de outras obreiras que têm também predisposição genética para a execução deste comportamento. A força de trabalho requerida para a execução dessa tarefa pode exceder a quantidade de outras obreiras “geneticamente predispostas” para esta tarefa (Newton e Ostasiewski, 1986 e Arathi e Spivak, 2001). Estes resultados parecem indicar que a identificação e avaliação do nível de comportamento higiénico (utilizando o teste de morte da criação por congelação) em colónias de abelhas melíferas existentes na região de estudo, pode ser efectuado entre a Primavera e o Outono, ainda que o deva ser preferencialmente no Outono.

No estudo de 2001, 58,3% das colónias mostraram um elevado nível de comportamento higiénico. Estas colónias (posteriormente classificadas como “higiénicas”) removeram uma percentagem média de criação morta por congelação significativamente superior ( $P < 0,05$ ) à removida pelas colónias “não higiénicas”. Tendências semelhantes foram também observadas por vários autores (Oldroyd, 1996; Spivak e Downey, 1998; Palacio *et al.*, 2000; Stanimirovic *et al.*, 2001). Assim, os resultados obtidos em 2001 sugerem a existência de “linhas” de abelhas melíferas portuguesas com elevado nível de comportamento higiénico. Desta forma, poderá ser indicado incluir esta variável em futuros programas de melhoramento genético com vista á obtenção de linhas de abelhas mais higiénicas, podendo a quantificação do comportamento higiénico ser efectuada através de um teste relativamente simples de utilizar mesmo por apicultores ou criadores de rainhas.

### **3.5.2. Relação entre a percentagem média de remoção da criação de obreira morta por congelação em colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) por anos e entre anos**

Analisando anualmente os resultados obtidos com a execução dos testes de limpeza, observa-se que a resposta higiénica das colónias (durante as primeiras 24 horas) à introdução duma secção de favo com criação morta por congelação reflecte consideráveis diferenças, entre colónias higiénicas e não higiénicas (particularmente em 2001 e 2003).



Porém, este padrão de diferenciação comportamental, entre níveis de higiene, foi relativamente irregular por estação e por ano. Verificou-se ainda, que em ambas as situações (colónias H e NH) o padrão de variação em relação ao CHT foi, tendencialmente semelhante entre as várias estações do ano, reflectindo um tipo de comportamento comum em cada nível de higiene. Um dos factores que possivelmente poderá ter interferido no padrão de variação comportamental manifestado por colónias H e NH foi a instabilidade meteorológica sentida no período de estudo, particularmente em 2002. Segundo dados da estação climatológica da Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB; Pereira, 2004), o ano 2002 caracterizou-se por precipitações acima da média (precipitação acumulada de 1078,3 mm). Além disso, a variação da temperatura média mensal foi bastante acentuada entre o período da Primavera e do Verão, registando-se a temperatura média mensal máxima em Julho (19,6°C). Possivelmente, esta situação terá limitado os recursos alimentares das colónias e, indirectamente, influenciado o nível de expressão do seu comportamento higiénico.

Globalmente, as diferenças observadas entre grupos de colónias (H e NH) na expressão deste comportamento, poderão dever-se à variabilidade individual manifestada, pelas colónias de cada grupo. Esta tendência observada na variação do comportamento higiénico entre colónias H e NH e por ano foi igualmente observada por Waite *et al.* (2003), na avaliação do comportamento higiénico de 37 colónias localizadas em várias regiões de Inglaterra e do País de Gales em 2000 e 2001; por Spivak e Downey (1998), no rastreio de colónias para avaliação do comportamento higiénico através da utilização de dois testes de campo (testes de morte por punção e por congelação); e por Loper (1995) ao comparar a resposta higiénica ente colónias europeias e africanizadas utilizando o teste de morte da criação por punção.

Podemos assim considerar que a grande variabilidade de comportamentos higiénicos evidenciados entre colónias (e anos) no presente estudo reflecte, em parte, a heterogeneidade de um comportamento típico de colónias não seleccionadas e acasaladas naturalmente que encontramos em sistemas tradicionais de produção apícola. Nestes sistemas productivos, a reprodução não é controlada, introduzindo uma componente relevante de variabilidade genotípica nas colónias. Acresce que são vários os estudos (Trump *et al.*, 1967; Kryger, 1990; Calderone e Page, 1991, 1992; Arathi *et al.*, 2000; Arathi e Spivak, 2001) que têm revelado a existência de um elevado grau de

variabilidade na expressão fenotípica do nível de comportamento higiénico, dependendo esta não só do genótipo de cada obreira *per si*, mas também consideravelmente da interacção que, em determinado momento, existe entre as obreiras de uma dada colónia.

Globalmente poder-se-á afirmar que os padrões gerais de variação comportamental do grupo de colónias H e NH, foram semelhantes entre os três anos de estudo. De facto, as colónias H mantiveram, nas primeiras 24 horas de teste, níveis médios de comportamento higiénico similares nos três anos de estudos, ainda que, em 2002, o valor médio desta variável tenha sido inferior a 80,0% ( $P > 0,05$ ).

Também as colónias NH mantiveram, entre anos, um padrão de variação comportamental relativamente uniforme. No entanto, as diferenças verificadas na percentagem média de alvéolos limpos aumentaram significativamente ( $P < 0,05$ ) entre 2001 e 2002, face a 2003.

As tendências comportamentais similares observadas entre anos e por grupo de colónias (H e NH) estiveram aparentemente associadas à tendência verificada por estação do ano, entre anos. Quando se considera a percentagem média do CHT, para cada estação, no total dos anos de estudo, a maior diferenciação do padrão comportamental médio entre colónias H e NH ocorreu no Verão/ Outono, sugerindo serem estas as estações do ano em que os testes de avaliação do nível de comportamento higiénico deverão ser preferencialmente executados.

É possível que a rapidez com que as colónias H expressaram o CHT possa ter estado relacionada com factores ambientais. O relativamente reduzido fluxo de néctar presente durante o Verão e o Outono poderá ter eventualmente estimulado as obreiras a limpar um maior número de alvéolos, devido, por exemplo, a uma maior disponibilidade para a execução deste comportamento. A se verificar esta hipótese seria necessário reavaliar o “princípio” anteriormente avançado por Thompson (1964) e por Momot e Rothenbuhler (1971) de que o comportamento higiénico de uma colónia aumenta proporcionalmente ao maior aporte de néctar para a colónia, face à maior necessidade de alvéolos disponíveis para o seu armazenamento.

Apesar de globalmente ter sido observada uma diferenciação comportamental entre colónias H e NH, por estação do ano (no total dos três anos de estudos), estas diferenças nem sempre foram observadas entre os três anos de estudo, por estação e entre estações em cada ano.

As comparações que foram efectuadas neste trabalho, no sentido de avaliar a consistência de níveis de comportamento higiénico manifestados por colónias H e NH ao longo dos três anos de estudos (atendendo a que se trabalhou com colónias “encabeçadas” por rainhas acasaladas naturalmente) suportam resultados anteriormente publicados por Spivak e Gilliam (1993), com base em linhas previamente seleccionadas de colónias higiénicas e não higiénicas (inseminadas instrumentalmente) e por Spivak *et al.* (1995) comparando rainhas criadas a partir de uma “linha higiénica” (posteriormente acasaladas naturalmente) com rainhas produzidas “normalmente” em apiários comerciais. Para Spivak e Gilliam (1993) a variação observada entre as colónias higiénicas e não higiénicas na expressão do comportamento higiénico poderá ser influenciada pela composição genética da colónia e pela população.

Spivak (1996) verificou também que em dois anos consecutivos as colónias higiénicas removeram uma maior proporção de criação morta por congelação do que as colónias não higiénicas, ainda que, nos seus resultados relativos ao segundo ano de estudo, não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre a taxa de remoção das colónias inseminadas com o sémen de um só ou de vários zângões. Estes resultados ajudam a compreender a variabilidade observada em estudos desta natureza particularmente quando como neste trabalho, se utilizam colónias integradas em sistemas de produção, cuja população deriva de múltiplas linhas paternais. Adicionalmente, ajuda também a compreender a observação de diferenças não significativas no CHT manifestado por colónias H e NH que se encontrou neste trabalho, entre estações do, por ano e entre anos. Os resultados obtidos ao longo dos três anos de estudo revelam alguns aspectos do comportamento higiénico que são actualmente mais compreensíveis. Primeiro, porque embora o comportamento higiénico seja geneticamente influenciado, nem sempre é fenotípicamente manifestado (reflectindo um elevado grau de variabilidade associado à sua expressão). É hoje conhecido que a expressão deste comportamento é fortemente influenciada pelas condições ambientais, ao mesmo tempo que depende de condições internas da colónia tais como: (i) a dimensão da sua população (Momot e Rothenbuhler, 1971; Cardenal Galván *et al.*, 1988; Spivak e Gilliam, 1993; Boecking e Spivak, 1999; Stanimirovic *et al.*, 2001); (ii) a relação entre os números de alvéolos de criação e de obreiras (Thompson, 1964; Message e Gonçalves, 1980); (iii) a distribuição intra-colonial dos

genótipos das obreiras que executam este comportamento (Momot e Rothenbuhler, 1971; Arathi e Spivak, 2001); e (iv) da distribuição de idades das abelhas que executam este comportamento nas colónias (Momot e Rothenbuhler, 1971; Boecking e Spivak, 1999; Arathi *et al.*, 2000; Arathi e Spivak, 2001).

Como anteriormente referido, a expressão deste comportamento é também influenciada por factores extrínsecos à colónia, como a disponibilidade de recursos alimentares (Thompson, 1964; Momot e Rothenbuhler, 1971; Message e Gonçalves, 1980; Cardenal Galván *et al.*, 1988; Spivak e Gilliam, 1993; Spivak, 1996; Boecking e Spivak, 1999); as condições meteorológicas (Message e Gonçalves, 1980; Cardenal Galván *et al.*, 1988) e, possivelmente, de outros factores ainda desconhecidos, como refere Spivak e Gilliam (1993). Secundariamente, a heterogeneidade de expressão de níveis de comportamento higiénico [por grupo de colónias (H e NH), por estações do ano (Primavera, Verão e Outono), e entre anos de estudo] observado neste trabalho, sugere que em colónias com rainhas acasaladas naturalmente, esta expressão dependerá, primariamente, da proporção de abelhas (ou subfamílias) que, numa dada colónia, exibem o comportamento higiénico. Ainda que, outro possível argumento possa estar relacionado com o facto das abelhas higiénicas optarem pela realização de outras tarefas, aparentemente mais prioritárias, antes de executarem o comportamento higiénico (Spivak e Gilliam, 1993).

As diferenças anuais médias, relativamente pequenas, observadas entre colónias H e NH, poderão também ter estado relacionadas com o facto das colónias NH terem vindo a melhorar o seu desempenho ao longo dos três anos de estudos (57,4%, 61,2% e 75,7%, em 2001, 2002 e 2003, respectivamente).

A própria metodologia utilizada neste trabalho pode contribuir também para a explicação da variabilidade observada na manifestação do CHT ao longo dos diferentes anos de estudo. Rodrigues *et al.* (1996) verificaram que as colónias removiam a criação morta por congelação mais rapidamente quando esta tinha sido recentemente operculada (comparativamente a criação que já tinha sido operculada há cinco dias). Eventualmente, o facto de a criação utilizada no presente estudo se encontrar no estado de pupa (7 dias após a operculação), pode ter induzido, de algum modo, um maior nível global de comportamento higiénico manifestado por todas as colónias experimentais.

Finalmente, um outro factor que eventualmente terá influenciado a manifestação dos níveis de comportamento higiénico em sentido contrário ao anteriormente referido poderá ter sido a origem da criação congelada. Com efeito, Breed *et al.* (1995) referiram que, uma forma de induzir um maior comportamento higiénico é a utilização de favos teste de diferentes colónias, devido ao facto de a cera conter odores “próprios” usados pelas abelhas no reconhecimento da sua colónia. Spivak e Downey (1998) verificaram também que a resposta de colónias não higiénicas pode ser mais variável dependendo da idade (das pré-pupas e pupas) e da origem (intra ou extra-colonial) da criação congelada, uma vez que, as colónias que apresentam elevado comportamento higiénico terão maior tendência para remover, na mesma proporção, toda a criação independentemente da sua idade e origem. Na metodologia usada no presente trabalho, os favos teste foram retirados e reintroduzidos na própria colónia.

Deste modo, urge a necessidade de incluir as colónias que apresentam um elevado nível higiénico num programa de melhoramento genético para este carácter de forma a estabelecer e manter as linhas seleccionadas neste modelo de trabalho o que poderá revelar-se mais exequível no sentido de beneficiar o apicultor.

### **3.6. Conclusões**

Com base nos resultados obtidos e discutidos poder-se-á retirar as seguintes conclusões:

A morte da criação por congelação mostrou-se um teste eficaz para avaliar o nível de comportamento higiénico em colónias de abelhas melíferas nativas no Nordeste de Portugal.

Um período de teste de 24 horas é, também por razões práticas, particularmente recomendável.

A metodologia aplicada neste trabalho permite claramente discriminar entre colónias “higiénicas” e “não higiénicas”.

O padrão de variação comportamental manifestado quer pelas colónias “higiénicas”, quer pelas “não higiénicas” foi relativamente uniforme ao longo dos anos de estudos e similar entre as diferentes estações do ano (sem avaliação no Inverno), pelo que, a manifestação deste comportamento não é aparentemente muito influenciada pela estação do ano. Ainda assim, e sempre que possível, dever-se-á dar prioridade à avaliação desta variável no Verão.

Nas condições em que este trabalho foi desenvolvido (colónias inseridas em sistemas de produção e sem controlo de acasalamentos) as colónias (higiénicas e não higiénicas) não mantêm níveis semelhantes de comportamento higiénico médio ao longo de anos sucessivos.

### 3.7. Referências bibliográficas selecionadas

Arathi, H. S., Burns, I. e Spivak, M. 2000. Ethology of hygienic behaviour in honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): Behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology* **106**: 365-379.

Arathi, H. S. e Spivak, M. 2001. Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behaviour in honeybee, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour* **62**: 57-66.

Boecking, O. e Spivak, M. 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**: 141-158.

Boecking, O.; Bienfeld, K. e Drescher, W. 2000. Heritability of the Varroa-specific hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Animal Breeding Genetic* **117**: 417-424.

Breed, M. D.; Garry, M. F.; Pearce, A. N.; Hibbard, B. E.; Bjostad, L. B. e Page, R. E., Jr. 1995. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Animal Behaviour* **50**: 489-496.

Calderone, N. W. e Page, R. E. 1991. Evolutionary genetics of division of labor in colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). *American Naturalist* **138**: 69-92.

Calderone, N. W. e Page, R. E. 1992. Effects of interactions among genotypically diverse nestmates on task specialization by foraging honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **30**: 219-226.

Cardenal Galván, J. A.; Gómez Pajuelo, A. e López-Sepúlveda, E. C. G. 1988. Using fluvalinate inserts in Varroa control. In: Present status of varroa control in Europe and progress in the varroa mite control. Proceedings of a meeting of the EC Experts' Group, Udine, Italy.

Gilliam, M.; Taber, S. e Richardson, G. V. 1983. Hygienic behaviour of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie* **14**: 29-39.

Gonçalves, L. S. e Kerr, W. E. 1970. Noções sobre genética e melhoramento em abelhas. In: Anais do 1º Congresso brasileiro de Apicultura, Florianópolis, SC. Brasil. pp 8-36.

Ibrahim, A. e Spivak, M. 2006. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* **37**: 31-40.

Kefuss, J.; Taber, S.; Van Pouecke, J. e Rey, F. 1996. A practical method to test for disease resistance in honey bees. *American Bee Journal* **136**: 31-32.

Kryger, P. 1990. Die bedeutung der genotypischen varianz fur das hygienische verhalten der honigbiene. *Apidologie* **21**: 332-333.

Loper, G. M. 1995. Some attributes of Africanized honey bees in southern Arizona: wing leng, hygienic behavior, worker emergence time and brood nest temperatures. *American Bee Journal* **135**: 828.

Message, D. 1979. Efeito de condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas Africanizadas *Apis mellifera*. MS Thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Ribeirão Preto, Brasil.

Message, D. e Gonçalves, L. S. 1980a. Efeito das condições climáticas e da colônia no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). In: Anais do 5º Congresso Brasileiro de Apicultura e III Congresso Latino Ibero-Americano de Apicultura, Universidade Federal de Viçosa, Brasil. pp 140-147.

Message, D. e Gonçalves, L. S. 1980b. Efeito das condições do favo teste no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). In: Anais do 5º Congresso Brasileiro de Apicultura e III Congresso Latino Ibero-Americano de Apicultura, Universidade Federal de Viçosa. pp 133-139.

Milne, C. P., Jr. 1982. Laboratory measurement of brood disease resistance in honeybees. 1. Uncapping and removing of freeze-killed brood by newly emerged workers in laboratory test cages. *Journal of Apicultural Research* **21**: 111-114.

Milne, C. P., Jr. 1983. Honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behavior and resistance to chalkbrood. *Annals of the Entomological Society of America* **76**: 384-387.

Milne, C. P., Jr. 1985. Estimates of the heritabilities of and genetic correlation between two components of honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behavior: uncapping and removing. *Annals of the Entomological Society of America* **78**: 841-844.

Momot, J. P. e Rothenbuhler, W. C. 1971. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *Journal of Apicultural Research* **10**: 11-21.



Murray, R. 1993. Chalkbrood disease: the NZ experience. *Australasian Beekeeper* **94**: 497-508.

Newton, D. C.; Cantwell, G. C. e Bourquin, E. P. 1975. Removal of freeze-killed brood as an index of nest cleaning behavior in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). *American Bee Journal* **115**: 388-406.

Newton, D. C. e Ostasiewski, N. J. J. 1986. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *American Bee Journal* **126**: 278-281.

Oldroyd, B. P. 1996. Evaluation of Australian commercial honey bees for hygienic behaviour, a critical character for tolerance to chalkbrood. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **36**: 625-629.

Palacio, M. A., Figini, E. E., Ruffinengo, S. R., Rodriguez, E. M., Del Hoyo, M. L. e Bedascarrasbure, E. L. 2000. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* **31**: 471-478.

Pereira, E. L. 2004. Influência do freixo no microclima, nas características do solo e disponibilidade de nutrientes, e na vegetação herbácea de lameiros do Nordeste de Portugal. Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Rembold, H., Krämer, J. P. e Ulrich, G. H. 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **11**: 29-38.

Rinderer, T. E., Delatte, G. T., De Guzman, L., Williams, J., Stelzer, J. A. e Kuznetsov, V. N. 1999. Evaluations of the varroa-resistance of honey bees imported from Far-Eastern Russia. *American Bee Journal* **139**: 287-290.

Rodrigues, I.; Beetsma, J.; Boot, W. J. e Calis, J. 1996. Testing hygienic behavior in four different honeybee strains (*Apis mellifera* L.). In: Proceedings of the Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society, Amsterdam, Netherlands. pp 83-88.

SAS. 1998. SAS User's Guide, Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, NC, USA.

Spivak, M. e Gilliam, M. 1993. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research* **32**: 147-157.

Spivak, M., Reuter, G. S. e Lamb, M. 1995. Frequency of hygienic behavior in naturally mated daughters of a hygienic breeder queen. *American Bee Journal* **135**: 830-831.

Spivak, M. 1996. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, **27**: 245-260.

Spivak, M. e Downey, D. L. 1998. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **91**: 64-70.

Spivak, M. e Gilliam, M. 1998a. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa mites. Part II. Studies on hygienic behavior since the Rothenbuhler era. *Bee World* **79**: 169-186.

Spivak, M. e Gilliam, M. 1998b. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part I. Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World* **79**: 124-134.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies, *Apis mellifera*, bred for hygienic behavior. *Apidologie* **32**: 555-565.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 2005. A sustainable approach to controlling honey bee diseases and varroa mites. <http://www.sare.org/publications/factsheet/0305.htm>. Visitada a 15/09/05.

Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Pejovic, D. e Mirilovic, M. 2001. Hygienic and grooming behaviour in disease resistance of two honeybees ecogeographic varieties (*Apis mellifera carnica*) from Serbia. *Mellifera* **1**: 56-61.

Taber, S. 1982. Bee behavior. Determining resistance to brood diseases. *American Bee Journal* **122**: 422-425.

Thompson, V. C. 1964. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. *Journal of Apicultural Research* **3**: 25-30.

Trump, R. F.; Thompson, V. C. e Rothenbuher, W. C. 1967. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees V. Effect of previous experience and composition of

mixed colonies on response to disease-killed brood. *Journal of Apicultural Research* **3**: 25-30.

Vandame, R. 1996. Importance de l'hybridation de l'hôte dans la tolérance à un parasite. Cas de l'acarion parasite *varroa jacobsoni* chez les races d'abeilles *apis mellifera* européenne et africanisée, en clima tropical humide du mexique. PhD Thesis, Institut d'Analyse des Systèmes Biologiques et Socio-économiques, Lyon, France.

Waite, R.; Brown, M. e Thompson, H. 2003. Hygienic behaviour in honey bees in the UK: a preliminary study. *Bee World* **84**: 19-26.

Wilkes, K. e Oldroyd, B. P. 2002. Breeding hygienic disease resistant bees. US-39A, Rural Industries Research & Development Corporation (RIRDC), Sydney, Australia.

Woyke, J., Wilde, J. e Reddy, C. C. 2004. Open-air-nesting honey bees *Apis dorsata* and *Apis laboriosa* differ from the cavity-nesting *Apis mellifera* and *Apis cerana* in brood hygienic behaviour. *Journal of Invertebrate Pathology* **86**: 1-6.



## Capítulo 4

### **Avaliação de vários métodos de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com *V. destructor***

---

#### **4.1. Introdução**

O conceito de tolerância à varroose tem sido definido como a capacidade de uma colônia de abelhas melíferas coexistir com uma infestação moderada de ácaros *V. destructor* (até 2 500 ácaros) que certamente afecta a colônia, mas que não provoca o seu colapso. Alguns autores porém, utilizam o termo “resistência” para definir o fenómeno de um longo período de sobrevivência das colônias de abelhas melíferas às infestações provocadas por este ácaro, sem ser necessária a aplicação de tratamentos. Este é o caso em que as populações de ácaros são mantidas em baixos níveis de infestação, como ocorre na espécie de abelhas melíferas asiáticas *A. cerana* (Vandame, 1996; Rosenkranz, 1999; Rath, 1999; Kefuss *et al.*, 2003; Kefuss *et al.*, 2004).

Neste estudo será usado o conceito de tolerância, uma vez que, este parece ser o mais apropriado quando são referenciadas as abelhas melíferas europeias, ainda que, no seio da comunidade científica, várias publicações científicas ou técnicas referenciem indiscriminadamente um ou outro conceito independentemente da raça de abelhas.

Um dos factores que contribuem para o nível de tolerância das colónias à varroose parece ser o comportamento de remoção das abelhas perante alvéolos infestados com os ácaros que originam esta patologia (Rath, 1999). Este comportamento tem sido estudado de forma a ser usado como um dos principais critérios na selecção de linhas de abelhas que manifestem um elevado nível de tolerância a estes ácaros (Boecking e Spivak, 1999).

