

JANINA CARVALHO GONÇALVES

**MECANISMOS DE DEFESA COMPORTAMENTAL E
ANATÔMICO CONTRA DOENÇAS E ECTOPARASITAS EM
ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008**

JANINA CARVALHO GONÇALVES

**MECANISMOS DE DEFESA COMPORTAMENTAL E
ANATÔMICO CONTRA DOENÇAS E ECTOPARASITAS EM
ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2008.

Prof. José Eduardo Serrão
(Co-orientador)

Prof. Lucio Antônio de Oliveira
Campos

Prof^ª. Luciane Cristina de Oliveira
Lisboa

Prof. Luís Augusto Nero

Prof. Dejair Message
(Orientador)

*Aos meus pais,
Ilmar e Gracinha, pelo amor e exemplo,
Às minhas irmãs e sobrinhas,
Evângela, Jônia, Ilma, Josana, Gabriela e Rafaela,
pela amizade incondicional, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Eu Superior por nos tornar mais iluminados.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos durante parte do curso.

À Embrapa Meio-Norte, pela disponibilização de infra-estrutura e recursos humanos para realização de parte das pesquisas.

Ao professor Dejair Message, pela orientação e apoio no sentido de alcançar esta formação.

Ao professor José Eduardo Serrão, pelos ensinamentos e contribuições na elaboração deste trabalho.

Às pesquisadoras Maria Teresa do Rêgo Lopes e Fábria Mello Pereira pela orientação e apoio na concretização deste trabalho.

Ao professor Lúcio Antônio de Oliveira Campos pelos ensinamentos, previsões e profecias sobre ciência e vida.

Ao pesquisador Valdenir Queiroz Ribeiro pela dedicação nas análises estatísticas.

Aos amigos Gutita e Vêi pelo apoio, desafios e conquistas compartilhadas.

Aos amigos Mário, Aurinete, Neide, Mariana, Simone e Zé Maria pelo apoio e amizade durante esta caminhada.

Aos servidores do Apiário da UFV, Lulu, Osmar e em especial ao amigo Ferreira pelo auxílio dedicado nas atividades de campo e laboratorial.

A todos os colegas de curso pelo intercâmbio científico.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Comportamento higiênico, infestação por <i>Varroa destructor</i> e ocorrência de doenças de cria em abelhas africanizadas.....	13
3.1.1. Comparação entre testes do comportamento higiênico.....	13
3.1.2. Teste do comportamento higiênico no campo.....	15
3.1.3. Infestação por <i>Varroa destructor</i>	16
3.1.4. Investigação de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> em mel.....	17
3.1.5. Relação entre comportamento higiênico, infestação por <i>Varroa destructor</i> e resistência às doenças de cria.....	18
3.2. Comparação entre o tamanho dos pêlos do proventrículo em operárias de <i>Apis mellifera</i>	19
3.3. Eficiência de filtração do proventrículo em operárias de <i>Apis mellifera</i>	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Comportamento higiênico, infestação por <i>Varroa destructor</i> e ocorrência de doenças de cria em abelhas africanizadas.....	23
4.1.1. Comparação entre testes do comportamento higiênico.....	23
4.1.2. Teste do comportamento higiênico no campo.....	24
4.1.3. Infestação por <i>Varroa destructor</i>	25
4.1.4. Investigação de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> em mel.....	28
4.1.5. Relação entre comportamento higiênico, infestação por <i>Varroa destructor</i> e resistência às doenças de cria.....	28
4.2. Comparação entre o tamanho dos pêlos do proventrículo em operárias de <i>Apis mellifera</i>	30
4.3. Eficiência de filtração do proventrículo em operárias de <i>Apis mellifera</i> .	32
5. CONCLUSÕES.....	36
6. BIBLIOGRAFIA.....	37

RESUMO

GONÇALVES, Janina Carvalho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. **Mecanismos de defesa comportamental e anatômico contra doenças e ectoparasitas em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*)**. Orientador: Dejair Message. Co-orientadores: José Eduardo Serrão e Maria Teresa do Rêgo Lopes.

O presente estudo objetivou avaliar e selecionar colônias de *Apis mellifera* quanto à tolerância a doenças e ectoparasitas, e investigar características do proventrículo que conferem defesa contra patógenos. Colônias da microrregião de Viçosa, Minas Gerais foram analisadas quanto ao comportamento higiênico usando-se o método de perfuração e aos níveis de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria e as abelhas adultas. A presença de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em amostras de mel e os sinais clínicos de doenças de cria também foram investigados. O comprimento dos pêlos filiformes do proventrículo de operárias foi comparado entre castas temporais (recém-emergida, nutriz e forrageira) e entre colônias usando imagens de microscopia eletrônica de varredura. No Estado do Piauí, avaliou-se a eficiência de filtração de grãos de pólen por unidade de tempo do proventrículo de forrageiras entre colônias. Em relação ao comportamento higiênico, foi constatada correlação significativa entre os tempos de remoção da cria (24 e 48 horas) ($r=0,70755$; $P<0,001$). Aproximadamente 36% da população foi considerada higiênica ($F=8,94$; $P<0,01$). Os níveis de infestação por *Varroa destructor* foram $3,92\pm 3,23\%$ para a cria e $3,04\pm 1,43\%$ para as abelhas adultas. Esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* não foram detectados em quatorze amostras de mel compostas a partir de setenta colônias. Somente em duas colônias foram observados sinais clínicos de cria giz. Não houve correlação significativa entre o comportamento higiênico e o nível de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria ($r=-0,07589$; $P>0,05$), o comportamento higiênico e o nível de infestação por *Varroa destructor* sobre as abelhas adultas ($r=0,11133$; $P>0,05$) e, o nível de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria e as abelhas adultas ($r=0,03986$; $P>0,05$). Apenas dezenove entre setenta e sete colônias foram selecionadas considerando tanto o comportamento higiênico quanto os níveis de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria e as abelhas adultas. Foi verificada diferença significativa no comprimento dos pêlos

filiformes do proventrículo de operárias entre as colônias ($F=6,84$; $P<0,0001$), porém não se constatou diferença entre as castas temporais ($F=0,42$; $P>0,05$). Quanto à eficiência de filtração do proventrículo foi verificada diferença significativa entre as colônias ($P<0,0001$). Os resultados confirmam que o comportamento higiênico, os níveis de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria e as abelhas adultas e a eficiência de filtração do proventrículo podem ser usados como caracteres desejáveis para a seleção de colônias de abelhas melíferas mais resistentes às doenças e ectoparasitas.

ABSTRACT

GONÇALVES, Janina Carvalho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Behavioural and anatomic defense mechanisms against diseases and ectoparasites in Africanized honey bees (*Apis mellifera*)**. Adviser: Dejair Message. Co-Advisers: José Eduardo Serrão and Maria Teresa do Rêgo Lopes.

This study was conducted to select *Apis mellifera* colonies for diseases and ectoparasites tolerance and to investigate characters of proventriculus that confer protection against pathogens. Colonies in the region of Viçosa, Minas Gerais, Brazil, were evaluated for hygienic behavior using pin-killer brood and levels of infestation by *Varroa destructor* on brood and adults bees. The presence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey samples and observation of clinical signs of brood diseases were also investigated. The filiform-hairs length of the workers proventriculus was compared between temporal caste (newly-emerged, nurse and forager) and among colonies by scanning electro microscopy. Colonies in State of Piauí, Brazil, were evaluated for efficiency of filtration of pollen grains per unit time by forager's proventriculus. No difference was found between pin-killer brood and freezer-killer brood methods ($F=2,23$; $P>0,05$). Significant correlation was found between the removal time of brood (24 and 48 hours) ($r=0,70755$; $P<0,001$). Hygienic behavior occurred in approximately 36% of population ($F=8,94$; $P<0,01$). The infestation levels by *Varroa destructor* were $3.92\pm 3.23\%$ on brood and $3,04\pm 1,43\%$ on adults bees were considered lows. No *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores were detected in fourteen samples of honey made from seventy colonies. Only in two colonies was visualized chalkbrood. No significant correlation was found between hygienic behavior and infestation levels by *Varroa destructor* on brood ($r=-0,07589$; $P>0,05$), hygienic behavior and levels of infestation by *Varroa destructor* on adults bees ($r=0,11133$; $P>0,05$) and infestation levels by *Varroa destructor* on brood and adults bees ($r=0,03986$; $P>0,05$). Only nineteen between seventy seven colonies were selected regarding hygienic behavior and infestation levels by *Varroa destructor* on brood and adults bees. Significant differences were verified for filiform-hairs length of the workers proventriculus between colonies ($F=6,84$; $P<0,0001$), but no differences were found between temporal caste ($F=0,42$; $P>0,05$). In relation

the filtration efficiency of the proventriculus was verified significant difference between colonies ($P < 0,0001$). The results confirm that hygienic behavior, infestation levels of *Varroa destructor* on brood/adults bees and proventriculus filtration efficiency may be used as desirable trait for breeding diseases and ectoparasites resistant honeybees.

1. INTRODUÇÃO

A partir da década de 1970, foi registrada no plantel apícola brasileiro, a ocorrência de várias doenças e parasitas, todavia, sem causar danos econômicos preocupantes (Message, 1997).

As doenças de cria relatadas foram a cria pútrida européia (agente causal: *Melisococcus pluton*) (Guimarães & Gonçalves, 1977) e a cria giz (agente causal: *Ascospaera apis*) (Rocha *et al.*, 1998; Sattler *et al.*, 1998; Castagnino *et al.*, 2006ab). Também tiveram registro a nosemose (agente causal: *Nosema apis*) (Nascimento, 1970) e a acariose (agente causal: *Acarapis woodi*) (Nascimento, 1970; Nascimento *et al.*, 1971; Flechtmann, 1976; Silva, 1976) que atacam abelhas adultas, além da varroatose (agente causal: *Varroa destructor*), que prejudica tanto a cria, quanto as abelhas adultas (Morse & Gonçalves, 1979).

Paenibacillus larvae subsp. *larvae* que causa a cria pútrida americana foi isolado pela primeira vez em 2002, em colônias no Rio Grande do Sul, provavelmente por causa do fornecimento de alimentação contaminada ou da coleta de mel contaminado no entreposto pelas abelhas campeiras (Schuch *et al.*, 2003). Antes só haviam sido isolados esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em méis importados (Costa, 1995; Schuch *et al.*, 2001; Schuch *et al.*, 2003). Contudo, o primeiro caso clínico ocorreu em colméias no Estado do Paraná em 2007, sendo que, neste caso, algumas medidas oficiais de erradicação foram inicialmente tomadas (CIDASC, 2006; BRASIL, 2006).

Os vírus da paralisia aguda, filamentosos, das células escurecidas de rainhas e da asa nebulosa foram detectados em abelhas adultas doentes (Message, 1997), contudo podem afetar a cria (Allen & Ball, 1996). Abelhas com sinais clínicos similares aos causados pelo vírus da paralisia crônica têm sido observadas, mas ainda não foi confirmada a presença deste vírus (Message, 1997). Teixeira *et al.* (2008) detectaram em amostras coletadas no Estado de São Paulo a presença do vírus da paralisia aguda, das células escurecidas de rainhas e da asa deformada.

A maioria das viroses de abelhas persiste na população de modo similar como uma infecção não aparente ou latente, mas, sob certas circunstâncias, podem começar a se multiplicar e dispersar entre os indivíduos, levando ao

aparecimento dos sinais clínicos da doença (Bailey & Ball, 1991). No entanto, o diagnóstico de campo é muito difícil, na maioria dos casos.

A presença do vírus que causa a cria ensacada não foi detectada em abelhas no Brasil (Message, 1997). No entanto, foi verificado que o motivo de alta mortalidade da cria em várias regiões com sinais clínicos semelhantes à cria ensacada era o pólen tóxico de *Stryphnodendron* sp., conhecida comumente por barbatimão, e, por isso, denominada de cria ensacada brasileira (Message, 1997; Carvalho, 1998; Carvalho *et al.*, 1998; Carvalho & Message, 2004).

Dimorphandra mollis, conhecida como falso barbatimão, também é uma planta responsável pela intoxicação de abelhas, fenômeno conhecido como "mal de outono" (Cintra *et al.*, 1998). Outras espécies de plantas de muitas famílias causam envenenamentos às abelhas pela toxicidade do pólen ou néctar, secreção dos nectários extraflorais, seiva ou "honeydew" (Cintra *et al.*, 2005).

A traça *Galleria mellonella* causa danos econômicos significativos em todo o país, pois destrói a cera de melgueiras e do ninho, principalmente, no período de entressafra (Lopes *et al.*, 2004).

A mortalidade de colônias de *Apis mellifera* e de abelhas nativas que está ocorrendo frequentemente em várias regiões do país é atribuída ao uso indiscriminado de pesticidas devido aos sinais de intoxicação característicos.

Muitas abelhas atingidas diretamente por um inseticida não têm resistência necessária para retornar à sua colméia e morrem no campo ou no vôo de volta. Por outro lado, as abelhas que são contaminadas pela deriva quando visitam espécies silvestres, eventualmente morrem na colméia (Porrine *et al.*, 2003).

Até o momento, investigações sobre um declínio populacional que está ocorrendo na região Sudeste desde 2000 apontam três possíveis causas: o protozoário *Nosema ceranae*, o ácaro *Varroa destructor* e o uso irregular de inseticidas (Message, 2007). Esta foi a primeira constatação de *Nosema ceranae* no território nacional (Klee *et al.*, 2007). Sugere-se que este seja um patógeno emergente, e sua transmissão de *Apis cerana* para *Apis mellifera* ocorreu na última década.

Apesar de pesquisas demonstrarem que o grau de infestação por *Varroa destructor* se mantém baixo (Moretto *et al.*, 1995; Moretto & Leônidas, 2003), existe uma preocupação com a evolução na sua taxa de reprodução. Essa preocupação também deve considerar que as interações entre viroses e parasitas, como *Varroa destructor* e *Acarapis woodi*, estão envolvidas na mortalidade de abelhas melíferas (Ball & Allen, 1988; Allen & Ball, 1996; Brødsgaard *et al.*, 2000).

As viroses também estão intimamente associadas com o ciclo de incidência do microsporídio parasita *Nosema apis* (Bailey *et al.*, 1981; Bailey *et al.*, 1983). Este parasita pode diminuir a resistência das abelhas contra viroses que penetram pelo intestino. Enquanto as viroses potencializam o efeito patogênico de *Nosema apis*, sua presença ou ausência pode explicar a grande variação na virulência que tem sido registrada para este parasita (Allen & Ball, 1996).

Apesar de cientistas brasileiros constatarem um agravamento nas doenças das abelhas com alguns dos sinais clínicos semelhantes à Desordem do Colapso das Colônias (Colony Collapse Disorder - CCD) que causou o desaparecimento súbito de abelhas nos Estados Unidos e Europa (Message, 2007), ainda não foi registrado nenhum caso oficial no país. Existem várias hipóteses para o agente causal da CCD, mas ainda não foi encontrada uma explicação definitiva (Cox-Foster *et al.*, 2007).

No atual cenário de agravamento de problemas sanitários na apicultura mundial é necessária a adoção de estratégias que garantam maior proteção à saúde das abelhas, e que incrementem o nível e a qualidade da produção nacional.