As principais metodologias utilizadas para avaliar o comportamento de remoção das abelhas melíferas perante o ácaro *V. destructor* baseiam-se essencialmente na infestação artificial de alvéolos de criação com ácaros vivos ou mortos (Boecking e Spivak, 1999; Flores *et al.*, 2001, 2003).

Na Europa, vários grupos de trabalho (Büchler, 1994, 2000; De Guzman *et al.*, 1996, 2001, 2002; Rinderer *et al.*, 2001a) mostraram a possibilidade de seleccionar este (e outros) factores de tolerância do hospedeiro ao ácaro *V. destructor*. Um destes factores, designado por supressão da reprodução dos ácaros, foi descoberto nos Estados Unidos por (Harbo e Hoopingarner, 1997). Estes autores seleccionaram uma linha de abelhas que mantinha um baixo nível de infestação porque os ácaros, aparentemente, pareciam ter um baixo sucesso reprodutivo sobre a criação de obreiras (Harbo e Harris, 1999a, b), apesar de não ser conhecido o mecanismo pelo qual, desta forma, as abelhas conseguiam suprimir a reprodução do ácaro (Harris e Harbo, 1999). Outro factor que possivelmente impede a reprodução dos ácaros e que tem sido seleccionado como um dos principais factores de tolerância a esta patologia é o comportamento higiénico (Boecking e Spivak, 1999).

Actualmente a selecção e utilização de linhas de abelhas *A. mellifera* que manifestem mecanismos de tolerância relativamente ao ácaro *V. destructor* poderão beneficiar, de certa forma, a agricultura e contribuir para o restabelecimento de populações de abelhas relativamente livres destes parasitas. Porém, de certa forma, a produção destas linhas de colónias seleccionadas demonstrou ser relativamente desencorajadora, uma vez que, grande parte da variabilidade associada a estes mecanismos de tolerância em colónias europeias deriva de factores ambientais ou de origens casuais (Kulincevic *et al.*, 1997) e, além disso, pela constatação de uma insuficiente variabilidade genética para a produção destas linhas (Rinderer *et al.*, 2001a). Razão pela qual, segundo Spivak e Reuter (2005), é de relevante interesse a sensibilização dos produtores profissionais para a selecção do comportamento

higiênico, entre as suas linhas de abelhas favoritas, para que possa existir um elevado número de linhas disponíveis para a manutenção da diversidade genética.

Ainda assim, têm sido assinaladas evidências que demonstram a existência destes factores de tolerância à varroose e, inclusivamente, referem a viabilidade da utilização, a nível comercial, de linhas de abelhas europeias seleccionadas neste sentido. A produção comercial de rainhas a partir de linhas de abelhas seleccionadas em função da supressão da reprodução dos ácaros tem sido investigada como uma possibilidade nesse âmbito (Harbo e Harris, 1999b; Harris e Harbo, 2000). Outra possibilidade comercial deriva da avaliação de rainhas que foram importadas da Rússia para os Estados Unidos (Rinderer *et al.*, 1999), das quais foram seleccionadas algumas (sete) linhas de abelhas que também manifestam mecanismos de tolerância a este ácaro (Rinderer *et al.*, 2001a, b; Harris *et al.*, 2002). Também a linha de abelhas higiénicas de Minnesota (seleccionada a partir de uma linha de colónias italianas) manifestam um elevado nível de higiene e exibem também mecanismos que contribuem para a tolerância à varroose, porque são capazes de detectar e remover criação parasitada com ácaros (Spivak, 1996; Spivak e Reuter, 1998b, 2001). Aliás, estas linhas higiénicas de Minnesota (que estão disponíveis comercialmente nos Estados Unidos) já começaram a ser adoptadas nas suas estratégias produtivas por um amplo número de apicultores (Spivak e Reuter, 2001; Spivak e Reuter, 2005).

Neste contexto, uma das soluções possíveis para minimizar os problemas provocados pela varroa traduz-se na identificação, selecção, avaliação, criação e utilização de linhas de abelhas higiénicas que apresentem elevados níveis de tolerância a este parasita e, possivelmente, a outras patologias.

Vários estudos (Spivak, 1996; Spivak e Reuter, 1998b; Harbo e Harris, 1999b, 2001; Büchler, 2000; Palacio *et al.*, 2000; Rinderer *et al.*, 1993, 1999; Szabo e Szabo, 2000; Rinderer *et al.*, 2001b) revelaram, como principais vantagens da selecção destas linhas de abelhas higiénicas, (i) menor grau de infestação, (ii) redução dos efeitos patogénicos provocados pelo ácaro varroa (menor perda de colónias ou recuperação de outras debilitadas ou de outras patologias associadas ao parasita), (iii) redução dos custos associados ao controlo do parasita (tais como, aquisição de tratamentos, custos laborais, etc), (iv) maior intervalo de tempo entre tratamentos consecutivos (isto é, menor frequência de tratamentos), (v) uso de produtos menos agressivos e, como consequência, (vi) redução do risco de resíduos nos produtos apícolas.

Além disso, nos últimos anos, alguns destes programas de selecção têm visado incrementar o nível de tolerância nas linhas seleccionadas relativamente a estes ácaros, na tentativa de reduzir a frequência dos tratamentos anuais destas colónias (que continuam a ser necessários para a sua sobrevivência) e para que, tratamentos alternativos (como alguns ácidos orgânicos e/ou óleos essenciais) possam ser usados na redução das populações de ácaros.

Recentemente, alguns resultados promissores demonstraram um abrandamento no aumento populacional dos ácaros em colónias pré-seleccionadas em populações experimentais (Harbo e Hoopingarner, 1997; Spivak e Reuter, 1998a, 2001, 2005; Szabo e Szabo, 2000; Harris *et al.*, 2002, 2003) mas não existe nenhuma informação fidedigna que ateste que, em condições normais de produção, as colónias possam sobreviver sem tratamento.

Estudos recentes sobre o comportamento higiénico têm vindo a salientar a importância do comportamento de remoção como um factor de tolerância das colónias ao ácaro *V. destructor* (Vandame, 1996; Rosenkranz, 1999; Aumeier *et al.*, 2000; Spivak e Reuter, 2005), apesar de a tolerância ser globalmente um fenómeno multifactorial (Boecking e Spivak, 1999; Rosenkranz *et al.*, 1997; Rosenkranz, 1999; Spivak e Reuter, 2005).

Também Spivak e Reuter (1998b) e Spivak e Reuter (2001), demonstraram que colónias de abelhas seleccionadas para um elevado comportamento higiénico produziam tanto ou mais mel e mantinham um nível de infestação mais baixo comparativamente a colónias não seleccionadas. Porém, o elevado comportamento higiénico manifestado pelas linhas de abelhas higiénicas que foram seleccionadas a partir dos métodos tradicionais (baseados na morte de criação por congelação ou por punção) demonstrou não ser suficiente para o controlo da varroa (Spivak e Gilliam, 1993).

Paralelamente, Ibrahim e Spivak (2006) encontraram um reduzido êxito reprodutivo do ácaro *V. destructor* em colónias de abelhas seleccionadas em função do seu maior sucesso na supressão da reprodução de ácaros (Harbo e Harris, 1999b; Harris e Harbo, 2000) e de uma maior resposta higiénica perante alvéolos de criação de obreira artificialmente infestados.

Poder-se-à assim colocar a hipótese de que a selecção para um maior comportamento higiénico, avaliado pelo nível de resposta perante alvéolos de criação de obreira infestados, poderá dificultar o crescimento populacional da *V. destructor*.



Todavia, importa resolver previamente questões relacionadas com o melhor conhecimento e/ou aperfeiçoamento de metodologias de avaliação da resposta das obreiras perante alvéolos infestados com *V. destructor*.

Assim, este capítulo é composto por três estudos, nos quais se analisou a utilização de métodos de infestação de alvéolos operculados (com criação de obreira) com *V. destructor* no sentido de se investigar o comportamento de colónias nacionais de *A. mellifera* L. acasaladas naturalmente.

Paralelamente, procedeu-se à comparação dos vários métodos de infestação, de forma a os avaliar em função da sua efectividade, praticabilidade e simplicidade e com o objectivo final de identificar contextualizadamente a mais indicada para as condições em que se realizou este estudo.

Finalmente analisou-se também a inter-relação entre o comportamento higiénico das colónias (Capítulo 3) e o seu nível de resposta a alvéolos de criação de obreira infestados com *V. destructor* (vivos ou mortos).

O conhecimento da resposta das colónias perante alvéolos de criação infestados com ácaros poderá ainda ser extremamente relevante para o posterior desenvolvimento de um programa de melhoramento genético.

Concretamente, os objectivos específicos deste estudo foram:

Avaliar o nível de resposta higiénica das colónias de abelhas melíferas portuguesas, quando confrontadas simultâneamente com alvéolos de criação de obreira operculada artificialmente infestados com *V. destructor* através da aplicação de distintos métodos de infestação, e

Investigar possíveis interferências, na resposta destas colónias, introduzidas pela aplicação dos distintos métodos em simultâneo, de modo a identificar posteriormente a melhor metodologia de infestação para avaliar o nível de resposta comportamental.

## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1. Apiário experimental

Neste estudo foram utilizadas doze colónias que suportaram quatro ensaios realizados entre os meses de Junho a Setembro de 2001. As colónias foram divididas em 4 grupos com três colónias por grupo. Estas colónias foram as mesmas utilizadas no Capítulo 3 (Estudo 1), pelo que, a localização e caracterização da área de estudo foram já anteriormente referidas.

Durante o período experimental, a população de abelhas adultas ocupou entre cinco a dez quadros por colmeia.

As colónias de abelhas estavam alojadas em colmeias de modelo Langstroth, normalizado com 10 quadros por ninho, com estrados adaptados para a recolha de ácaros e mantidas no sistema tradicional de produção. Todas as colónias derivavam de enxames locais com rainhas acasaladas naturalmente.

O manejo das colónias foi conservador, isto é, não se aplicaram estratégias de intensificação de produções. Além disso, houve uma grande preocupação no sentido de prevenir o processo de enxameação durante Primavera. Para esse efeito foram consideradas essencialmente duas medidas. A primeira visou o corte da extremidade das asas anteriores das rainhas, de forma a evitar que estas levantassem voo com os seus eventuais respectivos enxames, procedimento este que ocorreu momentos após a sua marcação. A segunda medida considerada teve como princípio aumentar o espaço disponível para a postura da rainha e armazenamento de reservas, ao nível das colónias. Este procedimento foi efectuado, aproximadamente, duas semanas antes de se tornar necessário.

No início da Primavera de 2001, foram realizados tratamentos para a contenção do crescimento populacional destes ácaros. Neste sentido, todas as colónias foram tratadas com duas tiras de Apistan® (Fluvalinato, 800 mg por tira), após a quantificação prévia dos respectivos graus de infestação. O grau de infestação foi determinado sob abelhas adultas, segundo o método adoptado por (Vandame, 1996).

Antes do início de cada ensaio (Primavera) não foram praticamente detectados ácaros em nenhuma das colónias. No entanto, com o decurso do tempo ocorreu a

reinfestação de todas as colônias, devido a causas naturais (deriva e pilhagem entre colônias a partir de apiários próximos).

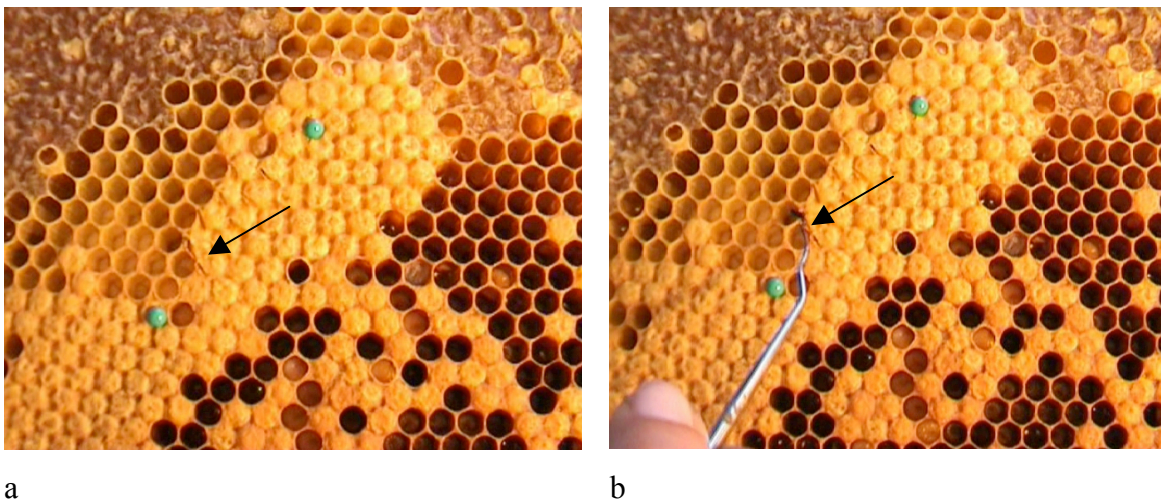
#### **4.2.2. Método de infestação artificial da criação operculada de obreira e “tipos” de *V. destructor* utilizados**

Neste estudo foram utilizados três “tipos” de *V. destructor* para infestar artificialmente alvéolos de criação operculada de obreira. A metodologia adotada no presente estudo foi idêntica à utilizada por Boecking e Drescher (1991, 1992), Guerra *et al.* (2000) e Flores *et al.* (2001, 2003). Dois quadros com criação operculada de obreira de cada uma das 12 colônias foram individualmente marcados. A criação utilizada encontrava-se no estado de pupa de 7 dias após a operculação [pupas brancas com olhos pigmentados (vermelho acastanhado) (Rembold *et al.*, 1980)].

No sentido de estimar a idade da criação (e para possibilitar a sua posterior localização), marcava-se, numa folha de acetato, os alvéolos de criação que tinham sido operculados à menos de 24 horas.

Os ácaros utilizados na infestação artificial de alvéolos foram recolhidos de criação recém-operculada de obreira oriunda de colmeias dadoras, altamente parasitadas por *V. destructor*, mantidas a mais de 5 Km do apiário experimental. O estado reprodutivo dos ácaros no momento da recolha e da introdução era desconhecido. Na infestação artificial de alvéolos apenas foram introduzidos ácaros totalmente pigmentados.

As *V. destructor* foram introduzidas nos alvéolos através de uma pequena abertura na parte lateral do opérculo efectuada com um bisturi (Ruijter, 1987; Boecking e Ritter, 1993; Janmaat e Winston, 2000), como se mostra na Figura 4.1 a e b. Cada alvéolo foi infestado com três ácaros e cuidadosamente fechado. Foram utilizadas 3 varroas mortas e os alvéolos de criação foram observados após 24 horas de infestação, uma vez que, Flores *et al.* (2001) comprovaram que as obreiras reagem de forma clara, no período de 24 horas, a este número de varroas.



**Figura 4.1.** Marcação de alvéolos e corte lateral do opérculo (a) e introdução de ácaros (b)

Neste estudo, utilizaram-se três tipos diferentes de *V. destructor*. Varroas mortas por congelação, varroas mortas naturalmente e varroas vivas. Estas três “fontes de variação”, que determinam três “tratamentos” diferentes neste estudo, serão por conveniência de linguagem, designados por “métodos”.

Assim, o primeiro método consistiu na infestação de alvéolos de criação com três ácaros mortos por congelação (AMC). O processo de morte consistiu na congelação dos ácaros a  $-20^{\circ}$  durante 48 horas. Estes ácaros foram posteriormente descongelados durante cerca de duas a três horas antes da sua introdução nos alvéolos de criação.

O segundo método (AMN) consistiu na infestação de alvéolos com três ácaros mortos naturalmente. Estes, após a sua recolha foram colocados em placas de petri, permanecendo a temperatura ambiente até perecerem.

O terceiro método (AV) consistiu na infestação de alvéolos com três ácaros vivos. Os ácaros vivos, recolhidos de alvéolos de criação de obreira, foram mantidos incubados sobre pupas de obreira ( $34^{\circ}\text{C}$ ) durante as 24 a 48 horas que precederam à sua transferência para os alvéolos a infestar artificialmente.

Assim, utilizaram-se doze colónias. Em três colónias estudou-se a resposta a AMC, em três outras a resposta a AMN e em três outras, a resposta a AV. Nas restantes 3 colónias foram aplicados conjuntamente os três métodos, neste caso identificados pelo acrescento do índice c (AMCc, AMNc e AVc). Cada um dos métodos de infestação foi aplicado em 2 quadros por colmeia. Em cada quadro foram utilizados 3 grupos de 10 alvéolos com criação operculada de obreira. No primeiro grupo foram introduzidos os ácaros. No segundo grupo (Test. I) os alvéolos foram abertos e fechados sem introduzir

parasitas. No terceiro grupo (Test. II) os alvéolos não foram manipulados. Este terceiro grupo, sem qualquer manipulação, visou monitorizar o possível canibalismo das abelhas durante o período experimental, tal como descrito por Boecking e Ritter (1993). Estes grupos foram marcados em folhas de acetato, seguindo a metodologia de Ifantidis (1983). Depois de manipulados os quadros foram recolocados nas suas respectivas posições e colmeias. A resposta comportamental das abelhas foi avaliada 24 horas após a infestação com ácaros mortos e 240 horas após a infestação com ácaros vivos.

A inspecção microscópica dos opérculos (lupa binocular, Leica MZ 12.5) dos alvéolos que não foram removidos pelas abelhas permitiu verificar se estas abriram, examinaram e construíram novos opérculos (Boecking e Spivak, 1999).

Paralelamente, a inspecção dos alvéolos que não foram removidos permitiu verificar se as abelhas abriram, libertaram e/ou removeram os ácaros ou, e alternativamente, se estes permaneciam sobre a criação. Assim, cada alvéolo de criação operculada aparentemente intacto foi aberto, a pupa removida com a ajuda de uma pinça, e as paredes dos alvéolos foram cuidadosamente examinadas para verificar a presença dos ácaros introduzidos artificialmente.

O nível de comportamento higiénico foi avaliado através do registo da percentagem alvéolos de criação manipulados pelas abelhas.

Nos resultados avaliaram-se dois comportamentos (I e II): comportamento I as abelhas limpavam completamente os alvéolos parasitados, retirando os parasitas e as pupas de obreira. No comportamento II as abelhas desopercularam e reopercularam os alvéolos, retirando um ou mais *V. destructor* (no caso do ácaro não ter abandonado os alvéolos) mas não a criação de obreira que estes continham.

#### **4.2.3. Métodos de análise estatística**

A análise estatística dos resultados foi efectuada através do software SAS (1998).

A normalidade dos dados, relativos aos níveis de comportamento higiénico manifestados pelas abelhas, foi avaliada pelo teste W de Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene. Como os dados não seguiam uma distribuição normal, foram submetidos a uma análise de variância não paramétrica utilizando o procedimento NPAR1WAY do software SAS (1998).

Para a comparação múltipla entre os valores médios dos comportamentos I e II manifestados pelas colónias num mesmo método de infestação, utilizou-se o teste de Friedman. Para a testagem de diferenças significativas entre os vários grupos de alvéolos (infestados, manipulados e não manipulados) optou-se pelo teste “Wilcoxon Matched Pairs”.

As diferenças entre os três métodos de infestação, nos vários meses de estudo, foram comparadas duas a duas utilizando o teste Kruskal-Wallis. As diferenças entre os valores médios dos distintos grupos de alvéolos (infestados, manipulados e não manipulados) e dos dois comportamentos manifestados pelas colónias (comportamento I e II) entre diferentes métodos (AMC, AMN e AV) foram comparadas, duas a duas, utilizando o teste Mann-Whitney.

A relação entre os comportamentos I e II (dentro do mesmo método e entre métodos) foi analisada pelo coeficiente de correlação de Spearman's.

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Avaliação da resposta de colónias de abelhas melíferas à utilização de vários métodos de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com *V. destructor*, testados de forma individual ou conjunta**

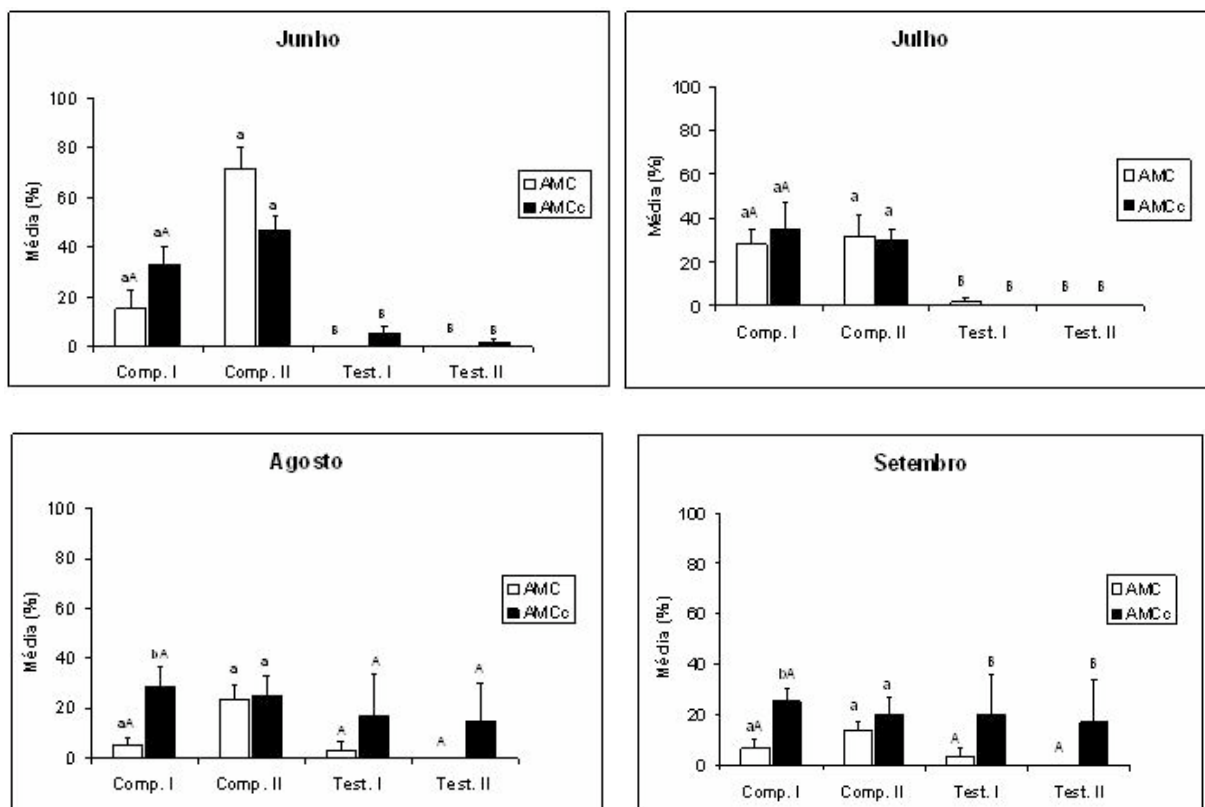
Os alvéolos de criação operculada de obreira artificialmente infestados através dos três “métodos” estudados (AMC; AMN E AV) foram detectados pelas obreiras em vários graus. Numa maior proporção, os alvéolos estudados foram encontrados vazios, o que demonstrou uma resposta de remoção completa (removendo os parasitas e a criação, comportamento I). Todavia, ocorreram situações em que as obreiras abriram e reopercularam os alvéolos (comportamento II).

##### **4.3.1.1. Método de infestação da criação operculada de obreira com ácaros mortos por congelação (AMC)**

Na Figura 4.2 constam os valores mensais médios da resposta higiénica das obreiras ao mesmo método de infestação, quando aplicado isoladamente ou em simultâneo com outros dois.

Estes resultados mostram que entre os dois grupos de testemunhas (Test. I e Test. II) não se observaram diferenças mensais médias estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Porém, entre os grupos testemunhas e os grupos de alvéolos infestados com três AMC foram observadas diferenças mensais médias estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ), quer tenha sido este o único método aplicado na colónia, quer tenham sido aplicados os três métodos em simultâneo.

O efeito da introdução de três AMC entre ambas as situações (aplicação única deste método nas colónias ou em conjunto com outros), não provocou respostas médias estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ) relativamente ao comportamento II.



**Figura 4.2** – Valores observados (média ± erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colônias quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AMC) ou em simultâneo com outros (AMCc), utilizando três colmeias por grupo [duas repetições por colmeia e por mês n=6]. <sup>a, b</sup> – Médias entre métodos, diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). <sup>A, B</sup> – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

Contrariamente, existiram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) em Agosto e Setembro ao considerar o comportamento I. Este foi numericamente superior em todos os meses, nas colmeias em que a sua aplicação foi realizada em simultâneo com outros métodos de infestação artificial (Figura 4.2).

Os valores globais dos comportamentos manifestados por cada grupo de colônias em função do método de infestação aplicado (durante os quatro ensaios realizados), assim como as correlações obtidas entre estes comportamentos, apresentam-se no Quadro 4.1.

Ainda que as abelhas tenham detectado e removido alguns dos alvéolos dos dois grupos de testemunhas (Test. I e Test. II), esta percentagem média foi muito reduzida e estatisticamente não significativa ( $P > 0,05$ ), quer em grupos de colônias onde este método foi aplicado individualmente, quer no grupo onde foi testado conjuntamente com os dois outros métodos (AMN e AV).



**Quadro 4.1.** – Valores observados (média ± erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AMC) ou em simultâneo com outros (AMCc), em duas repetições efectuadas por colmeia e em dois grupos de três colmeias, nos quatro ensaios consecutivos realizados em 2001 (n=24).

Método de infestação	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II	Comp. I/ Comp. II
AMC	13,8±3,29aA	35,0±5,74a	2,1±1,20aB	0,0±0,00aB	r= 0,173 NS
AMCc	30,4±4,02bA	30,4±3,68a	10,4±5,73aB	8,3±5,47aB	r= 0,365 NS

a, b – Médias entre métodos, diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,01$ ). A, B – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si. r = Coeficiente de correlação de Spearman, NS - Não significativo para  $r > 0$ ,  $P > 0,05$ .

Estes resultados mostram que independentemente de ser aplicado um único ou vários métodos em simultâneo (por colónia e em cada grupo), a remoção média dos alvéolos infestados com AMC foi diferenciada e estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ), comparativamente aos alvéolos testemunha.

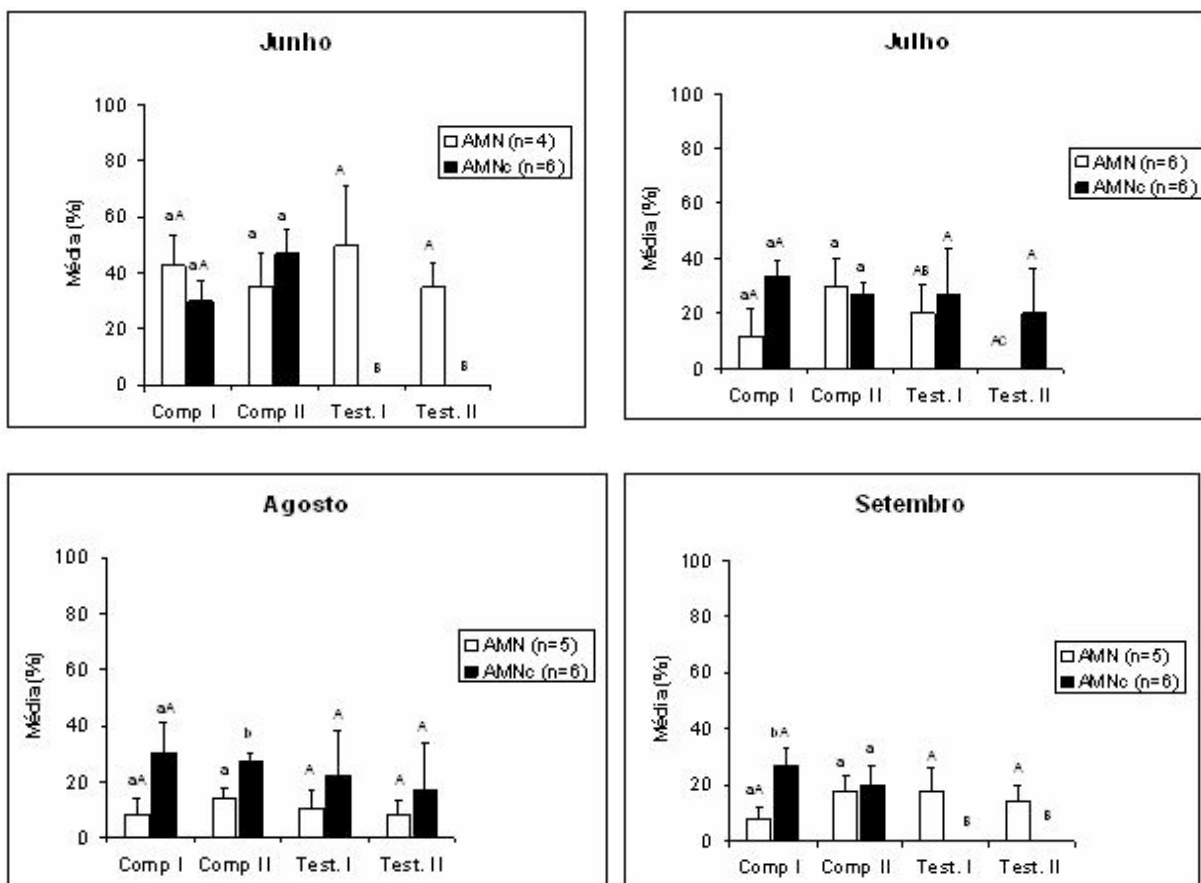
No contexto global dos quatro meses de estudo, as obreiras removeram uma percentagem média superior ( $P < 0,01$ ) de crias e AMC (comportamento I) nas colónias em que este método foi aplicado em simultâneo com os outros dois (30,4%) comparativamente ao grupo de colónias em que apenas se aplicou este método (13,8%). Porém, entre estes grupos de colónias, não foi observada nenhuma diferenciação estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) relativamente à manifestação do comportamento II (nem à percentagem média de pupas removidas nos dois grupos de testemunha). Aparentemente estes resultados parecem revelar que a aplicação de várias metodologias em simultâneo na mesma colónia pode afectar a resposta das abelhas.

Não existiu uma correlação estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre os comportamentos I e II, relativamente aos alvéolos infestados com 3 AMC, independentemente do método ter sido aplicado isoladamente ( $r=0,173$ ) ou em simultâneo com os outros dois ( $r=0,365$ ).

### 4.3.1.2 Método de infestação da criação operculada de obreira com ácaros mortos naturalmente (AMN)

Os valores médios dos comportamentos manifestados pelas abelhas em cada um dos grupos (introdução de AMN; alvéolos manipulados e alvéolos não manipulados), como reacção à aplicação do método de infestação de alvéolos com AMN, encontram-se representados na Figura 4.3.

Globalmente, as obreiras detectaram e removeram uma maior percentagem média de alvéolos manipulados, comparativamente a alvéolos não manipulados. Todavia, devido a grande variabilidade, não se observaram diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). À excepção de Julho, onde a remoção média de crias foi superior ( $P < 0,05$ ) em alvéolos manipulados (20,0%), comparativamente com os 0% observados em alvéolos não manipulados, na situação em que apenas foi aplicado o método AMN.



**Figura 4.3** – Valores observados (média ± erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AMN) ou em simultâneo com outros (AMNc), utilizando três colmeias por grupo [duas repetições por colmeia e por mês]. <sup>a, b</sup> – Médias entre métodos, diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). <sup>A, B</sup> – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

Entre os grupos testemunha e os grupos de alvéolos infestados com AMN também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ), na situação em que apenas este método foi aplicado. Porém, nas colónias em que o comportamento induzido pelos AMN foi conjuntamente testado com os outros dois “métodos” observou-se, em Junho e Setembro uma diferenciação estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) nos grupos de alvéolos infestados (30,0 e 26,7%, respectivamente) comparativamente aos alvéolos dos dois grupos testemunha (0,0 e 0,0%, respectivamente).

Globalmente, a resposta comportamental das abelhas aos AMN foi semelhante à dirigida aos AMNc ( $P > 0,05$ ). A única excepção ocorreu no mês de Agosto ( $P < 0,05$ ), e só no que se refere ao comportamento II.

O grupo de colónias em que se testou os AMNc apresentou, em Setembro, níveis médios de comportamento I estatisticamente superiores ( $P < 0,05$ ) aos do grupo de colónias onde se testou os AMN. Sugerindo estes resultados que possivelmente, ambas as circunstâncias (o efeito da aplicação conjunta de várias metodologias e o mês em que são aplicadas) podem interferir neste comportamento.

Os valores globais dos comportamentos manifestados pelas colónias estudadas, bem como as correlações obtidas entre estes comportamentos, encontram-se representados no Quadro 4.2.

**Quadro 4.2.** – Valores médios observados (média  $\pm$  erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas colónias quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AMN) ou em simultâneo com outros (AMNc), em duas repetições efectuadas por colmeia e em dois grupos de três colmeias, nos quatro ensaios realizados em 2001

Método de infestação	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II	Comp. I/Comp. II
AMN (n=20)	16,0 $\pm$ 4,83aA	24,0 $\pm$ 4,38a	23,0 $\pm$ 6,24aA	12,5 $\pm$ 3,69aA	r= 0,021 NS
AMNc (n=24)	30,0 $\pm$ 3,71bA	30,0 $\pm$ 3,51a	12,1 $\pm$ 6,02bB	9,17 $\pm$ 5,77aB	r= -0,136 NS

a, b – Médias entre métodos, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). A, B – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si. r = Coeficiente de correlação de Spearman, NS - Não significativo para  $r > 0$ ,  $P > 0,05$

Entre os grupos de colónias em que se introduziram AMN e AMNc a remoção média de criação dos alvéolos manipulados foi estatisticamente superior ( $P < 0,05$ ) quando os AMN foram individualmente testados em cada uma das colónias desse

grupo. Não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) relativamente ao grupo testemunha II. Porém, em cada uma das situações em que os AMN ou AMNc foram testados não se observaram diferenças de nível comportamental entre os alvéolos manipulados e não manipulados.

Aliás, no grupo de colónias em que os AMN foram aplicados isoladamente, ainda que, numericamente superior, não foi observada uma diferenciação significativa ( $P > 0,05$ ) entre a remoção média dos alvéolos infestados e os alvéolos testemunha (manipulados e não manipulados), reflectindo um grau de comportamento semelhante entre as colónias.

Contrariamente, diferenças de nível comportamental estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ), entre o comportamento I e o comportamento de remoção de crias dos alvéolos testemunhas observaram-se no grupo de colónias que receberam AMNc.

Por outro lado, no contexto global dos quatro meses de estudo, as obreiras foram mais eficazes na detecção e remoção de pupas de obreiras e parasitas (comportamento I  $P < 0,05$ ) na situação em que se introduziram AMNc. No entanto, já não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) relativamente ao comportamento II.

Não existiu uma correlação estatisticamente significativa entre os comportamentos I e II na resposta prestada pelas colónias onde se introduziram AMN ( $r = 0,021$ ;  $P > 0,05$ ), nem quando o mesmo método foi utilizado em simultâneo com os outros dois ( $r = -0,136$ ;  $P > 0,05$ ).

#### **4.3.1.3. Método de infestação de criação operculada de obreira com ácaros vivos (AV)**

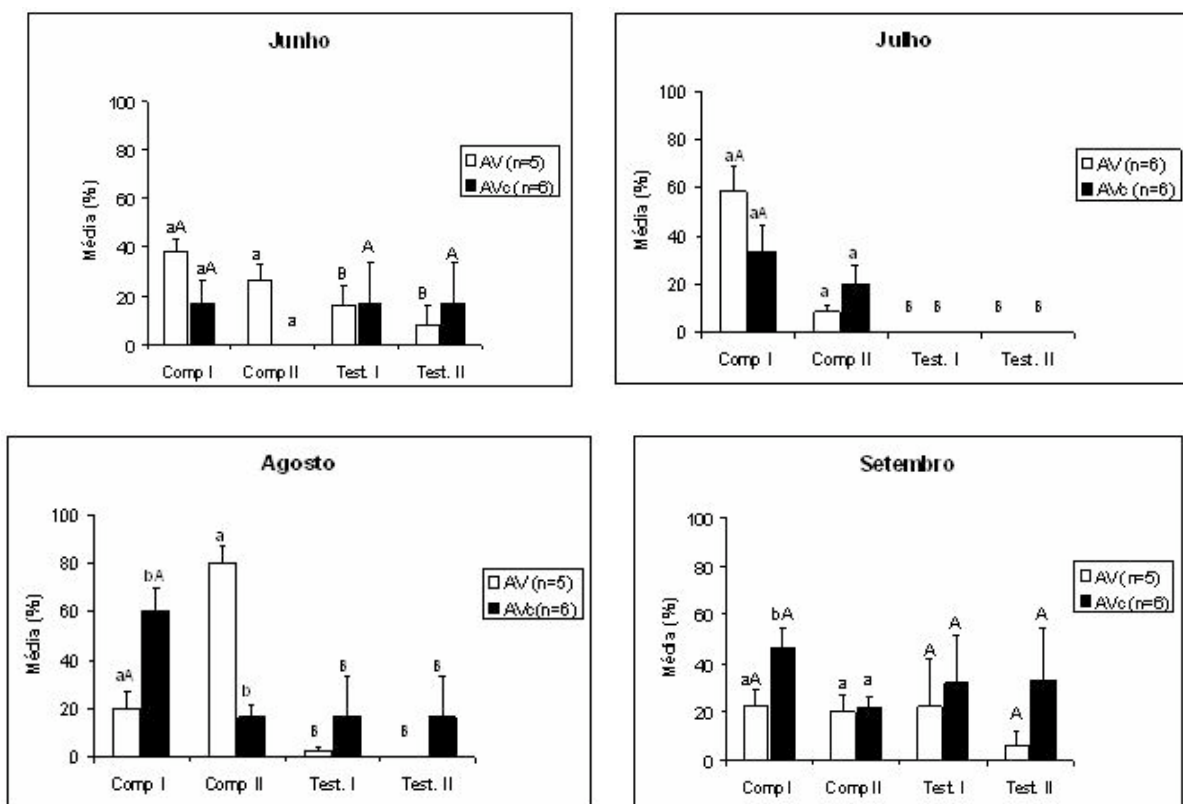
Os valores médios mensais dos comportamentos manifestados pelas abelhas em cada um dos grupos (AV, Test. I e Test. II) encontram-se representados no Figura 4.4.

Estes resultados mostram que, globalmente, as abelhas detectaram e removeram uma percentagem média semelhante de criação dos alvéolos manipulados (testemunha I) e não manipulados (testemunha II), em cada grupo de colónias ao qual foi aplicado o mesmo método AV de distintas formas (isolada ou conjuntamente).

Provavelmente devido ao elevado erro padrão da média (que, em alguns casos, igualou o valor médio), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre os grupos testemunhas. Contudo, a diferenciação observada entre estes grupos e o grupo de alvéolos nos quais se introduziram os ácaros vivos foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) em praticamente todos os meses.

Globalmente, a resposta comportamental II não diferiu de forma estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre grupos AV e AVc. Salienta-se, porém, que no mês de Agosto, o grupo de colónias AV, manifestaram mais ( $P < 0,05$ ) este comportamento.

Analisando mensalmente, a remoção média da criação e parasitas (comportamento I), verificou-se que esta foi superior ( $P < 0,05$ ) em Agosto e Setembro, no grupo de colónias AVc. Apesar disso, salienta-se a elevada variabilidade por grupo de colónias e por mês, associada á manifestação deste comportamento, o que poderá, de certa forma, ajudar a explicar estes resultados (Figura 4.4).



**Figura 4.4** – Valores observados (média  $\pm$  erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AV) ou em simultâneo com outros (AVc), utilizando três colmeias por grupo [duas repetições por colmeia e por mês]. <sup>a, b</sup> – Médias entre métodos, diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). <sup>A, B</sup> – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

No Quadro 4.3 apresentam-se os valores globais dos comportamentos manifestados pelas colónias de abelhas como resposta ao método de infestação aplicado nos 4 ensaios realizados no ano civil de 2001, bem como as correlações obtidas entre estes comportamentos.

**Quadro 4.3.** – Valores médios (média  $\pm$  erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas quando o mesmo método de infestação foi aplicado isoladamente (AV) ou em simultâneo com outros (AVc), em duas repetições efectuadas por colmeia e em dois grupos de três colmeias, nos quatro ensaios realizados em 2001

Método de infestação	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II	Comp. I/ Comp. II
AV (n=21)	35,7 $\pm$ 5,10aA	32,4 $\pm$ 6,72a	9,5 $\pm$ 5,09aB	3,3 $\pm$ 2,32aB	r = - 0,52 *
AVc (n=24)	39,2 $\pm$ 5,61aA	14,6 $\pm$ 3,07b	16,3 $\pm$ 7,59aB	16,7 $\pm$ 7,77aB	r = 0,12 NS

a, b – Médias entre métodos, diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ). A, B – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si. r = Coeficiente de correlação de Spearman; NS – Não significativo para  $r > 0$ ,  $P > 0,05$ ; \* - Significativo para  $P = 0,05$ .

Estes resultados mostram alguma remoção média verificada nos grupos testemunha I e II. Ainda que esta, não tenha sido estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos de colónias AV e AVc, foi numericamente superior no grupo onde a infestação artificial de alvéolos de criação de obreira com *V. destructor* vivas foi efectuada conjuntamente com os outros dois métodos (AMCc e AMNc).

Contudo, a remoção média dos alvéolos infestados com ácaros vivos apresentou valores superiores ( $P < 0,05$ ) aos observados em alvéolos testemunha (manipulados e não manipulados), quer quando aplicado individualmente quer quando avaliado conjuntamente com outros métodos (AMCc e AMNc).

Além disso, o nível médio de expressão do comportamento I em alvéolos AV foi semelhante ( $P > 0,05$ ) ao observado em grupos AVc. Porém, a expressão média do comportamento II (alvéolos abertos e reoperculados, permitindo a sobrevivência da sua criação) foi superior ( $P < 0,05$ ) no grupo de alvéolos AV, comparativamente ao grupo AVc.

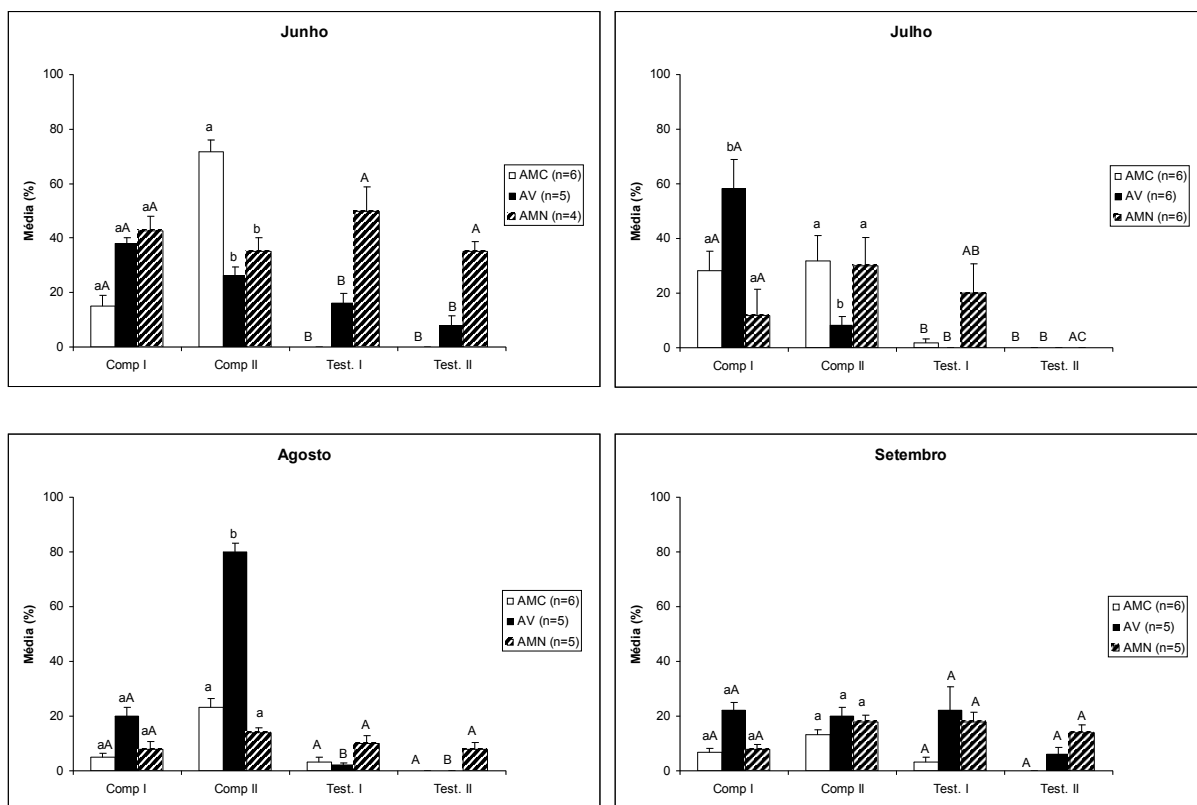
Comparando os níveis de comportamentos I e II na resposta das obreiras aos alvéolos artificialmente infestados com *V. destructor* vivas, o valor do coeficiente de correlação obtido foi negativo e estatisticamente diferente de zero ( $r = -0,52$ ;  $P < 0,05$ ), indicando que as colónias que mais manifestam o comportamento I menos tendem a manifestar o comportamento II (e vice versa). Todavia, esta associação só foi observada

em grupos de alvéolos AV. Nos grupos AVc, não foi possível encontrar uma correlação estatisticamente significativa entre os comportamentos I e II ( $r=0,12$ ;  $P>0,05$ ).

Estes resultados poderão reforçar a hipótese de que o facto de aplicarmos mais de um método de infestação por colónia poderá interferir na resposta comportamental das abelhas.