O enfoque corrente de várias pesquisas tem sido descobrir tratamentos alternativos para eliminar ou reduzir a necessidade de drogas contra *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e ácaros parasitas, e manter a colméia livre de contaminantes químicos (Alippi *et al.*, 1996; Feldlaufer, 1993; Melathopoulos *et al.*, 2000; Pohorecka, 2004).

Avanços recentes em genética (Decanni *et al.*, 2007) e genoma de abelha melífera (Evans *et al.*, 2006; The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006), bem como de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e *Ascospaera apis* (Qin *et al.*, 2006) podem proporcionar uma compreensão

sobre a etiologia de agentes naturais de doenças e a habilidade dos indivíduos tolerarem ou resistirem aos patógenos.

Mecanismos de resistência às pragas e doenças com grau significativo de variabilidade genética também são investigados em abelhas africanizadas para aplicação em programas de seleção e melhoramento genético de abelhas (Gramacho, 1999; Corrêa-Marques *et al.*, 2000; Guerra Jr. *et al.*, 2000).

Visando avaliar e selecionar colônias de *Apis mellifera* quanto à tolerância a doenças e ectoparasitas, e investigar características do proventrículo que conferem defesa contra patógenos, o presente estudo teve como objetivos específicos:

- Verificar se existe diferença entre os métodos de perfuração e congelamento de crias com nitrogênio líquido para a avaliação do comportamento higiênico;
- Determinar o comportamento higiênico, os níveis de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria e as abelhas adultas, avaliar a presença de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no mel e a ocorrência de doenças de cria em colônias da microrregião de Viçosa, Minas Gerais;
- Avaliar se existe variabilidade genética no tamanho dos pêlos filiformes e na eficiência de filtração do proventrículo de abelhas operárias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As abelhas melíferas desenvolveram mecanismos efetivos que protegem tanto uma abelha como a colônia inteira contra inúmeros patógenos (Gliński & Jarosz 1995ab, 2001).

A variabilidade genética tem sido atribuída a três classes gerais de mecanismos de resistência às doenças em abelhas melíferas: fisiológico, comportamental e anatômico (Page & Guzmán-Novoa, 1997). Contudo, vários fatores podem afetar a resistência da colônia como: meteorológicos, alimentares, manejo da colméia, resíduos de poluição atmosférica, pesticidas ou drogas veterinárias (Colin, 1999).

Mecanismos Fisiológicos

Ambiente bioquímico do intestino

Em condições normais, a primeira via de penetração de bactérias, fungos, viroses e protozoários nas abelhas é o trato intestinal. Então, a primeira barreira de defesa contra a infecção está no intestino. O efeito protetor do conteúdo intestinal das abelhas pode ser devido a vários componentes, como: alimento e produtos da digestão, enzimas digestivas, valores extremos de pH, potencial redox, microbiota, substâncias antimicrobianas ingeridas com o alimento (tratadas de maneira especial a seguir) e substâncias inibidoras produzidas pela microbiota intestinal ou secretadas dentro do lúmen intestinal a partir da hemolinfa (Gliński & Jarosz, 1995a).

As abelhas adultas resistem à cria pútrida americana quando alimentadas com esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Wilson, 1971; Woodrow & Holst, 1942) devido à atividade inibitória de substâncias presentes no intestino médio (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001).

O efeito inibitório do ambiente intestinal em larvas com mais de dois dias de idade, faz com que milhões de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* sejam necessários para infectá-las. A variabilidade genética para este tipo de resistência tem sido demonstrada para cria pútrida americana (Rothenbuhler & Thompson, 1956; Bambrick & Rothenbuhler, 1961; Lewis & Rothenbuhler, 1961; Bambrick, 1964; Hoage & Rothenbuhler, 1966).

Extrato água-etanol do intestino de larvas com dois dias de idade, oriundas de colônias diferentes, exibiram diferenças no potencial de inibição do *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, o que sugere que a concentração das

substâncias inibidoras do extrato intestinal pode ser responsável pela diferença no grau de resistência contra *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* in vivo (Wedenig *et al.*, 2003).

Taxa de desenvolvimento larval e idade

Larvas de linhagens resistentes eram maiores que aquelas de linhagens susceptíveis durante o desenvolvimento larval inicial, tornando-as menos susceptíveis a infecção por esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Sutter *et al.*, 1968).

Investigações sobre a relação dose-mortalidade entre *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e abelhas melíferas sugerem influência da idade larval (Rothenbuhler & Thompson, 1956; Bamrick & Rothenbuhler, 1961; Lewis & Rothenbuhler, 1961; Hoage & Rothenbuhler, 1966). O extrato de duas larvas com quatro dias de idade inibiu, significativamente, o crescimento de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, em relação ao extrato de larvas de 30-36 horas, (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001).

A habilidade de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* para penetrar no intestino médio depende do estágio de desenvolvimento da abelha. Larvas de abelhas com cerca de 24 horas de idade foram mais susceptíveis quando ingeriram esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Woodrow, 1941, 1942; Brødsgaard *et al.*, 1998), apresentando uma clara relação entre dose e resposta, com uma dose-letal oral (DL₅₀) igual a 8,49 esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Brødsgaard *et al.*, 1998).

As larvas com menos de 24 horas de idade de diferentes linhagens apresentaram taxas de sobrevivência distintas após inoculação de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Rothenbuhler & Thompson, 1956; Brødsgaard & Hansen, 2003).

Uma variação significativa foi descrita para linhagens comerciais de abelhas melíferas em termos de susceptibilidade larval ao *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e foi considerada que esta característica pode ser melhorada usando seleção artificial (Rothenbuhler & Thompson, 1956). Também existe evidência de que a larva oriunda de uma determinada linhagem paterna dentro da mesma colônia seja mais provável de sucumbir após inoculação com *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* que as outras (Palmer & Oldroyd, 2003).

As crias de operárias com tempo de desenvolvimento reduzido são relativamente mais resistentes à varroa devido aos poucos descendentes do ácaro que atingem o estágio adulto antes da abelha emergir (Message, 1986).

Secreções da abelha e alimentação

Tanto a larva quanto a abelha adulta produzem substâncias fisiológicas que impedem o crescimento, o desenvolvimento ou a reprodução do patógeno ou do parasita (Page & Guzmán-Nova, 1997; Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001).

Um mecanismo de defesa da colônia, manifestado pela atividade de alimentação das larvas pelas abelhas nutrizas, é a ação antimicrobiana de secreções de glândulas exócrinas de operárias (hipofaringeana e mandibulares) presentes no alimento das larvas de operárias e de rainhas (geléia real) (Glinzski & Jarosz, 1995a).

A proteção diferencial das larvas pelas abelhas adultas contra a cria pútrida americana pode ser atribuída, dentre outras possibilidades, a um fator antibacteriano presente no alimento larval secretado por glândulas das abelhas nutrizas (Thompson & Rothenbuler, 1957).

Nenhum efeito da geléia real foi verificado sobre a sobrevivência de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Hornitzky, 1998). Contudo, foi evidenciado efeito diferente da geléia real oriunda de colônias diferentes sobre a inibição do crescimento de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001). Os mesmos autores também verificaram uma notável diferença entre geléia real e geléia de operária em sua efetividade contra *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*.

Rose & Briggs (1969) relataram que o alimento da cria produzido por linhagens resistentes apresentou maior inibição da germinação *in vitro* de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em relação às susceptíveis.

A atividade antibacteriana contra *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* é atribuída, especificamente, às frações peptídicas isoladas da geléia real. A royalisina pode ser o peptídeo responsável por esta atividade (Bíliková *et al.*, 2001) e diferenças no conteúdo de peptídeos antibacterianos da geléia real entre colônias podem estar associadas com a variabilidade genética (Bachanová *et al.*, 2002).