### 4.3.2. Comparação entre resultados obtidos exclusivamente em grupos de alvéolos AMC, AMN e AV.

Na Figura 4.5. apresentam-se os níveis médios mensais de comportamentos I e II, observados em colónias sujeitas a um único “método” (AMC, AMN ou AV).



**Figura 4.5** - Valores observados (média ± erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias de abelhas quando cada um dos três métodos de infestação foi o único aplicado. <sup>a, b</sup> – Médias entre métodos, diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ) entre si. <sup>A, B</sup> – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ) entre si.

Estes resultados mostram que em cada mês de estudo as obreiras sempre removeram alguma criação nos dois grupos de alvéolos testemunhas. Assinale-se, porém, que a remoção média de criação dos alvéolos não manipulados foi

numericamente inferior, mantendo-se estes praticamente inalterados. Ainda assim, entre os dois grupos de alvéolos testemunhas (Test. I e Test. II) não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) por mês de estudo, para cada uma das metodologias aplicadas.

Saliente-se, porém, que o nível médio de remoção nos grupos de alvéolos infestados foi maior e estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ), comparativamente aos grupos de alvéolos testemunha para cada uma das metodologias de infestação artificial estudadas e para a maioria dos meses. À exceção do mês de Setembro [no qual não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no nível médio de remoção entre grupos de alvéolos manipulados (com e sem introdução de ácaros) relativamente aos três métodos de infestação artificial de criação de obreira com *V. destructor* que foram aplicados,  $P > 0,05$ ].

Globalmente, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes métodos de infestação ( $P > 0,05$ ), no que respeita à resposta das colónias. Todavia, em Julho, as obreiras detectaram e removeram (comportamento I) uma percentagem média superior ( $P < 0,05$ ) de pupas e parasitas no grupo de colónias em que foi aplicado o método de infestação com ácaros vivos.

Contrariamente, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre os três métodos de infestação artificial de criação de obreira com *V. destructor* que foram estudados, relativamente à percentagem média de alvéolos abertos e fechados (comportamento II). Estas diferenças ocorreram em todos os meses, à exceção de Setembro.

No Quadro 4.4 apresentam-se os valores gerais dos comportamentos manifestados pelas colónias de abelhas como resposta aos diferentes métodos de infestação aplicados individualmente nos quatro ensaios realizados.

Estes resultados mostram que o valor da remoção média de criação entre os grupos testemunha (Test. I e Test. II) só diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) em colónias sujeitas ao “método” AMN. Apenas neste método (AMN) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) com os grupos testemunha, no que diz respeito ao comportamento de remoção de criação e ácaros (Comp. I).

Entre os vários métodos estudados (AMC, AMN e AV), a remoção média de criação e de parasitas (comportamento I) só foi estatisticamente superior ( $P < 0,05$ )



quando foi aplicado o método de infestação com ácaros vivos (37,5%). No entanto, a percentagem média de alvéolos abertos e fechados pelas abelhas permitindo a sobrevivência da sua criação foi relativamente semelhante ( $P>0,05$ ) entre os três métodos estudados.

**Quadro 4.4.** – Valores observados (média  $\pm$  erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias quando um só método de infestação foi aplicado em dois quadros por colónia e em três grupos de três colónias por cada método, nos quatro ensaios realizados em 2001.

Método de infestação	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II
	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm
AMC (n=24)	13,8 $\pm$ 3,29aA	35,0 $\pm$ 5,74a	2,1 $\pm$ 1,20aB	0,0 $\pm$ 0,00aB
AV (n=21)	35,7 $\pm$ 5,10bA	32,4 $\pm$ 6,72a	9,5 $\pm$ 5,09aB	3,3 $\pm$ 2,32aB
AMN (n=20)	16,0 $\pm$ 4,83aA	24,0 $\pm$ 4,38a	23,0 $\pm$ 6,24bA	12,5 $\pm$ 3,69bA

a, b, – Médias entre métodos, diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ) entre si. A, B – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ) entre si.

### 4.3.3. Comparação entre as diferentes metodologias de infestação de alvéolos de criação de obreiras quando aplicadas conjuntamente por colmeia

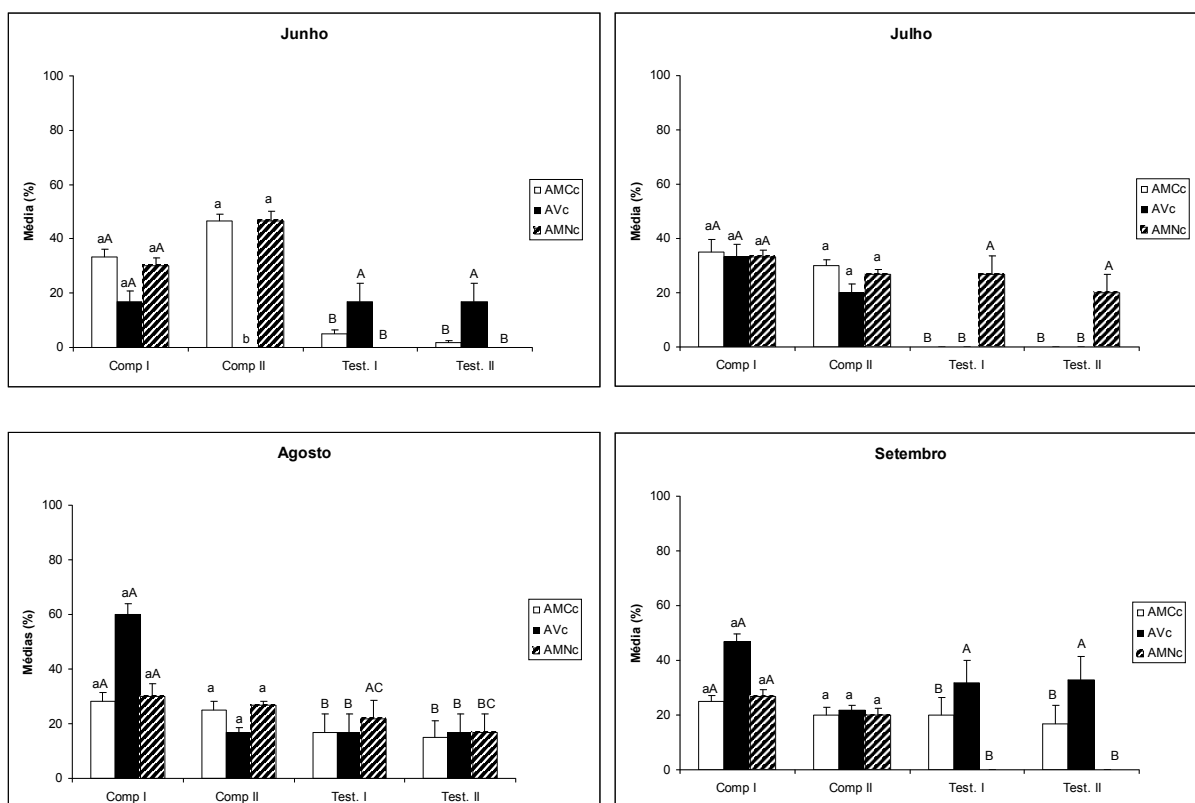
Na Figura 4.6 constam os níveis médios mensais dos comportamentos manifestados pelas colónias, quando sujeitas à testagem conjunta dos três métodos (AMC, AMN e AV).

Globalmente, as abelhas detectaram e removeram um número elevado de alvéolos testemunhas (Test. I e Test. II). Provavelmente devido ao elevado erro padrão da média (que, em alguns casos, foi igual ao valor médio) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre os grupos testemunha.

Na maioria dos casos foram observados nos grupos de alvéolos artificialmente infestados (em cada um dos meses de estudo e para cada grupo de alvéolos infestados) valores médios de remoção superiores ( $P<0,05$ ) aos observados nos grupos testemunha (I e II).

Não se observaram diferenças mensais estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre os diferentes métodos AMCc, AMNc e AVc, relativamente à percentagem média de pupas e parasitas detectados e removidos pelas obreiras (comportamento I). Paralelamente, também geralmente não foram observadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre aqueles “métodos”, relativamente à percentagem média de alvéolos abertos e fechados permitindo a sobrevivência da sua criação (comportamento II). Neste

domínio, o mês de Junho foi excepcional, dado que o comportamento II não foi manifestado no grupo de alvéolos em que foram introduzidos ácaros vivos (Figura 4.6).



**Figura 4.6** - Valores observados (média ± erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias de abelhas quando três metodologias de infestação foram aplicadas conjuntamente em cada uma delas, nos quatro ensaios realizados em 2001 (n=6, para cada método e mês). <sup>a, b</sup> – Médias entre métodos, não apresentam diferenças estatisticamente significativas (P>0,05) entre si. <sup>A, B</sup> – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente (P<0,05) entre si.

No Quadro 4.5 apresentam-se os valores globais do nível de comportamentos manifestados pelas colónias em resposta aos diferentes métodos de infestação estudados conjuntamente, bem como as correlações obtidas entre estes dois comportamentos.

Para as diferentes metodologias aplicadas os valores médios observados de remoção de criação pelas colónias foram semelhantes, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas (P>0,05) entre os diferentes grupos testemunha (I e II), provavelmente devido à variabilidade associada à detecção e remoção das crias nestes grupos.

À semelhança do nível de remoção observado nos grupos testemunha, também a percentagem média de remoção de pupas e parasitas (comportamento I) foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os diferentes métodos (AMCc, AMNc e AVc).

**Quadro 4.5.** – Valores médios observados (média  $\pm$  erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados pelas colónias em que foram aplicados conjuntamente três métodos de infestação de alvéolos de criação de obreira em dois quadros por colónia, num grupo de três colónias nos quatro ensaios realizados em 2001 ( $n=24$ ).

Método de infestação	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II
	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm
AMCc	30,4 $\pm$ 4,02aA	30,4 $\pm$ 3,68a	10,4 $\pm$ 5,73aB	8,3 $\pm$ 5,47aB
AMNc	30,0 $\pm$ 3,71aA	30,0 $\pm$ 3,51a	12,1 $\pm$ 6,02aB	9,2 $\pm$ 5,77aB
AVc	39,2 $\pm$ 5,61aA	14,6 $\pm$ 3,07b	16,3 $\pm$ 7,59aB	16,7 $\pm$ 7,77aB

a, b – Médias entre métodos, diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si. A, B – Médias dentro do mesmo método diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si.

Além disso, quando todos os métodos foram aplicados conjuntamente nos mesmos quadros de criação, a percentagem média de alvéolos desoperculados e reoperculados, pelas obreiras (permitindo a sobrevivência da sua criação; comportamento II) foi superior ( $P < 0,05$ ) quando se introduziram ácaros mortos quer por congelação (30,4%) quer naturalmente (30%), comparativamente à introdução de ácaros vivos (14,6%).

#### 4.4. Discussão

##### 4.4.1. Avaliação da resposta de colónias de abelhas melíferas à utilização de vários métodos de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com *V. destructor*, testados de forma individual ou conjunta

O comportamento de remoção manifestado pelas abelhas melíferas, como uma componente do comportamento de limpeza, foi descrito a partir dos estudos clássicos de Rothenbuher (1964a, b). Os resultados do presente trabalho demonstraram que as colónias de abelhas portuguesas são capazes de detectar alvéolos de criação de obreira infestados artificialmente com *V. destructor*.

Estas colónias reagem a um baixo nível de infestação principalmente de duas formas: (i) pela desoperulação dos alvéolos e remoção da criação parasitada (comportamento I), ou (ii) abrindo e fechando os alvéolos, permitindo a sobrevivência da sua criação (os ácaros permanecem nos alvéolos, são retirados pelas abelhas, ou podem ainda abandonar os alvéolos; comportamento II). Estes comportamentos observados em *A. mellifera* por vários autores (Boecking *et al.*, 1992; Boecking e Drescher, 1994; Boecking e Spivak, 1999; Flores Serrano *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2001, 2003) foram também observados nas colónias portuguesas avaliadas neste estudo.

As colónias testadas conseguiram claramente detectar na sua criação operculada de obreira a presença quer de ácaros mortos (independentemente do tipo de morte), quer de ácaros vivos.

Na maioria dos casos, os níveis de remoção dos alvéolos infestados com ácaros mortos foram significativamente superiores aos observados em alvéolos testemunha (I e II), independentemente do processo de morte (congelção ou natural) dos ácaros ou da aplicação (individual ou conjunta) dos três métodos.

Estes resultados permitem sugerir que ainda que o efeito da manipulação dos alvéolos possa, de certa forma, influenciar a resposta das abelhas, esta resposta é desencadeada essencialmente pela introdução de ácaros. Com efeito, a inspecção dos opérculos dos alvéolos dos grupos testemunha (I e II) que não foram removidos, permitiu verificar que estes não foram abertos nem reoperculados novamente pelas obreiras durante os ensaios.

Resultados semelhantes foram obtidos por Aumeier e Rosenkranz (2001) ao introduzirem ácaros e formigas mortos por congelação ou ainda soluções contendo os seus restos. Estes autores observaram, comparativamente ao grupo testemunha, um aumento da reacção higiénica em todas as colónias. Esta tendência corrobora aquela também observada por Flores *et al.* (2003) ao introduzirem três ácaros mortos por congelação em alvéolos de criação de obreira.

Por outro lado, o mesmo padrão comportamental foi observado ao introduzir ácaros vivos nos alvéolos de criação de obreira. Neste estudo observou-se uma maior remoção média de alvéolos infestados com ácaros vivos comparativamente aos alvéolos testemunhas [(35,7% vs. 9,5% (Test. I) e 3,3% (Test. II)]. Esta situação concorda com as tendências observadas por (Guerra *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2001, 2003).

Neste trabalho, as abelhas manifestaram maior remoção de criação e parasitas quando foi efectuada a infestação de alvéolos com ácaros vivos [35,7% vs. (13,8%; AMC) ou (16,0%; AMN)]. Contrariamente, Aumeier *et al.* (2000) observaram níveis de comportamentos semelhantes quer a infestação artificial dos alvéolos de criação tenha sido efectuada com ácaros vivos, quer com os ácaros mortos (apresentando as colónias africanizadas uma remoção média de 24,2% vs. 44,1% e as colónias cárnicas 30 vs. 37,5%, respectivamente).

Os níveis de comportamentos manifestados pelas colónias do presente estudo também diferem dos observados por Flores *et al.* (2001) ao compararem a resposta das abelhas à infestação de alvéolos de criação de obreira com ácaros mortos e vivos. Estes autores verificaram, após a introdução de três ácaros por alvéolo de criação, que não se observavam diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,686$ ) na resposta das abelhas aos ácaros vivos ou mortos, mas neste caso todos os alvéolos foram observados às 24 horas.

Normalmente, a maioria dos métodos utilizados para avaliar a resposta de remoção das obreiras perante o ácaro *V. destructor* baseiam-se na infestação artificial de alvéolos de criação operculada com varroas vivas. O nível de resposta das obreiras é avaliado após um período de tempo que varia entre 168 a 240 horas (Boecking e Spivak, 1999; Flores *et al.*, 2003). Este longo período pode influenciar os resultados devido à impossibilidade de controlar a reprodução destes ácaros e, conseqüentemente, poderem existir mais varroas (descendentes) nos alvéolos de criação, o que poderá induzir um maior nível de resposta das obreiras (Boot *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 2001;

Ibrahim e Spivak, 2006). Além disso, existe também a possibilidade dos resultados serem influenciados pela presença de outras patologias transmitidas pela varroa, as quais poderão contribuir para o nível dessa resposta (Vandame *et al.*, 1998, 2000). Desta forma, e reflectindo sobre os resultados obtidos no presente estudo poderá ser questionável se, efectivamente, o maior período de registo considerado para a interpretação dos comportamentos manifestados pelas colónias ao introduzir ácaros vivos em alvéolos de criação de obreira será necessário. Segundo Flores *et al.* (2001) o nível de resposta das obreiras é diferenciável às 24 horas, quer para os ácaros vivos quer para os mortos, o que foi também confirmado neste estudo para o caso dos ácaros mortos (independentemente do processo de morte). Assim, a execução destas metodologias de infestação pode ser simplificada se forem utilizadas varroas mortas e o período de registo dos comportamentos manifestados pelas obreiras for realizado às 24 horas.

Este aspecto parece ser importante, se a resposta higiénica perante a criação congelada não for considerada o melhor indicador para a selecção de abelhas tolerantes, como afirmam Ibrahim e Spivak (2006), e dever-se-á então utilizar a criação artificialmente infestada para seleccionar neste sentido.

No presente estudo, tal como no de Flores *et al.* (2001), não foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa quando comparamos os comportamentos I e II sobre alvéolos AMC, AMN, nas duas situações em estudo. Estes resultados sugerem que ambos os comportamentos (I e II) poderão ser manifestados de forma independente, uma vez que os coeficientes de correlação são praticamente nulos. Uma causa possível para este facto é a de que estes comportamentos possam ser executados por grupos de obreiras “especializadas” para cada uma destas componentes do comportamento higiénico perante alvéolos infestados com o ácaro *V. destructor*, corroborando os relatos de (Thakur *et al.*, 1996, 1997).

Todavia foi encontrada uma correlação negativa ( $r=-0,52$ ) entre os comportamentos I e II sobre alvéolos com AV, mas apenas na aplicação individual deste método. Aparentemente estes resultados parecem revelar que quando se introduzem AV, possivelmente existe uma maior actividade no interior dos alvéolos (como consequência da reprodução da varroa), o que poderá estimular um maior nível de resposta das obreiras “especializadas” nestes comportamentos (I e II). No caso de se aplicar mais de um método de infestação por colónia, além de um maior número de

alvéolos manipulados pode existir também uma maior actividade no interior desses alvéolos o que pode interferir na execução de cada um destes comportamentos.

Resultados semelhantes foram obtidos em estudos prévios revelando que existia uma correlação entre a resposta de remoção das colónias após a introdução de ácaros vivos de diferentes origens (Rosenkranz *et al.*, 1993; Boot *et al.*, 1999). Posteriormente, também (Flores *et al.*, 2001) obtiveram uma correlação positiva ( $r=0,49$ ) entre o comportamento higiénico manifestado pelas obreiras e o número de varroas por alvéolo (alvéolos de criação infestados com duas e três varroas vivas).

Os resultados do presente estudo mostram também, que as abelhas limpam maiores percentagens de alvéolos infestados quando são testados vários métodos em simultâneo dentro de uma mesma colónia, provavelmente por se ter infestado/manipulado um maior número de alvéolos por quadro de criação.

Isto significa que aparentemente a aplicação simultânea de vários métodos de infestação de alvéolos na mesma colónia, poderá influenciar consideravelmente o comportamento manifestado pelas obreiras, em conformidade com a opinião de Janmaat e Winston (2000) ao afirmarem que a capacidade higiénica de colónias de *A. mellifera* varia em função das suas próprias condições gerais.

Por outro lado, os resultados deste estudo, seguindo a tendência geral observada para os grupos AMC, AMN e AV, sugerem ainda que aparentemente o efeito do mês em que estes métodos são aplicados, também parece influenciar a resposta das colónias de abelhas melíferas nesta região. Tendências semelhantes foram também observadas por vários autores (Spivak e Gilliam, 1993; Boecking e Drescher, 1994; Spivak, 1996).

Em virtude das razões anteriormente referidas, no Capítulo 5 serão aplicados de forma independente e em várias estações do ano cada um dos métodos de infestação de criação operculada de obreira de forma a avaliar qual o método mais indicado para a região em estudo.

### **4.3.5 Conclusões**

As colónias de abelhas melíferas portuguesas executam o comportamento higiénico face a criação infestada com ácaros mortos (independentemente do processo de morte estudado) da mesma forma e numa extensão similar. Todavia, esta resposta higiénica é muito mais evidente quando os alvéolos de criação de obreiras são infestados com ácaros vivos.

A aplicação de várias metodologias de infestação em simultâneo, aparentemente, interfere na resposta comportamental das colónias, o que contribui para afirmarmos que neste tipo de estudos estas metodologias de infestação da criação operculada de obreira devem ser aplicadas individualmente por colmeia, de forma a não interferirem umas com as outras.



#### 4.6 Referências bibliográficas selecionadas

Aumeier, P.; Rosenkranz, P. e Gonçalves, L. S. 2000. A comparison of the response of Africanized and European (*Apis mellifera carnica*) honey bees to *Varroa*-infested brood in tropical Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **23**: 787-791.

Aumeier, P. e Rosenkranz, P. 2001. Scent or movement of *Varroa* destructor mites does not elicit hygienic behaviour by Africanized and Carniolan honey bees. *Apidologie* **32**: 253-263.

Boecking, O. e Drescher, W. 1991. Response of *Apis mellifera* L. colonies infested with *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **22**: 237-241.

Boecking, O.; Rath, W. e Drescher, W. 1992. *Apis mellifera* removes *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae* from sealed brood cells in the topics. *American Bee Journal* **132**: 732-734.

Boecking, O. e Ritter, W. 1993. Grooming and removal behavior of *Apis mellifera* intermissa in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* **32**: 127-134.

Boecking, O. e Drescher, W. 1994. Rating of signals that trigger *Apis mellifera* L. bees to remove mite-infested brood. *Apidologie* **25**: 459-461.

Boecking, O. e Spivak, M. 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**: 141-158.

Boot, W. J.; Calis, J. e Beetsma, J. 1995. Dutch-Vietnamese working group on reproductive behaviour of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* in colonies of the honeybee species *Apis mellifera* and *A. cerana*, Department of Entomology, Wageningen Agricultural University, Moc Chau, Vietnam.

Boot, W. J.; Calis, J. N. M.; Beetsma, J.; Dong, M. H.; Lan, N. K.; Tran, V. T.; T., L. Q. e Nguyen, H. M. 1999. Natural selection of *Varroa jacobsoni* explains the different reproductive strategies in colonies of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Experimental and Applied Acarology* **23**: 133-144

Büchler, R. 1994. *Varroa* tolerance in honey bees - occurrence, characters and breeding. *Bee World* **75**: 54-70.

Büchler, R. 2000. Design and success of a German Breeding Program for *Varroa* tolerance. *American Bee Journal* **140**: 662-665.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E.; Delatte, G. T. e Macchiavelli, R. E. 1996. *Varroa jacobsoni* Oudemans tolerance in selected stocks of *Apis mellifera* L. *Apidologie* **27**: 193-210.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E.; Stelzer, J. A.; Beaman, L. e Harper, C. 2001. An evaluation of Far-Eastern Russian honey bees and other methods for the control of tracheal mites. *American Bee Journal* **141**: 737-741.

De Guzman, L. I.; Rinderer, T. E.; Stelzer, J. A.; Beaman, L.; Delatte, G. T. e Harper, C. 2002. Hygienic behavior by honey bees from Far-Eastern Russia. *American Bee Journal* **142**: 58-60.

Flores, J. M.; Ruiz, J. A.; Ruz, J. M.; Puerta, F. e Bustos, M. 2001. Hygienic behavior of *Apis mellifera iberica* against brood cells artificially infested with varroa. *Journal of Apicultural Research* **40**: 29-34.

Flores, J. M.; Puerta, F.; Ruiz, J. A. e Calero, M. J. 2003. A note on the use of dead Varroa mite in the study of the removal behaviour of the honey bee. *Revista Ibérica de Parasitologia* **63**: 5-8.

Guerra, J., J.C.; Gonçalves, L. S. e De Jong, D. 2000. Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) are more efficient at removing worker brood artificially infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans than are Italian bees or Italian/Africanized hybrids. *Genetics and Molecular Biology* **23**: 89-92.

Harbo, J. R. e Harris, J. W. 1999a. Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Economic Entomology* **92**: 261-265.

Harbo, J. R. e Harris, J. W. 1999b. Selecting honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **30**: 183-196.

Harbo, J. R. e Harris, J. W. 2001. Resistance to *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varridae) when mite-resistant queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) were free-mated with unselected drones. *Journal of Economic Entomology* **94**: 1319-1323.

Harbo, J. R. e Hoopingarner, R. A. 1997. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) in the United States that express resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Economic Entomology* **90**: 893-898.

Harris, J.; Rinderer, T. E.; Kuznetsov, V.; Danka, R.; Delatte, G.; De Guzman, L. e Villa, J. 2002. Imported Russian Honey bees: Quarantine and initial selection for varroa resistance. *American Bee Journal* **142**: 591-596.

Harris, J. W. e Harbo, J. R. 1999. Low sperm counts and reduced fecundity of mites in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) that are resistant to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Economic Entomology* **92**: 83-90.

Harris, J. W. e Harbo, J. R. 2000. Changes in reproduction of *Varroa destructor* after honey bee queens were exchanged between resistant and susceptible colonies. *Apidologie* **31**: 689-699.

Harris, J. W.; Harbo, J. R.; Villa, J. D. e Danka, R. G. 2003. Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) during a 10-year period. *Journal of Environmental Entomology* **32**: 1305-1312.

Ibrahim, A. e Spivak, M. 2006. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bees (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* **37**: 31-40.

Ifantidis, M. D. 1983. Ontogenesis of the mite *Varroa Jacobsoni* in the worker and drone honeybee cells. *Journal of Apicultural Research* **22**: 200-206.

Janmaat, A. F. e Winston, M. L. 2000. Removal of *Varroa jacobsoni* infested brood in honey bee colonies with differing pollen stores. *Apidologie* **31**: 377-385.

Kefuss, J.; Taber III, S.; VanPoucke, J. e Rey, F. 2003. Breeding for varroa resistance: how we do it. In: Proceedings of the XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia. p 187-188.

Kefuss, J.; VanPoucke, J.; Ducos de Lahitte, J. e Ritter, W. 2004. Varroa tolerance in France of Intermissa bees from Tunisia and their naturally mated descendants: 1993-2004. *American Bee Journal* **144**: 563-568.

Kulinčević, J. M.; De Guzman, L. e Rinderer, T. E. 1997. Selection of honey bees tolerant or resistant to *Varroa jacobsoni*. In: CIHEAM (Ed.) The varroosis in the Mediterranean region. Cahiers Options Méditerranéennes No. 21. pp 59-75. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes (CIHEAM), Granada, Spain.

Palacio, M. A.; Figini, E. E.; Ruffinengo, S. R.; Rodriguez, E. M.; Del Hoyo, M. L. e Bedascarrasbure, E. L. 2000. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* **31**: 471-478.

Rath, W. 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**: 97-100.

Rembold, H.; Krämer, J. P. e Ulrich, G. H. 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **11**: 29-38.

Rinderer, T. E.; De Guzman, L. I. e Kulinčević, J. M. 1993. The breeding, importing, testing and general characteristics of Yugoslavian honey bees bred for resistance to *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal* **133**: 197-200.

Rinderer, T. E.; Delatte, G. T.; De Guzman, L.; Williams, J.; Stelzer, J. A. e Kuznetsov, V. N. 1999. Evaluations of the Varroa-resistance of honey bees imported from Far-Eastern Russia. *American Bee Journal* **139**: 287-290.

Rinderer, T. E.; De Guzman, L. I.; Delatte, G. T.; Stelzer, J. A.; Lancaster, V. A.; Kuznetsov, V.; Beaman, L.; Watts, R. e Harris, J. W. 2001a. Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees from Far-Eastern Russia. *Apidologie* **32**: 1-14.

Rinderer, T. E.; De Guzman, L. I.; Delatte, G. T.; Stelzer, J. A.; Williams, J. L.; Beaman, L. D.; Kuznetsov, V.; Bigalk, M.; Bernard, S. J. e Tubbs, H. 2001b. Multi-state field trials of ARS Russian honey bees. 1. Responses to *Varroa destructor* 1999, 2000. *American Bee Journal* **141**: 658-661.

Rosenkranz, P.; Tewarson, N. C.; Singh, A. e Engels, W. 1993. Differential hygienic behavior towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to the mites. *Journal of Apicultural Research* **32**: 89-93.

Rosenkranz, P.; Fries, I.; Boecking, O. e Stumer, M. 1997. Damaged Varroa mites in the debris of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies with and without hatching brood. *Apidologie* **28**: 427-437.

Rosenkranz, P. 1999. Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie* **30**: 159-172.

Ruijter, A. 1987. Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive cycles of the honeybee. *Apidologie* **18**: 321-326.

Spivak, M. 1996. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **27**: 245-260.

Spivak, M. e Gilliam, M. 1993. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research* **32**: 147-157.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 1998a. Honey bee hygienic behavior. *American Bee Journal* **138**: 283-286.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 1998b. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie* **29**: 291-302.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 2001. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology* **94**: 326-331.

Spivak, M. e Reuter, G. S. 2005. A sustainable approach to controlling honey bee diseases and varroa mites. <http://www.sare.org/publications/factsheet/0305.htm>. Visitada a 15/09/05.

Szabo, T. I. e Szabo, D. C. 2000. Attempts to reduce the *Varroa jacobsoni* populations in honey bee colonies: research report for 1999. *American Bee Journal* **140**: 654-658.

Thakur, R. K.; Bienenfeld, K. e Keller, R. 1996. Beobachtungen zum Abwehrverhalten von *Apis mellifera carnica* gegenüber *Varroa jacobsoni* mittels Infrarot-Videokamera-Aufnahmen. *Apidologie* **27**: 286-288.

Thakur, R. K.; Bienenfeld, K. e Keller, R. 1997. *Varroa* defense behavior in *Apis mellifera carnica*. *American Bee Journal* **137**: 143-148.

Vandame, R. 1996. Importance de l'hybridation de l'hôte dans la tolérance à un parasite. Cas de l'acarien parasite *Varroa jacobsoni* chez les races d'abeilles *Apis mellifera* européenne et africanisée, en clima tropical humide du Mexique. PhD Thesis, Institut d'Analyse des Systèmes Biologiques et Socio-économiques, Lyon, France.

Vandame, R.; Colin, M. e Colina, G. O. 1998. Abejas europeas y abejas africanizadas en México: la tolerancia a *Varroa jacobsoni*. <http://www.apiservices.com/articulos/vandame/index.htm>. Visitada em 25/02/2003.

Vandame, R.; Colin, M.; Morand, S. e Otero-Colina, G. 2000. Levels of compatibility in a new host-parasite association: *Apis mellifera*/*Varroa jacobsoni*. *Canadian Journal of Zoology* **78**: 2037-2044.



## Capítulo 5

### **Análise comparativa dos níveis de expressão de comportamento higiénico relativamente aos vários métodos estudados de infestação artificial de alvéolos de criação operculada de obreira com *V. destructor***

---

#### **5.1. Introdução**

O enquadramento dos estudos realizados neste capítulo, no contexto mais lato do estado actual do conhecimento neste domínio, foi efectuado na secção “4.1. Introdução” do capítulo anterior. Todavia, importa ainda explicitar nesta secção os principais objectivos prosseguidos com a realização do estudo relatado neste capítulo. Assim, os objectivos específicos deste estudo foram:

(1) avaliar a relação entre o nível de comportamento higiénico manifestado pelas H e NH e a sua resposta perante distintos métodos de infestação de criação de obreira com *V. destructor*; aplicados de forma independente em várias estações do ano;

(2) comparar o perfil comportamental das colónias H e NH entre os distintos métodos de infestação de alvéolos de criação com *V. destructor*; e

(3) eleger, de entre os vários métodos de infestação, o mais indicado (por questões de ordem prática), para a avaliação do nível de comportamento de remoção da criação e de ácaros no âmbito de um futuro programa de melhoramento genético.



## 5.2. Material e métodos

### 5.2.1. Apiário experimental

Neste estudo foram utilizadas 8 colmeias e foram realizados 3 ensaios (na Primavera, no Verão e no Outono, entre os meses de Junho a Outubro de 2002). As colónias foram as mesmas utilizadas no Capítulo 3 (Estudo 2), pelo que a localização da área de estudo e a sua caracterização foi já apresentada nesse Capítulo. Neste estudo, um total de 8 colónias [equidistribuídas pelos grupos H e NH em 2001, com base na sua resposta à criação morta por congelação (Capítulo 3, Estudo 1)], foram submetidas a distintos métodos de infestação de alvéolos de criação operculada de obreira com *V. destructor* aplicados de forma independente e consecutivamente no mesmo período de testagem (por estação do ano), no sentido de investigar a sua resposta comportamental.

Todas as colónias foram alojadas em colmeias de modelo Langstroth, com 10 quadros por ninho, com estrados adaptados para a recolha de ácaros, e mantidas no sistema tradicional de produção. Todas as colónias derivaram de enxames locais com rainhas acasaladas naturalmente. Durante todo o período de estudo, a população de abelhas adultas ocupou um espaço compreendido entre cinco a dez quadros por colmeia.

O maneiio das colónias foi conservador (isto é, não se aplicaram estratégias de intensificação de produções). Além disso, houve uma grande preocupação no sentido de prevenir o processo de enxameação durante Primavera. Para esse efeito foram consideradas essencialmente duas medidas. A primeira visou o corte da extremidade das asas anteriores das rainhas, de forma a evitar que estas levantassem voo com os seus eventuais respectivos enxames, procedimento este que ocorreu momentos após a sua marcação. A segunda medida teve como princípio aumentar o espaço disponível para a postura da rainha e armazenamento de reservas, ao nível das colónias. Este procedimento foi efectuado, aproximadamente, duas semanas antes de se tornar necessário.

No início da Primavera do ano de 2002 foram realizados tratamentos preventivos para redução do crescimento populacional das varroas. Neste sentido, todas as colónias foram tratadas com duas tiras de Apistan® (Fluvalinato, 800 mg por tira), após a quantificação prévia dos respectivos graus de infestação com varroa. O grau de

infestação foi determinado em abelhas adultas, segundo o método adoptado por (Vandame, 1996).

Antes do início de cada ensaio (na Primavera) não foram praticamente detectados ácaros em nenhuma das colónias. No entanto, com o decurso do tempo ocorreu a reinfestação de todas as colónias, devido a causas naturais (tais como a deriva e a pilhagem entre colónias).

### **5.2.2. Método de infestação artificial da criação operculada de obreira**

Em 2002, oito colónias identificadas no ano de 2001 como H ou NH (n=4) (com base no seu comportamento higiénico, avaliado através do método de morte da criação de obreira por congelação; Capítulo 3 Estudo 1) foram individual (2 quadros por colmeia) e consecutivamente infestadas por três processos distintos. Estes processos diferem entre si pelo estado dos ácaros (vivos e/ou mortos) e para este efeito foram utilizados os três métodos (AMC, AMN, AV) anteriormente referidos no Capítulo 4.

A criação utilizada encontrava-se no estado de pupa, de 7 dias após a operculação, correspondendo a pupas brancas com olhos pigmentados (vermelho acastanhado) (Rembold *et al.*, 1980). Foi escolhida esta idade da criação pela facilidade do seu reconhecimento. Ainda assim, no sentido de a estimar com maior precisão e para possibilitar a sua posterior localização, marcou-se, numa folha de acetato, os alvéolos de criação que tinham sido aproximadamente operculados nas últimas 24 horas.

Todos os ácaros foram recolhidos de quadros com criação de obreira na fase de operculação e procederam de colmeias dadoras altamente parasitadas mantidas num apiário localizado a uma distância superior a 5 Km (tal como descrito no capítulo anterior). O estado reprodutivo das *V. destructor* no momento da recolha e da introdução era desconhecido. No entanto, apenas foram introduzidos ácaros totalmente pigmentados.

As *V. destructor* foram introduzidas nos alvéolos através de uma pequena abertura na parte lateral do opérculo efectuada com um bisturi, como anteriormente mostrado no Capítulo 4 (Ruijter, 1987; Boecking e Ritter, 1993; Janmaat e Winston, 2000). Cada alvéolo foi infestado com três ácaros e depois cuidadosamente fechado. Foram utilizadas 3 varroas mortas e os alvéolos foram observados após 24 horas de infestação,

uma vez que, Flores *et al.* (2001) comprovaram que as obreiras reagem de forma clara, no período de 24 horas, a este número de varroas.

O primeiro método consistiu na infestação de alvéolos de criação com três ácaros mortos por congelação (AMC). O processo de morte consistiu na congelação de ácaros a -20°C durante 48 horas. Estes ácaros foram posteriormente descongelados, duas a três horas, aproximadamente, antes da sua introdução nos alvéolos de criação.

O segundo método (AMN) consistiu na infestação de alvéolos com três ácaros mortos naturalmente. Estes, após a sua recolha foram colocados em placas de petri, permanecendo a temperatura ambiente até perecerem.

O terceiro método (AV) consistiu na infestação de alvéolos com três ácaros vivos. Os ácaros vivos, recolhidos de alvéolos de criação de obreira, foram mantidos sobre as pupas, numa incubadora a 34°C durante 24 a 48 horas prévias à sua utilização.

Em cada quadro foram utilizados 3 grupos de 10 alvéolos com criação operculada de obreiras. No primeiro grupo foram introduzidos os ácaros; no segundo (testemunha I), os alvéolos foram abertos e fechados sem introduzir parasitas e no terceiro (testemunha II), os alvéolos não foram manipulados. Este terceiro grupo, sem qualquer manipulação, visava monitorizar o possível canibalismo das abelhas durante o período experimental, de acordo com a metodologia descrita por Boecking e Ritter (1993). Estes grupos foram marcados em folhas de acetato, tal como sugerido por Ifantidis (1983).

Os quadros foram colocados nas suas respectivas posições dentro das colmeias. A resposta comportamental das abelhas foi avaliada 24 horas após a infestação com ácaros mortos e 240 horas após a infestação com ácaros vivos.

A inspeção microscópica dos opérculos [lupa binocular, (Leica MZ 12.5)] dos alvéolos que não foram removidos pelas abelhas permitiu verificar se estas abriram, examinaram e construíram novos opérculos (Boecking e Spivak, 1999).

Paralelamente, a inspeção dos alvéolos que não foram removidos permitiu verificar se as abelhas abriram, libertaram ou removeram os ácaros, ou então, se estes permaneciam sobre a criação. Assim, cada alvéolo de criação operculada aparentemente intacto (não tocado pelas abelhas) foi aberto, a pupa removida com a ajuda de uma pinça, e as paredes dos alvéolos foram cuidadosamente examinadas para verificar a presença do ácaro introduzido.

O comportamento higiénico foi avaliado através do registo da percentagem alvéolos de criação manipulados pelas abelhas, representando estes a sua resposta.

Nos resultados avaliaram-se dois comportamentos: o comportamento I, no qual as abelhas limpam completamente os alvéolos parasitados, retirando os parasitas e a criação de obreiras e o comportamento II, no qual as abelhas desopercularam e reopercularam os alvéolos, retirando um ou mais parasitas (no caso do ácaro não ter abandonado os alvéolos) mas não a criação.

### **5.2.3. Métodos de análise estatística**

A análise estatística dos resultados foi efectuada através do software SAS (1998).

A normalidade dos dados, relativos aos níveis de comportamento higiénico manifestados pelas abelhas, foi avaliada pelo teste W de Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene. Como os dados não seguiam uma distribuição normal, foram submetidos a uma análise de variância não paramétrica utilizando o procedimento NPAR1WAY do software SAS (1998).

Para a comparação múltipla entre os valores médios dos comportamentos I e II manifestados pelas colónias num mesmo método de infestação, utilizou-se o teste de Friedman. Para a testagem de diferenças significativas entre os vários grupos de alvéolos (infestados, manipulados e não manipulados) optou-se pelo teste “Wilcoxon Matched Pairs”.

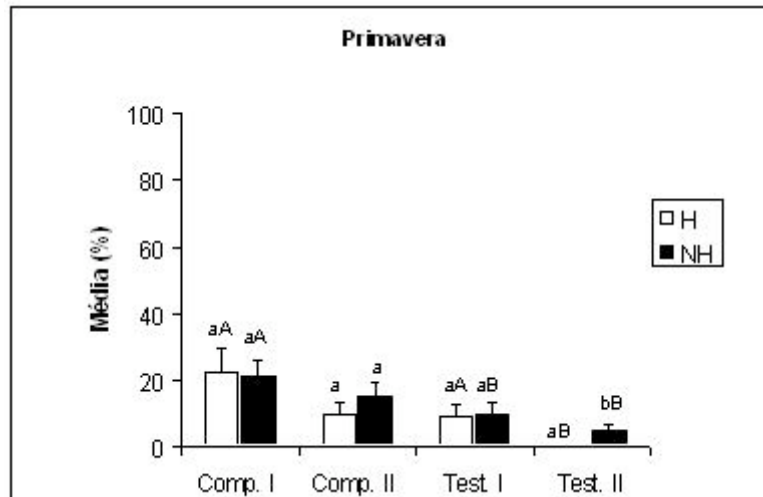
As diferenças entre os três métodos de infestação, nas várias estações do ano em estudo, foram comparadas duas a duas utilizando o teste Kruskal-Wallis. As diferenças entre os valores médios dos distintos grupos de alvéolos (infestados, manipulados e não manipulados) e dos dois comportamentos manifestados pelas colónias (comportamento I e II) entre diferentes métodos (AMC, AMN e AV) foram comparadas, duas a duas, utilizando o teste Mann-Whitney.

A relação entre os comportamentos I e II (dentro do mesmo método e entre métodos) foi analisada pelo coeficiente de correlação de Spearman's.

### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Estudo do perfil comportamental das colónias higiénicas e não higiénicas como resposta à infestação da criação de obreira com ácaros mortos por congelação (AMC)

Na Figura 5.1 constam os valores observados (às 24 horas) da resposta das colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) à infestação de alvéolos operculados de criação de obreira com AMC, na Primavera de 2002.

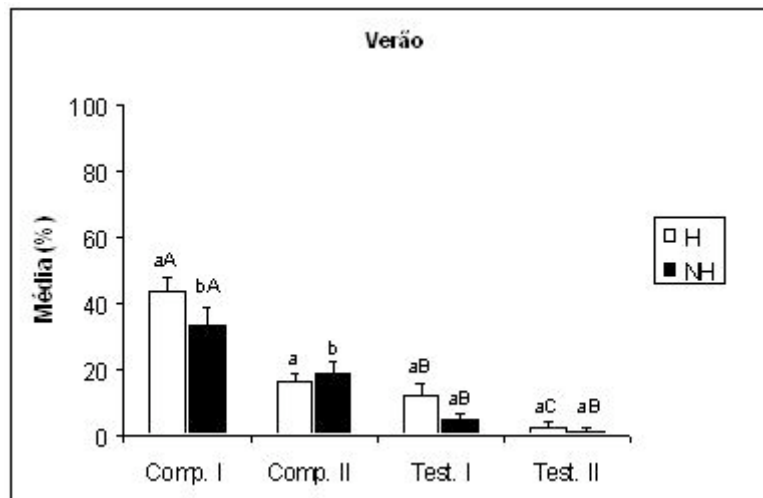


**Figura 5.1** – Valores observados do perfil comportamental (media  $\pm$  erro padrão da media, %) de 4 colónias higiénicas (H) e 4 não higiénicas (NH) como resposta ao método de infestação AMC [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] na Primavera de 2002. a, b – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). A, B – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Na Primavera as colónias H apenas detectaram e removeram alvéolos do grupo testemunha I, tendo sido o nível médio de remoção da criação estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ), comparativamente com o grupo testemunha II. Aliás, para estas colónias também não se observaram diferenças estatisticamente significativas de comportamento I ( $P > 0,05$ ) entre os alvéolos com AMC e os alvéolos manipulados (sem introdução de ácaros), provavelmente devido à elevada variabilidade entre colónias H. Contrariamente no grupo de colónias NH, não se observaram diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre a percentagem média de remoção dos alvéolos testemunhas (I e II), mas entre estes e os alvéolos infestados esta percentagem

diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ). Globalmente, entre colónias H e NH o perfil higiénico manifestado revelou-se tendencialmente semelhante em todos os grupos de alvéolos manipulados, não tendo sido observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre estes.

Os valores médios observados (às 24 horas) dos comportamentos revelados pelas colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) perante a infestação de alvéolos de criação de obreira com AMC no Verão de 2002 encontram-se representados na Figura 5.2.



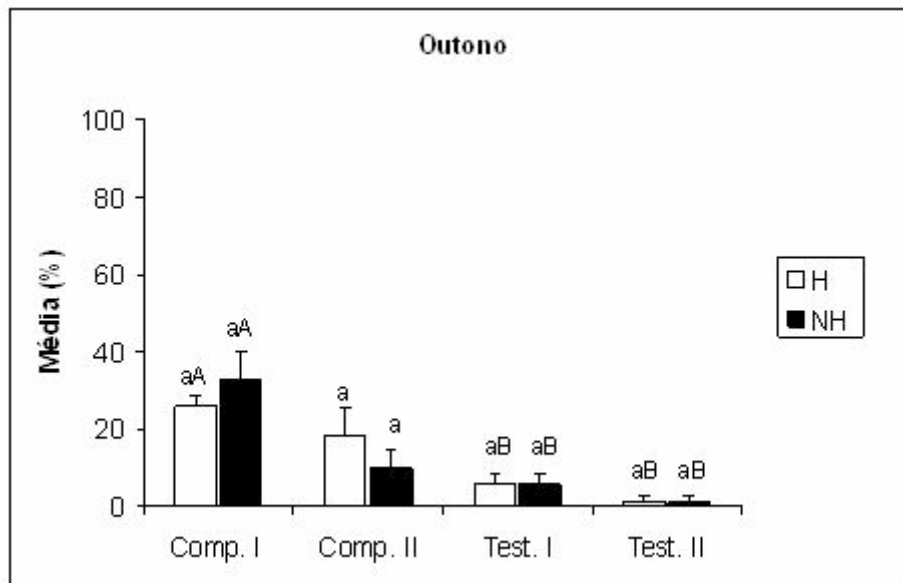
**Figura 5.2** – Valores observados do perfil comportamental (média  $\pm$  erro padrão da média, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMC [aplicado em 2 quadros por colmeia ( $n=8$ )] no Verão de 2002. <sup>a, b</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A, B, C</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Nesta estação do ano, quer as colónias H quer as NH detectaram e removeram alguns alvéolos dos grupos testemunhas (I e II). Porém, a remoção média observada entre estes dois grupos apenas diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) ao nível das colónias H. Ambos os grupos de colónias (H ou NH) revelaram uma remoção média de ácaros e crias maior ( $P < 0,05$ ) do que as observadas em alvéolos manipulados (sem introdução de ácaros). Isto significa que o efeito da introdução de ácaros nos alvéolos de criação de obreiras exerce uma maior influencia no comportamento manifestado pelas obreiras do que a simples manipulação desses alvéolos.