Dois peptídeos da família das jaleínas (I e III), isolados da geléia real, apresentaram atividade antimicrobiana contra leveduras e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, contudo, estes não apresentaram qualquer similaridade com outros peptídeos antimicrobianos de abelhas melíferas (Fontana *et al.*, 2004).

Outros compostos identificados na geléia real como inibidores bacterianos são o ácido 10-hidroxi-2-decenoico e a glucose oxidase (Gliński & Jarosz, 2001).

Apesar do comprovado espectro da ação antibacteriana de diferentes méis associado às suas características físico-químicas (Molan, 1992; Bogdanov, 1997; Weston *et al.*, 2000; Nzeako & Hamdi, 2000; Khalil *et al.*, 2001; Selçuk & Nevin, 2002), esporos viáveis de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* são disseminados entre as abelhas pelo consumo de mel contaminado. Extratos de mel também não apresentaram nenhum efeito inibidor do crescimento de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001).

A adição de pólen na alimentação reduz significativamente a mortalidade das larvas inoculadas com esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Rinderer *et al.*, 1974). O pólen também pode conter microrganismos que atuam como antagonistas ao *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Brødsgaard *et al.*, 1998).

Extratos de pólen de *Zea mays*, coletados nas corbículas e no “pão da abelha”, em altas concentrações inibiram o crescimento de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, porém o mesmo pólen, coletado direto das flores, exibiu potencial de inibição mais fraco sobre o crescimento de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001).

Resposta imune

A resposta imunológica de abelhas à entrada de organismos estranhos, como nos insetos em geral, constitui-se de reações celulares e humorais (Gliński & Jarosz, 1995b). As reações celulares mediadas por hemócitos incluem a fagocitose, a nodulação e a encapsulação. Por outro lado, as reações humorais envolvem a ativação da cascata de profenoloxidase e a

indução de proteínas tais como: lisozimas, lectinas e peptídeos antibacterianos e antifúngicos (Narayanan, 2004).

Dentre essas moléculas, estão as apidaecinas, família de pequenos peptídeos (18 aminoácidos) antibacterianos isolados de *Apis mellifera* que são induzidos a partir de infecção bacteriana (Casteels *et al.*, 1989), a abaecina e a defensina que possuem similaridades em nível seqüencial com peptídeos antimicrobianos de outros insetos (Casteels & Tempst, 1994).

A abaecina, responsável pela resposta imune em abelhas (Casteels *et al.*, 1990), tem sido apresentada como reguladora da resposta imune de larvas de abelhas expostas ao *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Evans, 2004). Abelhas de colônias com níveis baixos de ocorrência de cria pútrida americana tenderam a ter elevados níveis transcritos para um gene codificando a abaecina, quando comparada às colônias com altos níveis da doença (Evans & Pettis, 2005). Uma variação hereditária significativa é apresentada para expressão do gene abaecina (Decanni *et al.*, 2007).

O custo da resposta imune em *Apis mellifera* pode afetar tanto a sobrevivência do hospedeiro, quanto a memória e o comportamento (Mallon *et al.*, 2003). As colônias cujos indivíduos apresentaram uma forte resposta imune tenderam a taxas de produção larval significativamente menores, indicando um custo substancial para essa resposta imune (Evans & Pettis, 2005).

Mecanismos Comportamentais

O comportamento higiênico das abelhas do gênero *Apis* é a capacidade das abelhas de detectar e remover crias mortas, doentes ou infestadas com ácaros do interior de suas colônias (Rothenbuhler, 1964a; Gonçalves & Kerr, 1970; Moretto, 1993, Moretto *et al.*, 1993) ou de remover qualquer material estranho no interior da colméia (Message, 1979).

Inicialmente, Rothenbuhler (1964ab) concluiu que o comportamento das abelhas é controlado geneticamente por dois pares de genes recessivos (gene *d* = desoperculador e gene *r* = removedor) os quais, em homozigose (*dd/rr*), determinam o comportamento higiênico. Os genótipos *D_/R_* determinam o comportamento não higiênico.

Moritz (1988) re-avaliou o modelo de dois locus de Rothenbuhler e propôs que o mecanismo genético podia ser mais complexo, sendo o

comportamento higiênico controlado por três pares de genes. Um par responsável pela desoperculação (d/d) e dois pela remoção (r1/r1,r2/r2). As abelhas higiênicas então teriam o genótipo d/d,r1/r1, r2/r2. As homozigotas em um locus (r1 ou r2) removeriam parcialmente crias mortas. Gramacho (1999) propôs um novo modelo que prevê a existência de dois genes que controlam a perfuração e desoperculação (u_1 e u_2) e um controlando a remoção (r). Recentemente, foi apresentado que a base genética para o comportamento higiênico é mais complexa, com muitos genes envolvidos (Lapidge *et al.*, 2002).

Já foi evidenciado que as abelhas melíferas que expressam comportamento higiênico são resistentes à cria pútrida americana (Park *et al.*, 1937; Woodrow & Holst, 1942; Rothenbuhler, 1964ab; Newton & Ostasiewski, 1986; Spivak & Gilliam, 1998ab; Palacio *et al.*, 2000; Palacio & Bedascarrasbure, 2001; Spivak & Reuter, 2001b; Brødsgaard & Hansen, 2003), à Cria pútrida européia (Cosenza & Silva, 1972; Milner, 1985; Message & Gonçalves, 1976, 1977), à Cria giz (Gilliam *et al.*, 1988; Spivak & Gillian, 1993; Invernizzi, 2001) e ao ácaro *Varroa destructor* (Peng *et al.*, 1987; Boecking & Drescher, 1991, 1992; Moretto *et al.*, 1991ab, 1993, 1995; Rosenkranz *et al.*, 1993; Spivak, 1996; Spivak & Gilliam, 1998a; revisado em Boecking & Spivak, 1999; Harbo & Harris, 1999; Guerra Jr. *et al.*, 2000; Spivak & Reuter, 2001a).

O comportamento higiênico ocorre relativamente em baixa frequência (Spivak & Gilliam, 1993) e sua expressão é diferenciada entre linhagens de abelhas (Brødsgaard & Hansen, 2003). Palácio *et al.* (2000) observaram um aumento da eficiência do comportamento higiênico após quatro anos de um trabalho de seleção onde o acasalamento não era controlado.

As abelhas africanizadas são consideradas mais higiênicas, portanto, mais resistentes que as raças européias (Cosenza & Silva, 1972; Message, 1979; Gramacho, 1995, 1999; Gramacho & Gonçalves, 1996; Guerra Jr. *et al.*, 2000). A expressão do comportamento higiênico pode ser influenciada pelo fluxo de néctar, pois sua entrada estimula a taxa de remoção de cria morta ou doente (Thompson, 1964; Momot & Rothenbuhler, 1971).

Um mecanismo extremamente importante e eficaz associado ao comportamento higiênico é a capacidade da colméia de regenerar perdas da população em curto prazo (Dustmann, 1993).

Uma estratégia de defesa contra *Varroa destructor* é o comportamento de limpeza, no qual a abelha remove o ácaro de seu próprio corpo realizando movimentos vibratórios laterais do abdome, ou do corpo de outra operária com as mandíbulas. As abelhas também são capazes de reconhecer as células de cria operculada infestadas, de remover e de matar o ácaro com suas mandíbulas (Ruttner & Hanel, 1992; Peng *et al.*, 1987; Moretto *et al.*, 1991b; Boecking & Ritter, 1993; Spivak & Reuter, 2001a).