Os níveis de comportamento I revelado pelo grupo de colónias H (43,8%) e NH (33,8%), foram estatisticamente semelhantes ( $P > 0,05$ ). Contudo, observa-se uma diferenciação significativa ( $P < 0,05$ ) ao nível da manifestação do comportamento II, e na detecção e remoção de alvéolos do grupo testemunha I.

Estes resultados mostram que apesar de existir uma certa tendência para uma maior detecção e remoção de alvéolos infestados pelas colónias H, esta não é estatisticamente relevante.

Os valores médios observados (às 24 horas) dos comportamentos revelados pelas colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) perante a infestação de alvéolos de criação de obreira com AMC no Outono de 2002 encontram-se representados na Figura 5.3.



**Figura 5.3** – Valores observados do perfil comportamental (média  $\pm$  erro padrão da média, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMC [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=7)] no Outono de 2002. <sup>a, a</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ). <sup>A, B</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P<0,05$ ).

Quer as colónias H, quer as NH manifestaram níveis semelhantes ( $P>0,05$ ) de comportamento de remoção entre os grupos testemunhas I (5,7%) e II (1,4%). Contudo, entre estes grupos e os alvéolos infestados com AMC verificou-se uma diferenciação acentuada e estatisticamente significativa ( $P<0,05$ ) em cada um dos dois grupos de colónias H (25,7%) e NH (32,9%).

No Quadro 5.1 constam os valores observados (às 24 horas) da resposta das colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) à infestação de alvéolos operculados de criação de obreira com AMC entre estações do ano de 2002.

## Capítulo 5 - Níveis de expressão de comportamento higiénico

**Quadro 5.1.** Valor observado do perfil comportamental (média  $\pm$  erro padrão da média, %) de 4 colónias H ou 4 NH como resposta ao método AMC aplicado em 2 quadros por colmeia entre as estações do ano de 2002.

Colónias H				
AMC	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II
	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm
Primavera (n=8)	22,5 $\pm$ 7,26A	10,0 $\pm$ 3,27A	8,8 $\pm$ 3,98A	0,0 $\pm$ 0,00A
Verão (n=8)	43,8 $\pm$ 3,75B	16,3 $\pm$ 2,63A	12,5 $\pm$ 3,13A	2,5 $\pm$ 1,64A
Outono (n=7)	25,7 $\pm$ 2,97A	18,6 $\pm$ 6,70A	5,7 $\pm$ 2,97A	1,4 $\pm$ 1,43A
Colónias NH				
Primavera (n=8)	21,3 $\pm$ 4,80A	15,0 $\pm$ 4,23A	10,0 $\pm$ 3,27A	5,0 $\pm$ 1,89A
Verão (n=8)	33,8 $\pm$ 5,32A	18,8 $\pm$ 3,50A	5,0 $\pm$ 1,89A	1,3 $\pm$ 1,25A
Outono (n=7)	32,9 $\pm$ 6,80A	10,0 $\pm$ 4,88A	5,7 $\pm$ 2,97A	1,4 $\pm$ 1,43A

<sup>A, B</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras diferentes, são estatisticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

Ao comparar a resposta das colónias H entre estações do ano, as maiores diferenças médias observadas na remoção de criação e parasitas verificaram-se entre o Verão e a Primavera (43,8 e 22,5%) e entre o Verão e o Outono (43,8 e 25,7%), as quais diferiram estatisticamente ( $P < 0,01$ ) unicamente ao nível deste grupo de alvéolos e para este comportamento.

Tendência semelhante foi observada no grupo de colónias NH, embora a expressão dos comportamentos I e II face ao grupo de alvéolos infestados com AMC, manipulados e não manipulados tenha sido semelhante ( $P > 0,05$ ) entre as várias estações do ano. Uma das razões possíveis para esta situação poderá estar relacionada com uma maior variabilidade observada entre estas colónias na Primavera e também no Outono.

As percentagens médias globais anuais dos comportamentos manifestados pelas colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) à introdução de três ácaros mortos por congelação estão representadas no Quadro 5.2.



**Quadro 5.2.** Valores médios (média  $\pm$  erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método AMC no total dos ensaios realizados em 2002 (n=23).

AMC	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II	Comp. I/ Comp. II
Higiénicas (H)	30,9 $\pm$ 3,50aA	14,8 $\pm$ 2,50a	9,1 $\pm$ 1,98aB	1,3 $\pm$ 0,72aC	r= 0,165 NS
Não higiénicas (NH)	29,1 $\pm$ 3,32aA	14,8 $\pm$ 2,42a	7,0 $\pm$ 1,60aB	2,6 $\pm$ 0,94aC	r= - 0,421*

<sup>a, a</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente (P>0,05). <sup>A, B, C</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH) médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas (P<0,01). r = Coeficiente de correlação de Spearman; NS – Não significativo (P>0,05); \* - Significativo para P=0,05.

Nos resultados médios do total de ensaios realizados em 2002, verificou-se que as diferenças observadas entre os grupos de alvéolos testemunhas (I e II), bem como, entre estes e os alvéolos infestados com AMC diferiram estatisticamente (P<0,01) para cada um dos dois grupos de colónias (H ou NH).

Por outro lado, após a realização dos três ensaios (Primavera, Verão e Outono) em 2002, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (P>0,05) entre os grupos de colónias H e NH na expressão do comportamento I e II, tal como nos grupos testemunha I e II. O que nos permite afirmar que, independentemente das colónias estarem classificadas em distintos graus de higiene a sua resposta à metodologia aplicada foi semelhante, isto é, o efeito grau de higiene (H e NH) não foi relevante na manifestação destes comportamentos.

Não existiu uma correlação estatisticamente significativa entre ambos os comportamentos I e II, na resposta das obreiras relativamente aos alvéolos infestados com AMC, no grupo de colónias H (r=0,165; P>0,05). Situação inversa observou-se no grupo de colónias NH (r= -0,421; P<0,05), sugerindo que, quando se introduzem ácaros mortos por congelação, aparentemente as obreiras manifestam ambos os comportamentos de forma independente em colónias H, mas estes comportamentos encontram-se correlacionados negativamente no grupo de colónias NH.

As percentagens médias globais anuais dos comportamentos manifestados pelas colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH), como resposta ao método AMC e ao teste de morte da criação por congelação (CHT), estão representadas no Quadro 5.3.

**Quadro 5.3.** Valores médios (média  $\pm$  erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas obreiras de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método AMC e ao teste de morte da criação de obreira por congelção, no total dos ensaios realizados em 2002 (n=12).

AMC	CHT	Comp. I	CTH/ Comp. I
	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm	
Higiénicas (H)	73,8 $\pm$ 7,84aA	30,4 $\pm$ 4,28aB	r= - 0,028 NS
Não higiénicas (NH)	63,2 $\pm$ 5,45aA	30,0 $\pm$ 4,04aB	r= 0,210 NS

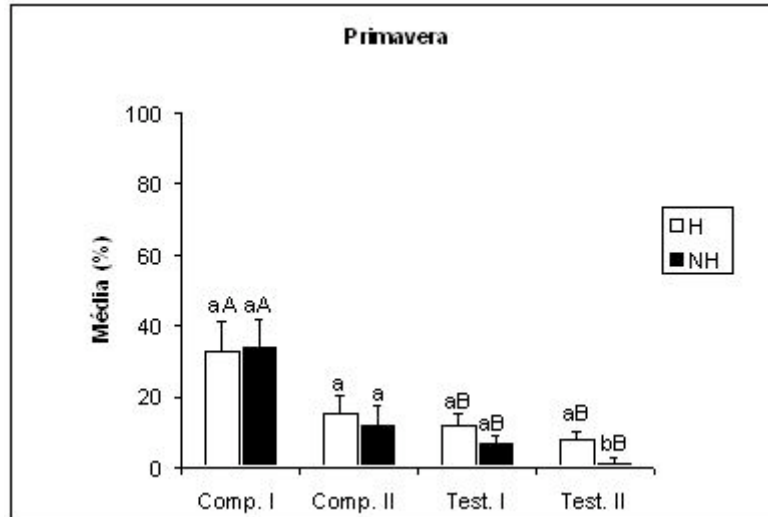
<sup>a, a</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas (P>0,05). <sup>A, B</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas (P<0,001). r = Coeficiente de correlação de Spearman; NS – Não significativo (P>0,05).

Quer as colónias H, quer as colónias NH revelaram o mesmo nível de resposta relativamente aos alvéolos infestados com AMC, não tendo sido observadas diferenças médias estatisticamente significativas (P>0,05) entre os diferentes métodos utilizados para avaliação de cada um destes comportamentos.

Na resposta de cada um dos dois grupos de colónias (H ou NH) às diferentes metodologias utilizadas no mesmo ano de estudos, foram observadas diferenças médias estatisticamente significativas (P<0,001) entre ambos os comportamentos (CHT e Comp. I). Todavia não se obteve uma correlação estatisticamente significativa (P>0,05) entre esses comportamentos, o que sugere que quando se introduzem AMC as obreiras manifestam ambos os comportamentos de forma independente.

### **5.3.2. Estudo do perfil comportamental de colónias higiénicas e não higiénicas à infestação da criação operculada de obreira com ácaros mortos naturalmente (AMN)**

Na Figura 5.4 constam os valores médios (observados às 24 horas) dos comportamentos manifestados pelas colónias H e NH, como resposta ao método de infestação com AMN na Primavera de 2002.



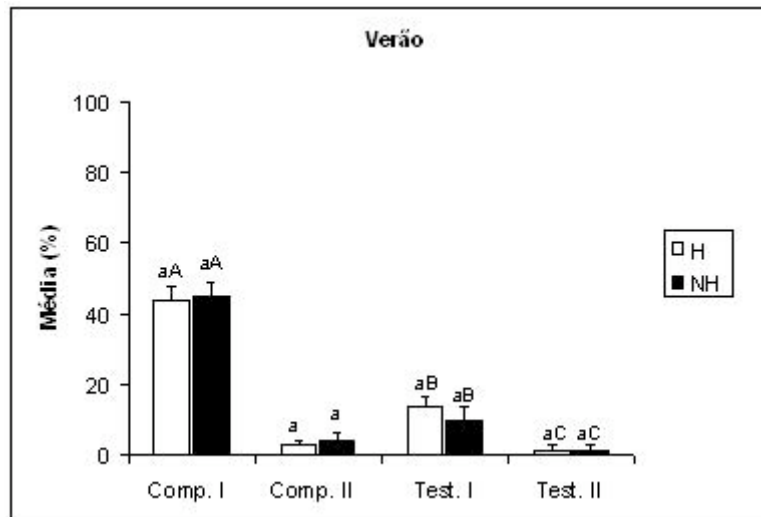
**Figura 5.4** – Valores observados do perfil comportamental (media  $\pm$  erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMN [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] na Primavera de 2002. <sup>a, b</sup> –Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A, B</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Quer o grupo de colónias H, quer o grupo das colónias NH, mostraram alguma reacção à de manipulação de alvéolos de criação (Test. I), mas esse nível de reacção entre os grupos de alvéolos testemunha (Test. I e II) não diferiu estatisticamente ( $P > 0,05$ ) nesta estação do ano. Porém, observaram-se maiores reacções ( $P < 0,05$ ) dirigidas aos alvéolos infestados com AMN, comparativamente aos grupos testemunha. Isto significa que a reacção das obreiras dos grupos de colónias H e NH foi acentuadamente maior quando se infestaram alvéolos com ácaros de que propriamente à manipulação exclusiva dos alvéolos, apesar de tendencialmente existir algum comportamento de canibalismo das obreiras perante a sua criação associado ao efeito da manipulação destes alvéolos.

É interessante realçar que, após 24 horas de infestação de alvéolos de criação de obreira com AMN, a taxa média de remoção de criação infestada foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre o grupo de colónias H e NH nesta estação do ano. Estes resultados sugerem que todas as colónias manifestaram uma resposta comportamental semelhante em relação ao comportamento I independentemente do seu perfil higiénico previamente quantificado através do teste de morte da criação por congelação. Tendência semelhante foi também observada entre estes grupos de colónias (H e NH) relativamente ao comportamento II e ao grupo testemunha I. Contrariamente ao observado no grupo

testemunha II, no qual, a diferença média dos alvéolos que foram removidos pelas colónias H foi superior ( $P>0,05$ ) comparativamente aos observados em colónias NH.

Na Figura 5.5 constam os valores médios (observados às 24 horas) dos comportamentos manifestados pelas colónias H e NH como resposta ao método de infestação com AMN no Verão de 2002.



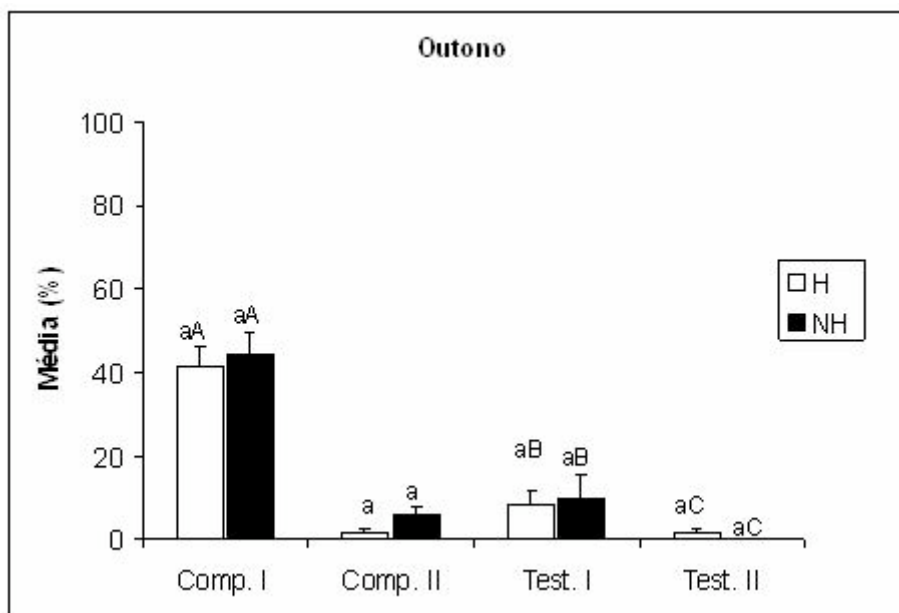
**Figura 5.5** – Valores observados do perfil comportamental (media  $\pm$  erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMN [aplicado em 2 quadros por colmeia ( $n=8$ )] no Verão de 2002. a, a – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). A, B, C – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P<0,05$ ).

No Verão, em cada um dos dois grupos de colónias (H ou NH) as obreiras removeram uma maior percentagem ( $P<0,05$ ) de alvéolos testemunha I (13,8 vs. 10,0%, respectivamente), comparativamente aos alvéolos testemunha II (1,3 vs. 1,3%, respectivamente). Tendência semelhante foi também observada no grupo de alvéolos infestados com AMN, o qual apresentou uma percentagem média superior ( $P<0,05$ ) ao grupos de alvéolos manipulados (Test. I) e não manipulados (Test. II).

As obreiras manifestaram também o comportamento II, apesar de não se observarem diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) na percentagem média de alvéolos que foram abertos e fechados (permitindo a sobrevivência da sua criação) entre colónias H e NH. Nesta estação do ano, os valores médios correspondentes a este comportamento foram acentuadamente inferiores aos observados na Primavera.

De igual modo, o nível de resposta das obreiras perante os diferentes alvéolos (infestados, manipulados e não manipulados foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre o grupo de colónias H e NH.

Os valores médios (observados às 24 horas) dos comportamentos manifestados pelas colónias H e NH como resposta ao método de infestação com AMN no Outono de 2002 encontram-se representados na Figura 5.6.



**Figura 5.6** – Valores observados do perfil comportamental (média  $\pm$  erro padrão da média, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AMN [aplicado em 2 quadros por colmeia ( $n=7$ )] no Outono de 2002. <sup>a, a</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). <sup>A, B, C</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P<0,05$ ).

Globalmente, pode-se afirmar que no Outono o nível de comportamento revelado (quer pelas colónias H, quer pelas colónias NH) relativo aos alvéolos infestados com AMN, manipulados e não manipulados foi semelhante ao observado no Verão. Contudo, a percentagem média de alvéolos que foram abertos e fechados pelas obreiras (comportamento II), em colónias H e NH, foram inferiores aos observados na Primavera do mesmo ano.

No Quadro 5.4 constam os valores observados em colónias H e NH, face à infestação de alvéolos com AMN entre estações do ano de 2002.

**Quadro 5.4.** Valor observado do perfil comportamental (média ± erro padrão da média, %) de 4 colónias H ou 4 NH como resposta ao método AMN aplicado em 2 quadros por colmeia entre as estações do ano de 2002.

Colónias H				
AMN	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II
	média±epm	média±epm	média±epm	média±epm
Primavera (n=8)	32,5±8,40A	15,0±5,35A	11,3±3,50A	7,5±2,50A
Verão (n=8)	43,8±3,75A	2,5±1,64B	13,8±2,63A	1,3±1,25B
Outono (n=7)	41,4±5,08A	1,4±1,43B	8,6±3,40A	1,4±1,43B
Colónias NH				
Primavera (n=8)	33,8±7,78A	11,3±6,39A	6,3±2,63A	1,3±1,25A
Verão (n=8)	45,0±4,23A	3,8±2,63A	10,0±3,78A	1,3±1,25A
Outono (n=7)	44,3±5,28A	5,7±2,02A	10,0±5,35A	0,0±0,00A

A, B – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras diferentes, são estatisticamente significativas (P<0,05).

Globalmente, apesar de um valor médio reduzido de alvéolos não manipulados (Test. II) terem sido detectados e removidos pelas obreiras do grupo de colónias H, este valor foi maior (7,5%); (P<0,05) na Primavera do que em outras estações do ano. Tendência semelhante foi também observada em relação ao comportamento II, indicando que a maior percentagem de alvéolos infestados que aparentemente foram abertos e fechados pelas obreiras (15%) ocorreu também na Primavera.

Salienta-se ainda, que apesar de não se observarem diferenças médias estatisticamente significativas (P>0,05) entre estações do ano em colónias H ou NH e entre estes, os valores médios observados foram superiores no Verão e no Outono. Além disso, o grupo de colónias NH apresentou valores médios de remoção de crias e parasitas superiores em todas as estações do ano, ainda que, o perfil comportamental relativo ao comportamento I e II e aos alvéolos testemunhas I e II como resposta à introdução de AMN foi semelhante (P>0,05) entre as diferentes estações do ano.

Os valores médios globais anuais dos comportamentos manifestados pelas colónias H e NH, relativos à introdução de AMN estão representados no Quadro 5.5.

**Quadro 5.5.** Valores médios (média  $\pm$  erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método AMN (aplicado em 2 quadros por colmeia) no total dos 3 ensaios realizados em 2002 (n=23).

AMN	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II	Comp. I/ Comp. II
Higiénicas (H)	39,1 $\pm$ 3,55aA	6,5 $\pm$ 2,32a	11,3 $\pm$ 1,81aB	3,5 $\pm$ 2,19aC	r= 0,278 NS
Não higiénicas (NH)	40,9 $\pm$ 3,50aA	7,0 $\pm$ 2,47a	8,7 $\pm$ 2,21aB	0,9 $\pm$ 0,60bC	r= - 0,371 NS

a, b, – Entre grupos de colónias (H e NH) médias com letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ). A, B, C – Dentro de cada grupo de colónias (H ou NH) médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P<0,001$ ). r = Coeficiente de correlação de Spearman; NS – Não significativo ( $P>0,05$ ).

Nos resultados globais agregando os estudos de (Primavera, Verão e Outono) dos ensaios realizados com AMN não foram observadas diferenças médias estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre os grupos de colónias H e NH no que respeita aos níveis de expressão dos comportamento I e II, o que nos permite afirmar que, apesar das colónias estarem classificadas em distintos níveis de higiene, a sua resposta à infestação artificial com AMN foi semelhante.

A remoção média dos alvéolos infestados (comportamento I) e dos alvéolos testemunha (alvéolos manipulados e não manipulados) apresentou diferenças médias significativas ( $P<0,001$ ) em cada um dos dois grupos de colónias (H ou NH).

Não existiu uma correlação estatisticamente significativa entre os comportamentos I e II na resposta relativamente às células infestadas com AMN, quer no grupo de colónias H, quer no grupo de colónias NH.

As percentagens médias globais anuais dos comportamentos manifestados pelas colónias H e NH, como resposta ao método AMN e ao teste de morte da criação por congelação, estão representadas no Quadro 5.6.

**Quadro 5.6.** Valores médios (média  $\pm$  erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH, como resposta ao método AMN e ao teste de morte da criação de obreira por congelação (CHT) no total dos ensaios realizados em 2002 (n=12).

AMN	CHT	Comp. I	CTH/ Comp. I
	média $\pm$ epm	média $\pm$ epm	
Higiénicas (H)	73,8 $\pm$ 7,84aA	39,6 $\pm$ 2,50aB	r= 0,101 NS
Não higiénicas (NH)	63,2 $\pm$ 5,45aA	41,7 $\pm$ 4,28aB	r= 0,403 NS

a, a, – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ). A, B – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P<0,01$ ). r = Coeficiente de correlação de Spearman; NS – Não significativo ( $P>0,05$ ).

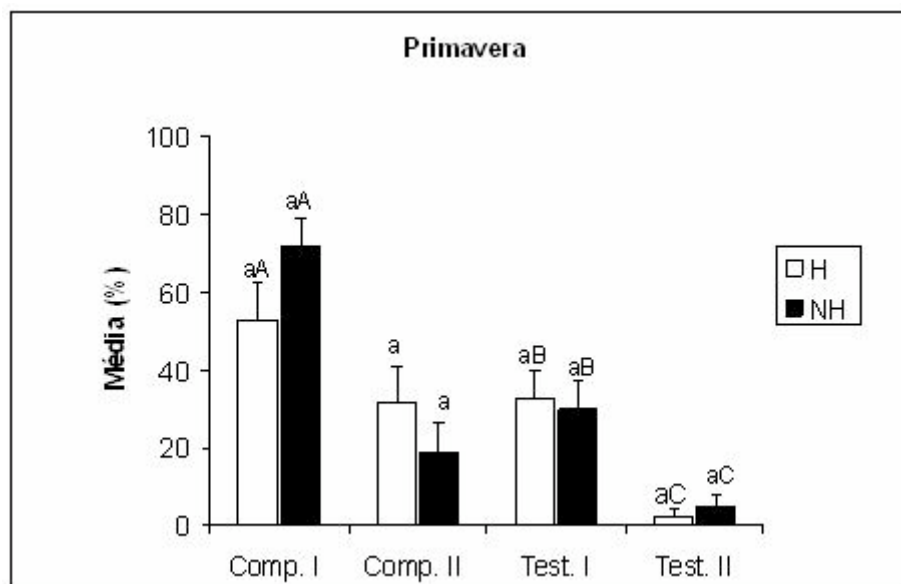
Quer as colónias H, quer as NH revelaram o mesmo nível de resposta relativamente aos alvéolos infestados com AMN, não tendo sido observadas diferenças médias estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre as diferentes métodos utilizados para avaliação destes comportamentos.

Na resposta de cada um dos dois grupos de colónias (H ou NH) aos diferentes métodos utilizados no mesmo ano de estudos, foram observadas diferenças médias estatisticamente significativas ( $P<0,001$ ) entre ambos os comportamentos (CHT e Comp. I). Todavia não se obteve uma correlação estatisticamente significativa ( $P>0,05$ ) entre esses os comportamentos, o que sugere que quando se introduzem AMN as obreiras manifestam ambos os comportamentos de forma independente.

### **5.3.3. Estudo do perfil comportamental das colónias higiénicas e não higiénicas à infestação de criação de obreira com ácaros vivos (AV)**

Os valores médios (observados às 240 horas) do perfil comportamental das colónias H e NH, como resposta à introdução de AV na Primavera estão representados na Figura 5.7.





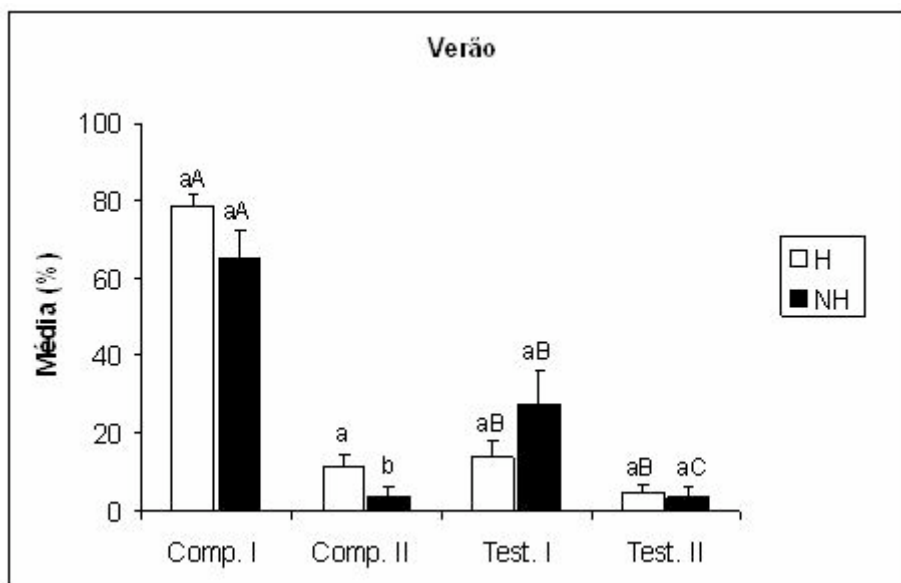
**Figura 5.7** – Valores observados do perfil comportamental (média  $\pm$  erro padrão da média, %) de 4 colônias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AV [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] na Primavera de 2002. <sup>a, a</sup> – Entre grupos de colônias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). <sup>A, B</sup> – Dentro do mesmo grupo de colônias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P<0,05$ ).

Na Primavera, e em cada um dos dois grupos de colônias (H ou NH) as obreiras removeram uma maior percentagem ( $P<0,05$ ) de alvéolos testemunha I (32,5 vs. 30,0%, respectivamente) comparativamente aos alvéolos testemunha II (2,5 vs. 5,0%, respectivamente). Porém, quer nas colônias H quer nas NH a remoção média no grupo de alvéolos infestados com AV foi superior e estatisticamente significativa ( $P<0,05$ ), comparativamente a esses grupos de alvéolos testemunha (Test. I e Test. II).

Tal como foi globalmente constatado com a aplicação do método AMN (Primavera, Verão e Outono) ao comparar o nível médio de comportamento I entre o grupo de colônias H e NH, observou-se uma ligeira superioridade ainda que não significativa ( $P>0,05$ ) na expressão deste comportamento no grupo de colônias NH (71,3%), comparativamente ao revelado pelas colônias H (52,5%). As obreiras manifestaram também o comportamento II, apesar de não se observarem diferenças estatisticamente significativas na percentagem média de alvéolos que foram abertos e fechados pelas obreiras entre colônias H e NH.

Salienta-se porém que, com a introdução de ácaros vivos na Primavera, os valores médios correspondentes aos comportamentos revelados pelas colônias H e NH foram acentuadamente superiores aos observados com a aplicação de outros métodos de infestação (AMC ou AMN).

Os valores médios do perfil comportamental das colónias H e NH, como resposta à introdução de AV no Verão são representados na Figura 5.8.

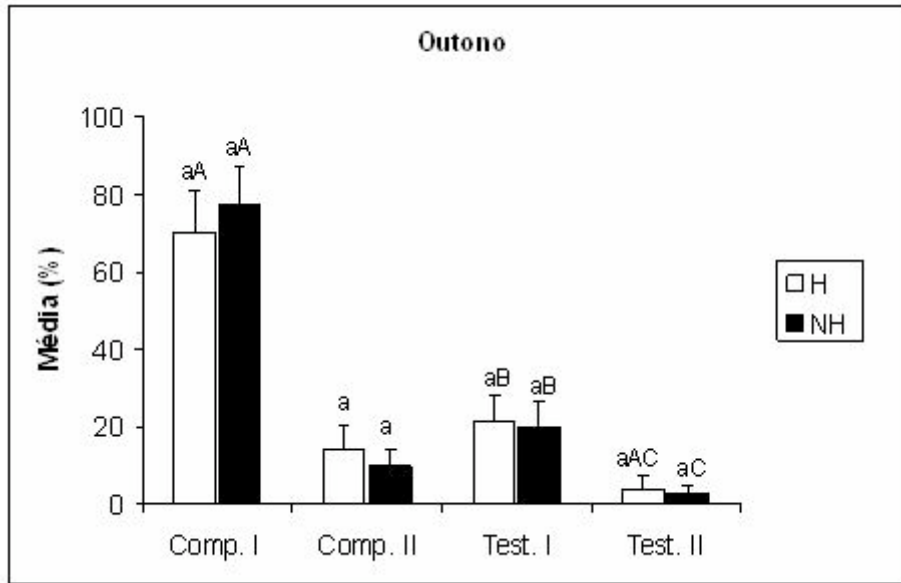


**Figura 5.8** – Valores observados do perfil comportamental (média ± erro padrão da média, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AV [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=8)] no Verão de 2002. <sup>a, b</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ). <sup>A, B</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

Estes resultados mostram que no Verão, as colónias H detectaram e removeram uma percentagem média de alvéolos testemunha I semelhante ( $P > 0,05$ ) à dos alvéolos testemunha II. Contrariamente, nas colónias NH foi observada uma remoção média mais elevada ( $P < 0,05$ ) entre os alvéolos testemunha I (27,5%) e II (3,8%). Contudo, em cada um dos dois grupos de colónias (H ou NH), as diferenças médias entre os alvéolos infestados com três AV foram superiores ( $P < 0,05$ ) às observadas nesses grupos testemunha.

Salienta-se porém, que nesta estação do ano, as maiores diferenças médias observadas entre ambos os grupos de colónias (H e NH) ocorreram ao nível do comportamento I, que foi ligeiramente superior ( $P > 0,05$ ) no grupo de colónias H (78,8%), comparativamente às colónias NH (65,0%). Observam-se ainda remoções médias acentuadamente inferiores entre os alvéolos testemunhas I e o nível do comportamento II, relativamente à observada na Primavera.

Os valores médios do perfil comportamental das colónias H e NH como resposta à introdução de AV no Outono estão representados na Figura 5.9.



**Figura 5.9** – Valores observados do perfil comportamental (media  $\pm$  erro padrão da media, %) de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método de infestação AV [aplicado em 2 quadros por colmeia (n=7) no Outono de 2002. <sup>a, A</sup> – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). <sup>A, B, C</sup> – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P<0,05$ ).

No Outono, quer o grupo de colónias H, quer o grupo de colónias NH revelaram um perfil comportamental idêntico relativamente aos três grupos de alvéolos (AV, Test. I e Test. II). Observaram-se diferenças significativas ( $P<0,05$ ) no nível de resposta das colónias entre os alvéolos testemunha (I e II) e entre estes e os alvéolos infestados com AV. Deve-se salientar, também, a variabilidade associada à expressão dos comportamentos I e II e aos grupos testemunha I, provavelmente associada à variabilidade intrínseca a cada grupo de colónias classificadas em H e NH [uma vez que a remoção média da criação e parasitas foi, em alguns casos (Primavera e Outono), superior nas colónias NH comparativamente às H]. Em todo o caso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) na remoção média de AV e pupas entre os grupos de colónias H e NH

No Quadro 5.7 constam os valores das respostas das colónias H e NH à infestação de alvéolos de criação de obreira com AV entre as várias estações do ano.

**Quadro 5.7.** Valor observado do perfil comportamental (média ± erro padrão da média, %) de 4 colónias H ou 4 NH como resposta ao método AV aplicado em 2 quadros por colmeia entre as estações do ano de 2002.

Colónias H				
AV	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II
	média±epm	média±epm	média±epm	média±epm
Primavera (n=8)	52,5±9,96A	31,3±9,72A	32,5±7,26A	2,5±1,64A
Verão (n=8)	78,8±2,95B	11,3±2,95A	13,8±4,20B	5,0±1,89A
Outono (n=7)	70,0±10,91AB	14,3±6,12A	21,4±6,34AB	4,3±2,97A
Colónias NH				
Primavera (n=8)	71,3±7,66A	18,8±7,89A	30,0±7,07A	5,0±2,67A
Verão (n=8)	65,0±7,56A	3,8±2,63A	27,5±8,40A	3,8±2,63A
Outono (n=7)	77,1±9,93A	10,0±4,36A	20,0±6,55A	2,9±1,84A

A, B – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH), médias com letras diferentes, diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

Em cada um dos dois grupos de colónias (H ou NH) as obreiras detectaram e removeram criação dos alvéolos testemunha (I e II). Tendo esta remoção média sido superior no grupo de alvéolos manipulados (Test. I) para todas as estações do ano. Contudo, a Primavera foi a estação do ano na qual a remoção média de criação de alvéolos manipulados pelo grupo de colónias H foi maior (32,8%) e estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) comparativamente às outras estações do ano.

O mesmo grupo de colónias (H) manifestou ainda um nível de expressão do comportamento I superior ( $P < 0,05$ ) no Verão quando, 78,8% dos alvéolos infestados foram identificados.

A expressão do comportamento II foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre as três estações do ano, apresentando ambos os grupos de colónias (H ou NH) uma resposta superior na Primavera.

O perfil comportamental do grupo de colónias NH, em termos de comportamentos I e II e alvéolos testemunha I e II foi estatisticamente semelhante ( $P > 0,05$ ) nas diferentes estações do ano. No entanto, neste grupo de colónias foi observada uma maior remoção de crias e parasitas durante a Primavera e o Outono (inclusivamente superiores aos observados nas colónias H).

Os valores médios globais anuais dos comportamentos manifestados pelas colónias H e NH estão representados no Quadro 5.8.

**Quadro 5.8.** Valores médios (média  $\pm$  erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH como resposta ao método AV (aplicado em 2 quadros por colmeia) no total dos 3 ensaios realizados em 2002 (n=23)

Nível de higiene	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II	Comp. I/ Comp. II
Higiénicas (H)	67,0 $\pm$ 5,24aA	19,1 $\pm$ 4,26a	22,6 $\pm$ 3,73aB	3,9 $\pm$ 1,22aC	r= - 0,704 **
Não higiénica(NH)	70,9 $\pm$ 4,70aA	10,9 $\pm$ 3,32a	26,1 $\pm$ 4,21aB	3,9 $\pm$ 1,37aC	r= - 0,354 NS

a, a, – Entre grupos de colónias (H e NH) médias com letras minúsculas iguais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ), A, B, C, – Dentro de cada grupo de colónias (H ou NH) médias com letras maiúsculas diferentes, são estatisticamente significativas ( $P<0,001$ ). r = Coeficiente de correlação de Spearman; NS – Não significativo ( $P>0,05$ ); \*\* - Significativo para  $P=0,01$ .

Quer as colónias H, quer as NH revelaram níveis de resposta diferenciáveis ( $P<0,05$ ) entre os alvéolos testemunha I e II, indicando que as obreiras localizaram e removeram uma percentagem média inferior de alvéolos não manipulados.

Tendência semelhante foi também observada entre esses grupos e os alvéolos infestados com AV, sendo as diferenças médias estatisticamente significativas ( $P<0,05$ ) entre os grupos de colónias H ou NH. Este facto parece indicar que as abelhas detectaram e removeram uma elevada percentagem de alvéolos parasitados, tendo sido conseqüentemente este procedimento (a parasitação dos alvéolos de criação) que despoletou o maior comportamento de remoção.

Salienta-se ainda que a remoção média da criação e parasitas foi, inclusivamente, superior nas colónias NH (70,9%), comparativamente às H (67,0%).

Comparando os comportamentos I e II na resposta das obreiras relativamente aos alvéolos infestados com AV, o valor do coeficiente de correlação obtido foi negativo e significativo [ $r=-0,704$  (n=23;  $P<0,01$ )] para as colónias H, indicando que as colónias que manifestam o comportamento I numa elevada percentagem manifestam o comportamento II numa baixa percentagem (e vice versa). Porém, nas colónias NH não existiu uma correlação estatisticamente significativa entre os comportamentos I e II, [ $r=-0,354$  (n=23;  $P>0,05$ )]

As percentagens médias globais dos comportamentos manifestados pelas colónias H e NH como resposta ao método AV e ao teste de morte da criação por congelação (CHT) estão representadas no Quadro 5.9.

**Quadro 5.9.** Valores médios (média ± erro padrão da média, %) e valores dos coeficientes de correlação obtidos a partir dos comportamentos manifestados pelas abelhas de 4 colónias H e 4 NH, como resposta ao método AV e ao teste de morte da criação de obreira por congelação (CHT), no total dos ensaios realizados em 2002 (n=12).

AV	CHT	Comp. I	CTH/ Comp. I
	média±epm	média±epm	
Higiénicas (H)	73,8±7,84aA	67,5±4,90aA	r= 0,114 NS
Não higiénicas (NH)	63,2±5,45aA	72,1±6,32aA	r= 0,254 NS

a, a, – Entre grupos de colónias (H e NH), médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). A, A – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH) médias com letras maiúsculas iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ). r = Coeficiente de correlação de Spearman; NS – Não significativo ( $P>0,05$ ).

Quer as colónias H, quer as NH revelaram o mesmo nível de resposta relativamente aos alvéolos infestados com três ácaros vivos, não tendo sido observadas diferenças médias estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre os diferentes métodos utilizados para avaliação destes comportamentos.

Na resposta de cada um dos dois grupos de colónias (H ou NH) aos diferentes métodos utilizados no mesmo ano de estudos, não se observaram diferenças médias estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) entre ambos os comportamentos (CHT e Comp. I). Todavia também neste caso não se obteve uma correlação estatisticamente significativa ( $P>0,05$ ) entre esses comportamentos, o que sugere que quando se introduzem AV as obreiras manifestam ambos os comportamentos de forma independente.

No Quadro 5.10 apresentam-se as percentagens médias globais dos comportamentos manifestados pelas colónias H e NH às quais se aplicaram consecutivamente distintas metodologias de infestação de alvéolos de criação de obreira.

Globalmente, em ambos os grupos de colónias (H ou NH) as obreiras removeram uma percentagem média superior ( $P<0,05$ ) de alvéolos infestados quando o método aplicado se baseou na introdução de AV. Tendência semelhante foi observada para o grupo de alvéolos não manipulados, ainda que, neste caso a remoção média observada tenha sido numericamente inferior.

Em ambos os grupos de colónias (H ou NH) foram também observadas diferenças médias estatisticamente significativas ( $P<0,05$ ) entre os vários métodos de infestação,

tendo sido a introdução de ácaros vivos o que induziu um maior nível de comportamento I.

**Quadro 5.10.** Valores médios (média  $\pm$  erro padrão da média, %) dos comportamentos manifestados por 4 colónias H e 4 colónias NH após a aplicação de várias metodologias de infestação ao longo de três estações do ano de 2002 (n=23).

	Técnica de infestação	Comp. I	Comp. II	Test. I	Test. II
Higiénicas (H)	AMC	30,9 $\pm$ 3,50A	14,8 $\pm$ 2,50A	9,1 $\pm$ 1,98A	1,3 $\pm$ 0,72A
	AMN	39,1 $\pm$ 3,55B	6,5 $\pm$ 2,32B	11,3 $\pm$ 1,81A	3,5 $\pm$ 2,19AB
	AV	67,0 $\pm$ 5,24C	19,1 $\pm$ 4,26A	22,6 $\pm$ 3,73B	3,9 $\pm$ 1,22B
Não higiénicas (NH)	AMC	29,1 $\pm$ 3,32A	14,8 $\pm$ 2,42A	7,0 $\pm$ 1,60A	2,6 $\pm$ 0,94AB
	AMN	40,9 $\pm$ 3,50B	7,0 $\pm$ 2,47B	8,7 $\pm$ 2,21A	0,9 $\pm$ 0,60A
	AV	70,9 $\pm$ 4,70C	10,9 $\pm$ 3,32AB	26,1 $\pm$ 4,21B	3,9 $\pm$ 1,37B

A, B, C – Dentro do mesmo grupo de colónias (H ou NH) médias com letras diferentes, diferem estatisticamente (P<0,05).

Salienta-se ainda que o nível de expressão do comportamento II foi mínimo quando o método aplicado consistiu na introdução de ácaros mortos naturalmente. Neste caso as diferenças médias observadas na resposta das colónias H, apenas diferiram estatisticamente (P<0,05) entre esta metodologia e as outras duas (AMC e AV). No caso das colónias NH, as diferenças médias observadas apenas diferiram estatisticamente (P<0,05) entre a introdução de ácaros mortos (AMC e AMN).

Os alvéolos artificialmente parasitados com AMC, AMN e AV, foram cuidadosamente examinados e revelaram (em 14,8%, 6,5% e 19,1 % das colónias H e em 14,8%, 7,0% e 10,9 % das colónias NH, vide quadro 5.10) a existência, nos opérculos, de sinais claros de abertura e reoperculação de alvéolos pelas obreiras, sem eliminarem a criação neles existente.

## 5.4. Discussão

Uma primeira análise global ao perfil comportamental manifestado pelas colónias em estudo, após a aplicação de cada um dos três métodos de infestação de alvéolos operculados de criação de obreira permitem afirmar que, a manipulação experimental dos seus opérculos sem a introdução de parasitas (testemunha I) e sem manipulação (testemunha II) desencadearam reacções ao nível do grupo de colónias H e NH.

Estes resultados permitem confirmar que o corte realizado nos opérculos influenciou o comportamento higiénico das obreiras e pode também ter contribuído para alguns problemas de canibalismo presentes neste estudo, ainda que numa percentagem muito baixa. Boecking e Ritter (1993) afirmaram que baixas taxas de remoção de alvéolos manipulados (sem introduzir ácaros) demonstraram que a manipulação experimental de opérculos não provocou uma reacção de remoção que excedesse a percentagem média de canibalismo relativa aos alvéolos que não foram manipulados. A habilidade do operador na manipulação de alvéolos é um aspecto que pode ser considerado na interpretação destes resultados. Pela experiência adquirida durante este estudo, pode-se afirmar que nem sempre é fácil abrir e fechar o opérculo sem danificar a sua própria estrutura de uma forma perfeccionista, pelo que a habilidade e o treino do operador, bem como, o tempo disponível para efectuar esta operação são pontos críticos neste processo. Porém, a hipótese mais plausível baseada na consistência deste comportamento durante todo o período de estudo é de ser esta uma resposta normal de reacção destas colónias à manipulação destes alvéolos.

Resultados idênticos aos observados no presente estudo foram obtidos por Aumeier *et al.* (2000) e Aumeier e Rosenkranz (2001) em estudos de índole semelhante em colónias de *A. mellifera*. Contrariamente, Flores *et al.* (2001) num estudo realizado no sentido de avaliar se colónias de *A. m. iberiensis* manifestavam o comportamento de remoção perante alvéolos operculados de criação de obreira com ácaros (mortos e vivos), verificaram que o nível de expressão do comportamento de remoção das obreiras não era influenciado pelo efeito da manipulação (isto é, corte realizado em opérculos de alvéolos de criação).



Todavia, os valores médios globais observados nos grupos de alvéolos testemunhas (Test. I e II) foram significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) quando comparados com o comportamento de remoção de criação e parasitas. Isto significa que apesar de existir alguma influência da manipulação de alvéolos sobre a resposta higiénica das obreiras, a introdução de ácaros (vivos e mortos) provocou uma resposta acentuadamente superior em ambos os grupos de colónias H e NH. Consequentemente, a infestação de alguns alvéolos, associada à manipulação de outros, pode ter estado na origem dos casos de canibalismo observados neste estudo.

Neste estudo também foi comprovado após a aplicação das três metodologias de infestação que as obreiras podem detectar a criação infestada abrir e fechar os alvéolos e removerem os ácaros sem eliminar a criação. Em vários trabalhos de investigação (Spivak, 1996; Boecking e Spivak, 1999; Aumeier e Rosenkranz, 2001; Flores *et al.*, 2001, 2003), a criação operculada de obreira artificialmente infestada com os ácaros vivos tem sido utilizada para quantificar os comportamentos I e II. Resultados obtidos por Boecking e Drescher (1998) corroboram os resultados obtidos no presente estudo, nomeadamente quando estes autores verificaram que de 643 alvéolos de criação infestados com um ácaro vivo, 69 (10,7%) tinham sido objecto de manifestação do comportamento II.

A manifestação deste comportamento tem sido, em vários graus, observada por vários autores (Boecking e Drescher, 1994; Aumeier *et al.*, 2000; Aumeier e Rosenkranz, 2001). Todavia, a maioria dos estudos que têm avaliado o comportamento higiénico através de métodos de infestação com ácaros incide exclusivamente sobre o comportamento de remoção. Este comportamento parece ser mais complexo, estando os nossos resultados de acordo com a variabilidade de respostas identificadas em estudos anteriores (Rosenkranz *et al.*, 1993; Boecking e Spivak, 1999; Boot *et al.*, 1999).

No caso da introdução de ácaros vivos, este comportamento é ainda mais complexo, pois alguns deles podem abandonar os alvéolos enquanto estes permanecem abertos (e, inclusivamente, reinfestar outros). Boecking e Drescher (1998) referiram que na espécie *A. mellifera* os ácaros apenas abandonam a criação operculada quando as abelhas removeram praticamente todo o corpo das larvas ou pupas. Consequentemente, a utilização de ácaros mortos em estudos desta índole parece ser uma possibilidade a considerar.

A remoção dos ácaros sem danificar a criação, permitindo a sua sobrevivência, pode ser, uma estratégia adaptativa para minimizar a perda de criação pelas colónias (Aumeier e Rosenkranz, 2001). Logicamente, poderia ser uma contribuição para o controlo da varroose se, as fêmeas do ácaro fossem removidas pouco depois da invasão da criação, pois até mesmo, pequenas infecções secundárias transmitidas pelos ácaros poderiam ser prevenidas (Brodsgaard *et al.*, 2000).