Do mesmo modo, em abelhas operárias, a remoção de *Acarapis woodi* do seu corpo parece ser o mecanismo primário de resistência (Danka & Villa, 1998, 2003; Pettis & Pankiw, 1998). Diferenças na infestação de operárias por *Acarapis woodi* foram observadas entre linhagens resistentes e susceptíveis (Villa & Danka, 2005). As operárias jovens usam suas pernas mesotorácicas para remover as fêmeas migrantes do ácaro. No caso de abelhas resistentes, a remoção de ácaros é mais eficiente (Danka & Villa, 1998, 2003).

Mecanismos Anatômicos ou Mecânicos

Um modo de resistência anatômica é atribuído à capacidade de operárias filtrarem fungos, bactérias e protozoários pela ação do proventrículo (Bailey, 1952; Sturtevant & Revell, 1953; Thompson & Rothenbuler, 1957; Seeley, 1985; Peng & Marston, 1986). Esta habilidade pode prevenir, em alguma extensão, a contaminação do alimento com esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* que é fornecido para as larvas (Sturtevant & Revell, 1953; Thompson & Rothenbuler, 1957).

Verificou-se que as linhagens resistentes de abelhas filtram esporos bacterianos (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* e *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) mais eficientemente que as linhagens suscetíveis (Plurad & Hartman, 1965; Sturtevant & Revell, 1953).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comportamento higiênico, infestação por *Varroa destructor* e ocorrência de doenças de cria em abelhas africanizadas

3.1.1. Comparação entre testes do comportamento higiênico

O experimento foi desenvolvido em março de 2006, utilizando 5 colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) mantidas no Apiário Experimental do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. As colméias onde os enxames estavam instalados foram do tipo núcleo (cinco favos). As rainhas foram acasaladas naturalmente. No apiário foi disponibilizada alimentação coletiva com xarope de água e açúcar (50%) neste período.

Os métodos testados para avaliação do comportamento higiênico foram perfuração (Newton e Ostasiewski, 1986 modificado por Gramacho & Gonçalves, 1994, 1997) e congelamento usando nitrogênio líquido (Spivak & Downey, 1998; Spivak & Reuter, 1998b; Spivak & Reuter, 2001b), conforme descritos a seguir.

a) Método de perfuração

Consistiu em perfurar uma área com 100 células de um favo de cria operculada de operária com cerca de 10 a 14 dias de idade. O alfinete entomológico nº2 foi introduzido no centro dos opérculos em uma profundidade que permite matar a cria.

b) Método de congelamento com nitrogênio líquido

Consistiu em despejar um volume de 200 mL de nitrogênio líquido (N₂) sobre uma área de um favo de cria operculada de operária com cerca de 10 a 14 dias de idade. A área para despejar o N₂ foi delimitada por um cilindro oco de 10 cm de diâmetro.

c) Comparação entre testes do comportamento higiênico

Os dois métodos descritos acima foram aplicados em um mesmo favo retirado de cada colônia. Uma área com cerca de cem células de cria operculada de operária constituiu o controle.

Tanto a área controle quanto as tratadas foram demarcadas usando-se uma folha de transparência, na qual também se registraram o número de células de cria operculadas, vazias e parcial ou completamente desoperculadas.

Em seguida, o favo foi devolvido a colônia. Após 24 e 48 horas, o favo foi retirado e registrado o número de células onde a cria havia sido removida nas áreas tratadas e no controle.

O fator de correção Z (Moretto *et al.*, 1993) corresponde à taxa de limpeza natural do controle e foi calculado para ser descontado do valor das crias removidas nas áreas tratadas. Assim, o valor estimado para o comportamento higiênico (CH) da colônia foi considerado somente quando o Z no controle foi igual ou inferior a 10%, isto é, se não existisse mais de dez células vazias após 24 ou 48 horas.

A fórmula utilizada para estimativa de Z foi:

$$Z = (Y \times 100)/A$$

onde:

Z = % de células onde a cria operculada foi removida naturalmente no controle;

A = Número de células de cria operculadas no controle antes da introdução do favo na colônia para o teste de limpeza;

Y = Número de células na qual a cria foi removida naturalmente no controle, sendo que: $Y = C - B$;

C = Número de células vazias do controle após o favo ter sido submetido ao teste de limpeza na colônia analisada;

B = Número de células vazias da área B antes do favo ser submetido ao teste de limpeza.

Para comparação entre os testes de comportamento higiênico foi aplicada a fórmula estabelecida por Gramacho & Gonçalves (1994, 1997):

$$CH = [(CV_{24\text{ h}} - CV) / -Z] / CO$$

onde:

CV_{24h} = Número de células vazias 24 horas após a perfuração;

CV = Número de células vazias antes da perfuração das células operculadas;

CO = Número de células de cria operculadas antes da perfuração;

Z = Fator de correção obtido do controle.

Os testes foram repetidos três vezes em intervalo de 5 dias. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar o efeito dos métodos perfuração e de congelamento sobre o comportamento higiênico das colônias (Pimentel-Gomes, 2000). Análise de correlação de Pearson (Ferreira, 2005) foi empregada para avaliar os tempos de remoção da cria perfurada e congelada (24 e 48 horas). Nas análises foi usado o software SAS INSTITUTE (1989).

3.1.2. Teste do comportamento higiênico no campo

No experimento foram utilizadas 77 colônias de abelhas africanizadas, cedidas por 20 apicultores da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. Todas as colônias foram instaladas em um apiário do Sítio das Abelhas, localizado a 22°45'33.0" sul e 42°52'03.7" oeste, município de Paula Cândido, Minas Gerais. As rainhas foram acasaladas naturalmente.

Em março de 2006, as colônias foram avaliadas quanto ao comportamento higiênico usando-se o método de perfuração (Fig. 1) (Newton & Ostasiewski, 1986 modificado por Gramacho & Gonçalves, 1994). Foram realizados 2 testes em cada colônia com intervalo de 5 dias.

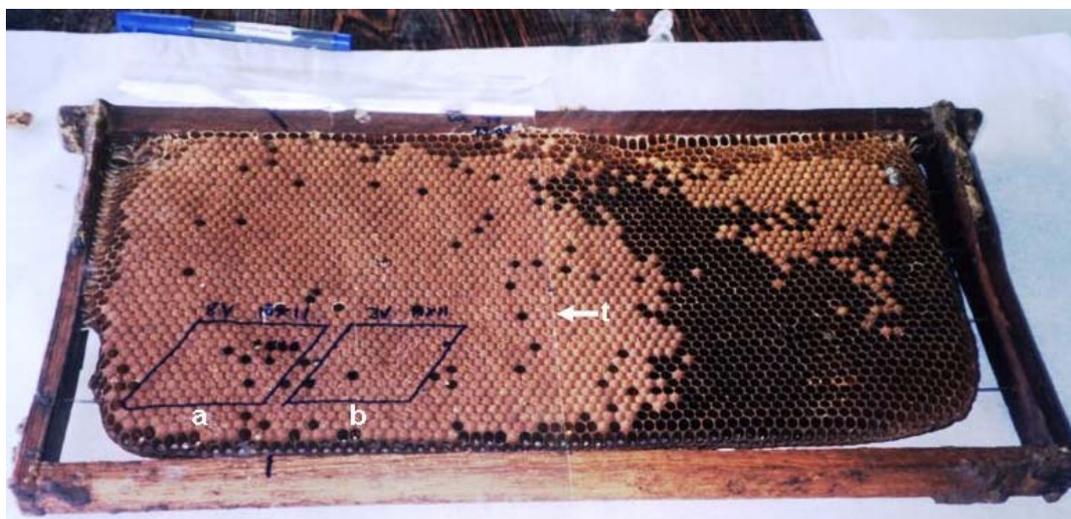


Figura 1. Favo para teste de comportamento higiênico, mostrando área a ser perfurada (a) e área controle (b) demarcadas com uma folha de transparência (t).

A ANOVA foi usada para verificar o efeito da colônia sobre o comportamento higiênico. A variabilidade genética foi estimada a partir da variação do efeito da colônia (Pimentel-Gomes, 2000). As colônias foram

classificadas como higiênicas ou não higiênicas de acordo com Gramacho & Gonçalves (1994, 1997).

3.1.3. Infestação por *Varroa destructor*

Em abril de 2006, colônias da mesma população avaliadas quanto ao comportamento higiênico foram analisadas quanto à infestação por *Varroa destructor* sobre as abelhas adultas e a cria.

a) Abelhas adultas

Adaptando a metodologia desenvolvida por De Jong & Gonçalves (1981), trezentas a quinhentas abelhas adultas foram coletadas a partir de um favo de cada colônia para dentro de um vidro contendo etanol 70%. Em seguida o vidro foi tampado. Foram retiradas amostras de abelhas adultas em oitenta colônias.

As amostras foram agitadas periodicamente durante 30 minutos para liberação de *Varroa destructor* do corpo da abelha. O conteúdo foi despejado sobre um recipiente plástico que continha internamente uma tela de arame com malha que retinha as abelhas e permitia a passagem desses ácaros para uma bandeja onde foram computados. O processo foi repetido até que não caísse mais nenhum ácaro. O número de ácaros coletados e de abelhas da amostra foi registrado.

O percentual de ácaros infestando as abelhas adultas (IAb) foi estimado com a seguinte fórmula:

$$IAb = (Ac/Ab) \times 100$$

onde:

Ac = número de ácaros adultos encontrados

Ab = número de abelhas analisadas

A ANOVA foi usada para avaliar o efeito da colônia sobre o percentual de ácaros infestando as abelhas adultas (Pimentel-Gomes, 2000).

b) Cria

A infestação por *V. destructor* em crias foi avaliada em 76 colônias, usando o método de Gonçalves *et al.* (1982). Um favo foi retirado da colônia, e 100 células de cria operculada de operárias foram desoperculadas. Pupas com olhos escuros e corpo iniciando a pigmentação foram removidas com o auxílio

de uma pinça. Fazendo-se o uso de uma lupa, observou-se minuciosamente o corpo de cada pupa e o fundo de sua célula, e registrou-se a presença de *Varroa destructor*.

O percentual de ácaros infestando a cria (IC) foi obtido com a seguinte fórmula:

$$IC = (AI/AA) \times 100$$

onde:

AI = número de alvéolos infestados

AA = número de alvéolos analisados

A ANOVA foi usada para avaliar o efeito da colônia sobre o percentual de ácaros infestando a cria (Pimentel-Gomes, 2000).

3.1.4. Investigação de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em mel

Foram coletadas 14 amostras de mel a partir de 70 colônias da mesma população testada para comportamento higiênico e infestação por *Varroa destructor*. Cada amostra foi composta por frações de mel de 5 colônias como recomendado por Hansen & Rasmussen (1986) e Hansen & Brødsgaard (1999). Para isso, pressionou-se com a borda de um pote de vidro (250 mL) a região superior do favo de cria até romperem os opérculos e o mel escorrer dentro do recipiente.

Em seguida, o pote foi lacrado e identificado com o número das colônias. A coleta foi realizada em apenas um quadro do ninho de cada colônia. A amostra podia conter cera ou abelhas por não se tratar de análise de qualidade do produto.

As amostras foram submetidas à análise segundo metodologia oficial para pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em mel (Brasil, 2003), conforme descrito a seguir. O método é capaz de detectar menos de 10 esporos viáveis de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* por 1 mL de mel (Schuch *et al.*, 2001).

Cada amostra foi aquecida em banho-maria a 45°C durante o tempo necessário para diminuir sua viscosidade. Após homogeneização vigorosa da amostra, transferiu-se, assepticamente, uma alíquota de 20 mL para tubo de centrifuga esterilizado, tipo “Falcon” com tampa rosqueável, e adicionaram-se 30 mL de solução salina tamponada pH 7,2 (PBS).

O tubo fechado foi agitado vigorosamente e centrifugado a 3000 g durante 30 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, ressuspenso em 1 mL de PBS, foi transferido para tubo de ensaio com tampa de rosca e submetido a choque térmico de 80°C por 10 minutos para inativação das células vegetativas.

Foram inoculadas duas alíquotas da suspensão preparada a partir de cada amostra de mel sobre a superfície seca de ágar *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (ABL), desenvolvido por Schuch *et al.* (2001). Uma alíquota de 0,1 mL foi espalhada com auxílio de bastão de vidro tipo “hockey” e a outra de 10 µL foi estriada.

O ágar ABL é um meio sólido seletivo a base de quantidades iguais (100 mL) de ágar base *Bacillus cereus* (PEMBA), ágar soja triptona (TSA) e ágar nutriente suplementado (SNA), enriquecido com ácido nalidíxico (0,1%), ácido pipemídico (0,2%) e emulsão de gema de ovo (50%).

As duas placas de cada amostra de mel foram incubadas invertidas a 36±1°C e examinadas após 30 horas e diariamente por cinco dias quanto ao crescimento de colônias típicas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Três a cinco colônias típicas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* foram submetidas à prova de catalase e preparado esfregaço e corado pelo método de Gram. O *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* é catalase negativa e Gram positivo.

Todo material usado durante as análises microbiológicas com *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* foi submetido a autoclavação por 60 minutos à 121°C, antes da lavagem ou descarte.

3.1.5. Relação entre comportamento higiênico, infestação por *Varroa destructor* e resistência às doenças de cria

Durante todos os experimentos as colônias foram examinadas para registro de ocorrência de doenças de cria. As colônias foram selecionadas com base nos resultados do comportamento higiênico, infestação por *Varroa destructor*, presença de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e ocorrência de doenças de cria. Correlação de Pearson (Ferreira, 2005) foi usada para analisar o efeito do comportamento higiênico sobre o nível de infestação por

Varroa destructor na cria e nas abelhas adultas. Nas análises foi usado o software SAS INSTITUTE (1989).

3.2. Comparação entre tamanho dos pêlos do proventrículo em operárias de *Apis mellifera*

O experimento no campo foi conduzido com 5 colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) do Apiário Central do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais, no período de outubro a novembro de 2006. As rainhas foram acasaladas naturalmente.

Favos com pupas pré-emergentes de cada colônia foram incubados isolados em gaiolas a 35°C e 50% de umidade relativa para a obtenção de abelhas com idade controlada. Após 24 horas, 10 abelhas recém-emergidas de cada colônia foram coletadas em recipientes identificados com o número da colônia, enquanto 80 foram marcadas no tórax com tinta automotiva e devolvidas para a colônia de origem.

Dez das abelhas marcadas do interior nas mesmas colônias foram coletadas 10 dias depois. Após 20 dias, não foram observadas as abelhas marcadas, e, por isto, 10 abelhas foram coletadas na entrada da colônia quando retornavam do campo, após a atividade de forrageamento. Isto pode ter ocorrido devido à rejeição das abelhas marcadas pela colônia em função do cheiro da tinta

Para análise das informações, as abelhas operárias foram qualificadas como: I) Recém-emergidas (coletadas a partir dos favos isolados); II) Nutrizes (operárias com 10 dias de idade); III) Forrageiras (coletadas retornando ao ninho). Devido ao grande número de indivíduos a serem estudados, todos foram fixados em solução de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) para dissecação sob estereomicroscopia.

Posteriormente o intestino das abelhas foi removido por inteiro, puxando-se firmemente com uma pinça o último segmento abdominal da abelha e, em seguida, o proventrículo foi isolado do intestino. Os proventrículos foram abertos por uma incisão longitudinal (Serrão, 2001), desidratados em série alcoólica crescente e transferidos para hexametildisilazane (HMDS). As

amostras foram transferidas para suportes de alumínio após secagem ao ar, metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) LEO VP 1430 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Cinco pêlos filiformes de cada proventrículo, selecionados aleatoriamente, foram medidos.