As quatro colónias H que removeram a criação morta por congelação removeram também um valor médio de 30,9% de pupas infestadas com AMC, 39,1% com AMN e 67,0% AV. Ao comparar estes resultados com os obtidos em 2001 (Capítulo 4) após a aplicação de cada um dos 3 métodos (AMC, AMN e AV) em cada um de 3 grupos de 3 colónias que não foram previamente agrupadas em função do seu nível de higiene, a remoção média de criação infestada foi muito inferior (13,8%, 16,0% e 35,7%, respectivamente). Assim, estes resultados aparentam concordância com o esperado para as 4 colónias H, sugerindo uma relação entre o comportamento higiénico (avaliado através do teste de morte da criação por congelação) e o comportamento de remoção da criação e dos parasitas do interior dos alvéolos operculados.

Porém, com base nos resultados obtidos neste Capítulo, após a aplicação dos vários métodos de infestação, não se observaram, globalmente, diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no comportamento revelado entre colónias H e NH face aos alvéolos infestados com ácaros. Acresce que com AMN e AV, a remoção média dos alvéolos infestados foi superior nas colónias NH (resultado este muito diferente do inicialmente esperado).

Contrariamente, Spivak (1996) e Spivak e Gilliam (1991) ao avaliarem colónias da subespécie *A. m. ligustica* pré-seleccionadas para o comportamento higiénico encontraram maiores valores médios de remoção (52,1%) em alvéolos artificialmente infestados em colónias H, comparativamente com os 17,4% em colónias seleccionadas como NH.

No presente estudo este aspecto encontra justificação principalmente por duas razões: (i) as colónias de abelhas melíferas portuguesas foram avaliadas em função do seu comportamento higiénico mas não foram submetidas, todavia, a nenhum programa de melhoramento genético, de forma a estabelecer e manter este comportamento, e (ii) as colónias de cada grupo (H e/ou NH) não mantiveram o nível inicial de

comportamento higiénico segundo o qual foram inicialmente agrupadas, variando este comportamento entre anos e inclusivamente entre as várias estações do ano em que os ensaios foram realizados (Capítulo 3), possivelmente como consequência das peculiaridades do acasalamento de rainhas em colónias submetidas a sistemas tradicionais de produção apícola. Estas razões poderão justificar a aparente inexistência de relação entre o comportamento higiénico (avaliado através do teste de criação morta por congelação) e os métodos de infestação de alvéolos operculados de criação de obreira com o ácaro *V. destructor*, independentemente de estarem vivos ou mortos.

Anteriormente já tinha sido referido por Trump *et al.* (1967) que grupos integrando obreiras higiénicas e não higiénicas expressam o fenótipo apenas quando o subgrupo das obreiras higiénicas é suficientemente numeroso para controlar as tarefas de desoperulação e remoção. Thakur *et al.* (1996) e Thakur *et al.* (1997) filmaram os comportamentos manifestados pelas obreiras, revelando que algumas obreiras se especializam em diferentes componentes do comportamento I. Posteriormente, vários autores (Ratnieks e Anderson, 1999; Arathi *et al.*, 2000; Arathi e Spivak, 2001) têm referenciado que a composição genotípica de uma colónia é um dos factores que influencia a expressão do nível de comportamento higiénico. Masterman *et al.* (2000) e Masterman *et al.* (2001), em recentes estudos neuroetológicos e registos de electroantenogramas em obreiras (higiénicas e não higiénicas) expostas a várias concentrações de soluções contendo restos de criação infectada com ascosferiose, indicaram que o comportamento realizado pelas abelhas não higiénicas pode variar em função da extensão dos estímulos existentes numa colónia.

Em estudos recentes, Harbo e Harris (2005) demonstraram fortes evidências de que colónias seleccionadas em função do baixo êxito reprodutivo dos ácaros manifestaram o comportamento higiénico pela detecção e remoção de pupas infestadas com ácaros.

Posteriormente Ibrahim e Spivak (2006) encontraram uma relação entre a resposta de remoção mostrada por obreiras face a alvéolos de criação de obreiras artificialmente infestados e o comportamento higiénico ao compararem colónias de abelhas seleccionadas em função do baixo êxito reprodutivo de ácaros e colónias de abelhas seleccionadas em função do seu elevado comportamento higiénico (avaliado através do teste de criação morta por congelação). Estes autores verificaram que colónias de uma linha de abelhas seleccionada em função da supressão da reprodução de ácaros

apresentavam um nível de expressão do comportamento de remoção de ácaros e crias superior comparativamente ao mesmo comportamento manifestado por colónias de abelhas seleccionadas em função do seu elevado comportamento higiénico.

Neste pressuposto, uma possível explicação para os resultados do presente estudo pode dever-se às diferentes metodologias utilizadas para avaliar o comportamento higiénico das colónias. O teste de morte de criação por congelação utilizado como um indicador indirecto do comportamento higiénico pode não ser o mais adequado para prever o comportamento de remoção de criação infestada com estes ácaros. Neste caso, os métodos de infestação aparentemente serão mais precisos para avaliação deste comportamento.

Não pretendemos, neste trabalho, efectuar uma discussão sobre todos os factores que condicionam o desencadeamento das várias componentes do comportamento higiénico manifestadas após a aplicação de diferentes metodologias de infestação. Todavia, não deixaremos de efectuar uns breves comentários sobre os aspectos mais relevantes que lhes estão associados e em estudo neste trabalho.

Um outro aspecto relacionado com a aplicação de diferentes métodos de infestação foi que o efeito estação do ano influenciou o comportamento higiénico das colónias face a alvéolos operculados de criação de obreira infestados em cada um dos vários métodos aplicados. O Verão (seguido do Outono) foram as estações do ano em que globalmente as colónias de cada um dos dois grupos (H ou NH) expressaram de uma forma mais acentuada este comportamento. Uma das possíveis explicações para este facto está associada possivelmente às condições meteorológicas verificadas no ano em que decorreram estes estudos. Segundo Pereira (2004) em 2002 a temperatura média anual em Bragança foi de 12°C, registando-se a temperatura média mais elevada em Julho (19,6°C) enquanto que a mais baixa foi registada em Janeiro (4,6°C). Ao contrário do observado para a temperatura, a precipitação foi bastante irregular e este foi um ano muito pluvioso, concentrando-se a precipitação sobretudo nos meses de Setembro a Dezembro (cerca de 64% do total anual), verificando-se os menores valores de precipitação nos meses de Julho e Agosto (respectivamente de 8 mm e de 2,6 mm).

Neste contexto, podemos afirmar que a elevada precipitação observada no início da Primavera, associada a um ciclo anual da floração mais tardio, pode ter condicionado (atrasado) o reinício do ciclo de postura das colónias após a paragem invernal e, desta forma, pode ter influenciado a expressão do comportamento higiénico manifestado

pelas colónias nesta estação do ano. Segundo Vieira *et al.* (1990) colónias de abelhas melíferas portuguesas possuem picos de postura máxima que ocorrem no período Abril e Maio, estando por isso adaptadas a um fluxo de néctar principal nesse período. Como o início destes estudos ocorreu no mês de Junho, coincidindo ainda com elevadas fluxos de néctar (devido a períodos de floração mais prolongados) e elevadas densidades populacionais nas colónias, a uma maior diversidade de tarefas a realizar no interior das colónias pode ter correspondido uma menor disponibilidade temporal para a detecção e remoção de parasitas e criação.

O Verão e o Outono são normalmente estações do ano, nas quais se verifica um decréscimo da postura e menores densidades populacionais nas colónias (ainda que com alguma entrada de néctar e pólen), associadas a um menor labor das obreiras no interior e exterior das colónias. Este facto pode ter propiciado uma maior disponibilidade para a realização desta tarefa e conseqüentemente ter contribuído para uma expressão mais acentuada do nível de resposta das colónias perante os alvéolos infestados com ácaros. Desta forma, apesar deste estudo não ter sido realizado com um elevado número de colónias (e não excluindo ainda a variabilidade meteorológica que pode ocorrer entre anos), poder-se-á afirmar que no Nordeste Transmontano a utilização destes métodos aparentemente permitirá uma maior expressividade comportamental das abelhas no Verão e Outono.

No que respeita à avaliação individual de cada método de infestação artificial, a introdução de AV foi a mais eficiente no desencadeamento da resposta comportamental das colónias H e NH. Em estudos de índole semelhante, Boecking e Drescher (1994), Spivak (1996) e Flores *et al.* (2001) verificaram também que os alvéolos parasitados com mais de um ácaro desencadeavam uma elevada resposta de remoção comparativamente a alvéolos infestados com um só ácaro. Salienta-se, porém, que as mesmas colónias também identificaram a introdução de ácaros mortos, tendo o nível de expressão do seu comportamento sido acentuadamente superior quando se introduziram AMN.

Apesar de ainda não existirem muitos estudos baseados na utilização de ácaros mortos para estudar o comportamento de remoção das obreiras [e de Boecking e Drescher (1994) e Boecking e Spivak (1999) afirmarem que os ácaros mortos não induzem o comportamento higiénico em colónias de *A. mellifera*], começam

actualmente a aparecer alguns estudos que suportam o uso deste método (Aumeier e Rosenkranz, 2001; Flores *et al.*, 2001, 2003).

Estão ainda por clarificar quais os mecanismos que controlam a detecção de criação morta, doente e parasitada, bem como a detecção de alvéolos infestados com ácaros. Nos estudos mais recentes tem-se especulado acerca da possibilidade da sensibilidade olfactiva de abelhas higiénicas *versus* não higiénicas ter um papel relevante no reconhecimento dos odores da criação doente (Masterman *et al.*, 2001 e Spivak *et al.*, 2003). Ibrahim e Spivak (2006) especularam que colónias de abelhas seleccionadas em função do baixo êxito reprodutivo de ácaros têm uma maior sensibilidade olfactiva no reconhecimento de pupas infestadas com ácaros e respondem a estes sinais identificando e removendo criação e ácaros mais rapidamente comparativamente a colónias que foram seleccionadas com base num elevado comportamento higiénico.

Na maioria dos trabalhos publicados neste domínio, a criação artificialmente infestada com ácaros vivos tem sido mais utilizada para quantificar este comportamento, (possivelmente por reproduzir as condições naturais mais fidedignamente). No entanto, quando se utilizam os métodos de infestação de alvéolos operculados de criação de obreira, para investigar os níveis de comportamento manifestado pelas colónias como um mecanismo de tolerância à *V. destructor* (e se pretende utilizar um número considerável de colónias), a introdução de ácaros vivos (devido à morosidade do processo e à dificuldade de introduzir mais de um ácaro vivo por alvéolo), torna-se uma metodologia quase impraticável.

Por outro lado, o reduzido número de colónias utilizadas neste estudo poderá, também ter de alguma forma, condicionado este resultado. Porém, a avaliação de um elevado número de colónias no mesmo período de tempo através da aplicação destes métodos, é um processo eventualmente impraticável, como já foi referido anteriormente.

Segundo os resultados obtidos no presente estudo, e no sentido de desenvolver investigações futuras sobre os métodos de infestação artificial com *V. destructor* para avaliar o comportamento de remoção num elevado número de colónias, a utilização de ácaros naturalmente mortos parece ser o método mais indicado (por questões de ordem prática). Esta fundamentação baseia-se, não só, devido à morosidade

associada à introdução dos ácaros (particularmente, os ácaros vivos, e à manipulação de alvéolos, bem como à morosidade da avaliação dos comportamentos manifestados pelas obreiras em cada colónia (devido à necessidade de utilizar uma lupa binocular ou um microscópio).

Assim, a utilização de ácaros mortos poderá facilitar a selecção futura de colónias que respondem especificamente à criação artificialmente infestada com estes ácaros e, deste modo, contribuir para a investigação de mecanismos de tolerância de colónias portuguesas à Varroose. Todavia, importa desenvolver estudos futuros para comprovar se as colónias que mostram de uma forma mais acentuada o comportamento I (remoção de crias e parasitas) são as que apresentam um crescimento mais lento da população de parasitas.

## 5.5 Conclusões

Aparentemente não existe uma relação entre o comportamento higiénico avaliado através do teste de morte de criação por congelação e o comportamento de remoção da criação e parasitas do interior de alvéolos operculados de criação de obreira artificialmente infestada com *V. destructor*.

As obreiras dos grupos de colónias H e NH detectaram e removeram alguns alvéolos manipulados e não manipulados. Porém, o nível de expressão do comportamento manifestado por estas colónias foi acentuadamente influenciado pela introdução de ácaros (mortos ou vivos) nos alvéolos de criação de obreira.

A estação do ano em que estas metodologias são aplicadas parece influenciar a resposta comportamental das colónias, tendo-se constatado serem o Verão e o Outono, as estações do ano em que esta resposta é mais favorável na região em estudo.

As colónias de cada um dos dois grupos (H e NH) reagiram à introdução de ácaros, independentemente do seu estado (vivos ou mortos). Todavia, o nível de expressão do seu comportamento foi acentuadamente superior quando se introduziram ácaros vivos. No que se refere à introdução de ácaros mortos, essa resposta revelou-se mais favorável quando o processo de morte ocorreu naturalmente.

## 5.6 Referências bibliográficas seleccionadas

Arathi, H. S.; Burns, I. e Spivak, M. 2000. Ethology of hygienic behaviour in honey bee *Apis mellifera* L. (Hymeniptera: Apidae): behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology* **106**: 365-379.

Arathi, H. S. e Spivak, M. 2001. Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behaviour in honeybee, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour* **62**: 57-66.

Aumeier, P.; Rosenkranz, P. e Gonçalves, L. S. 2000. A comparison of the response of Africanized and European (*Apis mellifera carnica*) honey bees to Varroa-infested brood in tropical Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **23**: 787-791.

Aumeier, P. e Rosenkranz, P. 2001. Scent or movement of Varroa destructor mites does not elicit hygienic behaviour by Africanized and Carniolan honey bees. *Apidologie* **32**: 253-263.

Boecking, O. e Ritter, W. 1993. Grooming and removal behavior of *Apis mellifera* intermissa in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* **32**: 127-134.

Boecking, O. e Drescher, W. 1994. Rating of signals that trigger *Apis mellifera* L. bees to remove mite-infested brood. *Apidologie* **25**: 459-461.

Boecking, O. e Drescher, W. 1998. Research on Varroa resistant traits in European honey bee races. EUROBEE AIR3-CT94-1064, EU, Brussels.

Boecking, O. e Spivak, M. 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**: 141-158.

Boot, W. J.; Calis, J. N. M.; Beetsma, J.; Dong, M. H.; Lan, N. K.; Tran, V. T.; Long, L. Q. e Nguyen, H. M. 1999. Natural selection of *Varroa jacobsoni* explains the different reproductive strategies in colonies of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Experimental and Applied Acarology* **23**: 133-144.

Brodsgaard, C. J.; Ritter, W.; Hansen, H. e Brodsgaard, H. F. 2000. Interactions among *Varroa jacobsoni* mites, acute paralysis virus, and *Paenibacillus larvae larvae* and their influence on mortality of larval honeybees in vitro. *Apidologie* **31**: 543- 554.



Flores, J. M.; Ruiz, J. A.; Ruz, J. M.; Puerta, F. e Bustos, M. 2001. Hygienic behavior of *Apis mellifera iberica* against brood cells artificially infested with varroa. *Journal of Apicultural Research* **40**: 29-34.

Flores, J. M.; Puerta, F.; Ruiz, J. A. e Calero, M. J. 2003. A note on the use of dead *Varroa* mite in the study of the removal behaviour of the honey bee. *Revista Ibérica de Parasitologia* **63**: 5-8.

Harbo, J. R. e Harris, J. W. 2005. Suppressed mite reproduction linked to the behavior of adult bees. *Journal of Apicultural Research* **44**: 21-23.

Ifantidis, M. D. 1983. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in the worker and drone honeybee cells. *Journal of Apicultural Research* **22**: 200-206.

Ibrahim, A. e Spivak, M. 2006. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* **37**: 31-40.

Janmaat, A. F. e Winston, M. L. 2000. Removal of *Varroa jacobsoni* infested brood in honey bee colonies with differing pollen stores. *Apidologie* **31**: 377-385.

Masterman, R.; Smith, B. H. e Spivak, M. 2000. Brood odor discrimination abilities of hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.) using proboscis extension reflex conditioning. *Journal of Insect Behavior* **13**: 87-101.

Masterman, R.; Ross, R.; Mesce, K. e Spivak, M. 2001. Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal Comp. Physiology A* **187**: 441-452.

Pereira, E. L. 2004. Influência do freixo no microclima, nas características do solo e disponibilidade de nutrientes, e na vegetação herbácea de lameiros do Nordeste de Portugal. Tese de Doutorado, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Ratnieks, F. L. W. e Anderson, C. 1999. Task partitioning in insect societies. *Insectes Sociaux* **46**: 95-108.

Rembold, H.; Krämer, J. P. e Ulrich, G. H. 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **11**: 29-38.

Rosenkranz, P.; Tewarson, N. C.; Singh, A. e Engels, W. 1993. Differential hygienic behavior towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to the mites. *Journal of Apicultural Research* **32**: 89-93.

Ruijter, A. 1987. Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive cycles of the honeybee. *Apidologie* **18**: 321-326.

Spivak, M. e Gilliam, M. 1991. New ideas on the role of hygienic behavior in disease resistance in honey bees. *American Bee Journal* **131**: 782.

Spivak, M. 1996. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* **27**: 245-260.

Spivak, M.; Masterman, R.; Ross, R. e Mesce, K. A. 2003. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *Journal of Neurobiology* **55**: 341-354.

Thakur, R. K.; Bienenfeld, K. e Keller, R. 1996. Beobachtungen zum Abwehrverhalten von *Apis mellifera carnica* gegenüber *Varroa jacobsoni* mittels Infrarot-Videokamera-Aufnahmen. *Apidologie* **27**: 286-288.

Thakur, R. K.; Bienenfeld, K. e Keller, R. 1997. *Varroa* defense behavior in *Apis mellifera carnica*. *American Bee Journal* **137**: 143-148.

Trump, R. F.; Thompson, V. C. e Rothenbuher, W. C. 1967. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees V. Effect of previous experience and composition of mixed colonies on response to disease-killed brood. *Journal of Apicultural Research* **3**: 25-30.

Vandame, R. 1996. Importance de l'hybridation de l'ôte dans la tolérance à un parasite. Cas de l'acararien parasite *Varroa jacobsoni* chez les races d'abeilles *Apis mellifera* européenne et africanisée, en clima tropical humide du Mexique. PhD Thesis, Institut d'Analyse des Systèmes Biologiques et Socio-économiques, Lyon, France.

Vieira, G. M. C. C.; Branco, M. R.; Pedras, J.; Almeida, A.; Vicente, H. P. e Lemos, A. F. 1990. Contribuição para o estudo do ciclo biológico da *Apis mellifera iberica*. In: Acta do II Congresso Florestal Nacional, Ministério da Agricultura, Porto, Portugal. pp 105.

## **Capítulo 6**

### **Conclusões gerais**

---

#### **6.1. Resposta higiénica das colónias à introdução duma secção de favo com criação morta por congelação**

A avaliação do comportamento higiénico em colónias de abelhas melíferas portuguesas baseada no teste de morte da criação de obreira por congelação mostrou ser um procedimento eficaz na quantificação daquele comportamento. No Nordeste Transmontano existem colónias de abelhas que manifestam um elevado comportamento higiénico às 24 horas. Este período de observação é considerado o período de referência na avaliação do comportamento higiénico.

Esta avaliação permite distinguir as colónias em função do seu nível de comportamento higiénico, classificando-as objectivamente em higiénicas ou não higiénicas.

A sua aplicabilidade ao nível do sistema tradicional de produção apícola português poderá contribuir relevantemente para uma estratégia de controlo da varroose a nível nacional.

## **6.2. Relação entre a percentagem média de remoção da criação de obreira morta por congelação em colónias higiénicas (H) e não higiénicas (NH) por anos e entre anos**

Os padrões de variação comportamental revelados pelos grupos de colónias higiénicas e não higiénicas foram relativamente uniformes e similares entre as diferentes estações do ano. Assim, a manifestação deste comportamento não é aparentemente influenciada pela estação do ano.

As colónias higiénicas e não higiénicas não mantiveram o mesmo padrão comportamental durante os três anos de estudo.

## **6.3. Avaliação da resposta de colónias de abelhas melíferas à utilização de vários métodos de infestação de alvéolos de criação operculada de obreira com *V. destructor*, testados de forma individual ou conjunta**

Este estudo revela que colónias de abelhas melíferas portuguesas conseguem detectar a presença da criação de obreira infestada com *V. destructor*, identificando-se claramente o comportamento I e o comportamento II.

As colónias executam o comportamento higiénico perante a criação infestada com ácaros mortos (AMC ou AMN) da mesma forma e numa extensão similar, quando estes métodos são aplicados individualmente (por colónia). Contudo, esta resposta é acentuadamente superior quando os alvéolos da criação de obreira são infestados com ácaros vivos. Quando os vários métodos são aplicadas em simultâneo numa dada colónia, os níveis de expressão dos comportamentos (I e II) são semelhante entre eles.

A aplicação de vários métodos de infestação em simultâneo na mesma colónia interfere na sua resposta comportamental (influenciada pelo maior número de alvéolos manipulados e/ou introdução de ácaros vivos).

A aferição destes métodos de infestação para a identificação e avaliação do comportamento manifestado por colónias de abelhas melíferas que visem a sua integração futura num programa de melhoramento genético, deve ser efectuada de forma individual por colónia.

#### **6.4. Estudo do perfil comportamental das colónias higiénicas e não higiénicas como resposta a vários métodos de infestação da criação operculada de obreira com *V. destructor***

As obreiras dos grupos de colónias H e NH detectam e removem alguns alvéolos testemunha. Porém, o nível de expressão do comportamento manifestado por estas colónias é acentuadamente maior quando se introduzem ácaros (mortos ou vivos) nos alvéolos da criação de obreira.

As colónias de cada um dos dois grupos (H ou NH) reagem à introdução de ácaros, vivos ou mortos. Contudo, a introdução de ácaros vivos provoca uma maior reacção das obreiras em cada um desses grupos de colónias.

No que se refere exclusivamente à introdução de ácaros mortos (AMC e AMN), maiores níveis de resposta são dirigidos a alvéolos artificialmente infestados com AMN.

O Verão e o Outono são as estações do ano em que maiores níveis de resposta são dirigidos contra alvéolos artificialmente infestados na região em estudo.

Aparentemente não existe uma relação entre o comportamento higiénico (avaliado através do teste de morte da criação por congelação) e o comportamento de remoção de criação e parasitas do interior dos alvéolos operculados de obreira artificialmente infestados. Todavia, algumas colónias não mantiveram o nível de comportamento higiénico com que foram inicialmente classificadas.

Na resposta comportamental das colónias, o comportamento I (remoção de criação e parasitas) parece ser mais o preciso (em todos os métodos estudados), sendo assim o mais interessante para integrar programas de detecção e selecção de colónias que apresentem este comportamento como um dos mecanismos de tolerância à *V. destructor*.