Das mesmas abelhas também foi removida uma glândula hipofaringeana. Cada glândula foi transferida para lâmina de microscopia, corada com corante Vermelho neutro e montada com gelatina glicerinada. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz e as imagens digitalizadas com uma câmera digitalizadora acoplada ao microscópio.

Como referência do desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas foi utilizada a medida da área de 5 ácidos, selecionados aleatoriamente, com auxílio do programa Image Pro-Plus 5.0 (Media Cybernetics Ltd).

Para se estudar as diferenças no tamanho dos pêlos de operárias entre as castas temporais (recém-nascida, nutriz e forrageira) e entre colônias foi usada a análise de variância. O comprimento dos pêlos foi comparado com o teste de Tukey (Pimentel-Gomes, 2000). A análise de correlação de Pearson (Ferreira, 2005) foi usada para se determinar a relação entre o comprimento dos pêlos e a área dos ácidos das glândulas hipofaringeanas. O software SAS INSTITUTE (1989) foi usado nas análises.

3.3. Eficiência de filtração do proventrículo em operárias de *Apis mellifera*

O experimento foi conduzido em 4 colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) do Apiário Experimental do Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária em Teresina, Piauí, de maio a outubro de 2007. As rainhas foram acasaladas naturalmente.

Foram coletadas 30 abelhas operárias no alvado de cada colônia experimental, utilizando um recipiente de vidro com tampa ventilada. As abelhas foram submetidas à temperatura de -5°C durante 5-8 minutos para anestesiá-las e, em seguida, foram colocadas individualmente em tubos tipo “ependorf” de 200 µL com fundo cortado em bisel para permitir que a cabeça da abelha ficasse exposta.

As abelhas foram mantidas sem alimento durante 2 horas em ambiente escuro e temperatura controlada de 32-34°C para assegurar que o papo

estivesse vazio. Depois cada abelha foi alimentada com 20 μ l de uma suspensão de pólen de concentração conhecida (Fig. 2). Entre cada alimentação, a suspensão era agitada para uma distribuição uniforme dos grãos de pólen.



Figura 2. Alimentação de operária de *Apis mellifera* com suspensão de pólen.

Foram utilizados grãos de pólen da família Amaranthaceae, escolhidos em função do seu tamanho pequeno, visto que agentes patogênicos apresentam tamanho reduzido. O pólen foi coletado, previamente, nas próprias colônias experimentais com coletor de alvado.

Cinco gramas de pólen foram macerados com uma gota da solução de azul de metileno a 1% e adicionados a 10 mL de xarope de açúcar invertido (50%) para o preparo da suspensão. O xarope foi preparado com cinco partes de açúcar para uma de água, adicionando-se ácido cítrico, sob calor, para fazer a inversão.

Após alimentação as abelhas foram mantidas em ambiente com iluminação reduzida e temperatura controlada de 34-35°C. O papo dessas abelhas foi removido após 1, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos da alimentação para se avaliar a concentração de grãos de pólen. Quatro abelhas foram utilizadas por intervalo de tempo. A contagem dos grãos de pólen no conteúdo do papo foi realizada ao microscópio em 400 X com auxílio de uma câmara de Neubauer (Fig. 3).

O papo foi cortado cuidadosamente com auxílio de um bisturi para que seu conteúdo, por capilaridade, preenchesse completamente um dos lados da câmara de Neubauer, que foi examinada após dois minutos do seu preenchimento, para sedimentação do pólen. Imagens digitalizadas foram

obtidas com câmera digitalizadora acoplada ao microscópio e a concentração do conteúdo do papo (grãos/mL) calculada.

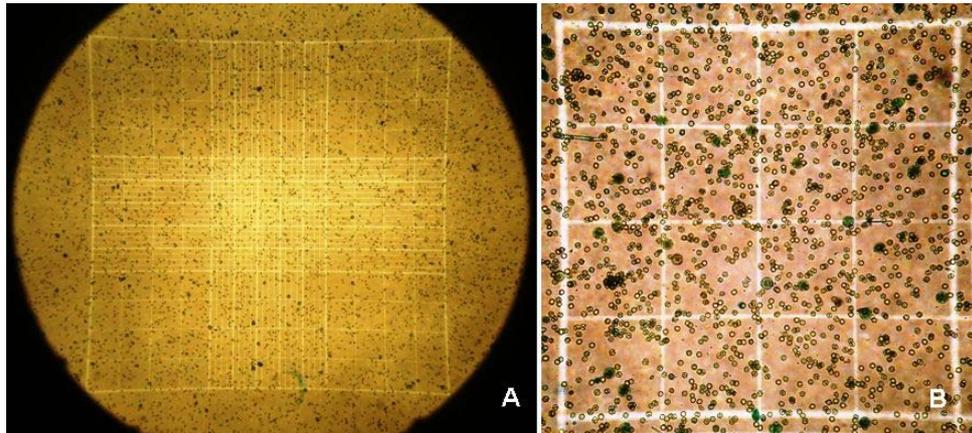


Figura 3. Imagens microscópicas da câmara de Neubauer com o fluido extraído do papo de operária de *Apis mellifera*. (A) Campo geral da lâmina em 100X. (B) Área demarcada para contagem em 400X.

A eficiência de filtração do proventrículo (concentração média de grãos de pólen no papo em relação ao tempo) entre as colônias foi obtida por análise de regressão (Sit & Poulin-Costello, 1994). Os coeficientes de regressão das curvas foram usados para comparar a eficiência de filtração entre as colônias pela metodologia proposta por Neter & Wasserman (1974). O software SAS INSTITUTE (1989) foi usado nas análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comportamento higiênico, infestação por *Varroa destructor* e ocorrência de doenças de cria em abelhas africanizadas

4.1.1. Comparação entre testes do comportamento higiênico

Os percentuais de remoção da cria de operária perfurada e congelada não diferiram ($F=2,23$; $P>0,05$) como relatado por Gramacho & Gonçalves (1994) e Tenório (1996). Entretanto, esses autores usaram congelamento em freezer, que é considerado mais perturbador para a colônia, visto que o pedaço de favo com crias é extraído da colônia para o freezer e depois retorna para a colônia.

Todos percentuais de remoção da cria foram inferiores a 80%, ou seja, conforme estabelecido por Gramacho & Gonçalves (1994, 1997) nenhuma colônia pôde ser considerada higiênica. Nas colônias 1 e 2 foi realizado somente o primeiro teste de perfuração e congelamento devido à insuficiente área de cria de operária no favo.

A entrada do néctar pode aumentar a taxa de remoção de cria morta ou doente (Momot & Rothenbuhler, 1971; Message, 1979; Message & Gonçalves, 1980), contudo não foi observado interferência da alimentação (xarope) nos resultados. O manejo das colônias revelou uma população pequena de abelhas e baixa quantidade de recursos alimentares nos favos, mesmo tendo sido disponibilizada alimentação durante os testes.

O percentual de abelhas que são geneticamente especializadas para o comportamento higiênico pode influenciar o nível da resposta da colônia (Spivak & Gilliam, 1993), além disso, a redução de estoques de carboidratos pode afetar o polietismo etário, levando as abelhas que realizam as atividades no ninho para o forrageamento (Schulz *et al.*, 1998). Entretanto, nesse estudo, ambos os métodos estavam submetidos às mesmas condições ambientais.

O coeficiente de correlação de Pearson entre o tempo que as abelhas levaram para remover a cria, perfurada e congelada (24 e 48 horas), foi 0,70755 ($P<0,001$), o que isso significa que as colônias removeram a cria na mesma taxa em ambos os métodos. Uma correlação ($r =0,8950$; $P<0,001$) envolvendo os mesmos tempos de remoção de cria de operária perfurada e congelada também foi verificada por Spivak & Downey (1998).

4.1.2. Teste do comportamento higiênico no campo

Os percentuais médios de comportamento higiênico verificados nas colônias examinadas estão descritos na Tabela 1. Uma variação significativa foi observada na população de setenta e sete colônias ($F=8,94$; $P<0,01$) com uma extensão de 0,0 a 100,0%, confirmando o efeito da variabilidade genética entre as colônias de abelhas africanizadas (Message & Gonçalves, 1977). Arechavaleta-Velasco & Guzmán-Novoa (2001) também verificaram uma variação significativa ($F=10,71$; $P<0,001$) entre colônias de *Apis mellifera* no México quanto ao comportamento higiênico, com uma variação de 17,5 a 100,0%.

Mesmo considerando que a composição genotípica de uma colônia afeta a performance do comportamento higiênico pela influência da persistência das abelhas na execução da tarefa, a idade das abelhas desempenhando a tarefa, a eficiência da tarefa desempenhada e também pelo patrulhamento da tarefa entre as abelhas higiênicas (Thompson, 1964; Arathi & Spivak, 2001), o desvio padrão de cada colônia foi, em geral, pequeno (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual do comportamento higiênico (%CH) nas colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) em Minas Gerais entre março e abril de 2006.

Colônia	%CH	Colônia	%CH	Colônia	%CH	Colônia	%CH
1	53,87 ±14,54	24	85,06±14,42	45	72,35±4,73	67	18,20*
2	53,84±36,53	25	87,04±7,76	46	88,54*	68	3,03±0,63
5	20,00±5,43	26	22,15*	47	68,66±38,94	69	13,21±2,67
6	99,07±1,32	27	25,08±1,97	48	99,05±0,01	70	34,77±34,35
8	63,95±10,39	28	91,74±11,67	49	80,44±2,79	71	7,44±1,09
9	37,11±5,32	29	100,00±0,0	50	86,80±18,67	72	48,56±7,30
10	95,2*	30	79,81*	51	28,17±7,95	73	91,35±0,74
11	37,40*	31	96,65±4,73	52	19,76±13,80	74	22,36±13,23
12	34,48±17,95	32	25,26±6,02	53	34,19±1,21	75	26,78±18,94
13	14,01*	33	97,63±0,54	54	26,46±30,68	77	93,15±9,68
14	18,74±9,52	34	96,17±2,80	55	0,00*	78	52,37*
15	5,88±0,76	35	59,27±4,36	57	48,07±37,08	80	46,44*
16	93,30±6,86	36	95,72±1,81	58	96,64±4,76	81	47,37±34,54
17	95,23±3,94	38	75,98±18,11	60	34,91±0,46	82	87,92*
18	88,71±9,23	39	90,89±2,21	61	4,14±0,70	85	79,72*
19	13,56±3,83	40	4,22±3,27	62	98,58±2,00	87	67,56±4,35
20	8,46±0,76	41	16,39±2,02	63	37,18±6,03	88	92,92±7,32
21	36,70±0,47	42	54,14±29,63	64	92,80±19,66	-	-
22	14,22±2,76	43	57,24±27,74	65	43,86*	-	-
23	96,78±4,56	44	16,25±0,80	66	25,52±11,44	-	-

*repetições insuficientes para análise de variância.

Em algumas colônias foi possível realizar somente um teste de comportamento higiênico porque o enxame abandonou o ninho ou não apresentou área de cria na idade recomendada ou o valor de Z foi maior que

10%. A migração é extremamente comum em *Apis mellifera* em países tropicais, em resposta a condições insatisfatórias no ninho ou no meio ambiente (Free, 1980).

Na colônia nº29 registrou-se o percentual máximo de remoção da cria, confirmando que colônias altamente higiênicas apresentam uma taxa de remoção da cria mais consistente entre testes consecutivos (Spivak & Downey, 1998). Enquanto na colônia nº68 foram registrados os menores valores.

O valor estimado das colônias de abelhas africanizadas expressando comportamento higiênico ($CH \geq 80\%$) foi de cerca de 36% (28 de 77 colônias), sendo este um valor intermediário ao verificado por Palácio *et al.* (2000) (43%, 28 de 65 colônias) e por Wilkes & Oldroyd (2002) (20%, 4 em 32 colônias) em abelhas derivadas de *Apis mellifera ligustica*. Enquanto, as demais foram consideradas não-higiênicas, ou seja, mais susceptíveis a doenças. Alguns autores também classificam colônias em níveis intermediários de comportamento higiênico (Spivak & Downey, 1998; Wilkes & Oldroyd, 2002).

É importante que, além de medidas de defesa sanitária estabelecidas legalmente, sejam desenvolvidos programas de seleção, melhoramento e multiplicação de colônias higiênicas, além de outras características economicamente desejáveis. Uma colônia sadia tem mais condições de garantir uma boa produtividade, gerando produtos de maior qualidade e valor comercial, e um menor custo de produção.

4.1.3. Infestação por *Varroa destructor*

Os níveis médios de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria ($3,92 \pm 3,23\%$) e as abelhas adultas ($3,04 \pm 1,43\%$) obtidos, respectivamente, a partir de setenta e seis e de oitenta colônias foram considerados baixos. As variações foram de 0,00 a 13,00% para a cria e 0,00 a 9,15% para as abelhas adultas (Tabela 2).

O grau de infestação por *Varroa destructor* em outras regiões do país foi semelhante ao obtido no presente trabalho. Moretto & Leônidas (2003) encontraram um grau de infestação de $2,33 \pm 0,83\%$ para abelhas adultas e $5,06 \pm 2,47\%$ para cria, enquanto que Pegoraro *et al.* (2000) verificaram $3,53 \pm 2,47\%$ para abelhas adultas.

Tabela 2. Percentual de *Varroa destructor* infestando a cria (%IC) e as abelhas adultas (%IAb) nas colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) em Minas Gerais entre março e abril de 2006.

Colônia	%IC	%IAb	Colônia	%IC	%IAb	Colônia	%IC	%IAb
1	4	2,63	30	5	3,61	60	3	1,14
2	4	3,59	31	1	2,58	61	0	2,78
5	11	2,53	32	4	2,63	62	9	2,71
6	3	3,19	33	1	3,07	63	5	2,02
7	4	3,36	34	6	3,58	64	-	9,15
8	8	2,18	35	9	6,74	65	5	1,21
9	9	5,26	36	1	4,14	66	2	2,72
10	4	2,16	38	1	2,50	67	1	2,02
11	9	3,29	39	2	2,53	68	3	3,05
12	5	2,68	40	0	2,71	69	12	1,90
13	2	4,03	41	3	3,03	70	0	1,34
14	10	2,65	42	9	3,89	71	3	2,75
15	4	3,99	43	4	1,55	72	1	1,83
16	1	4,38	44	3	3,30	73	3	2,73
17	5	1,28	45	3	4,58	74	2	2,60
18	9	3,21	46	2	1,00	75	4	3,16
19	2	2,70	47	3	3,65	77	3	1,59
20	3	5,94	48	4	4,64	78	1	3,00
21	10	3,32	49	1	5,73	79	-	0,00
22	12	3,21	50	1	3,40	80	1	1,84
23	13	1,80	51	0	2,41	81	4	1,06
24	7	4,98	52	1	3,05	82	2	7,03
25	3	3,10	53	4	1,40	84	-	4,01
26	6	3,50	54	1	2,86	85	2	3,93
27	2	2,54	55	7	1,26	87	1	4,53
28	3	2,48	57	4	0,82	88	2	2,42
29	4	1,77	58	-	2,22	-	-	-

O nível de infestação por *Varroa destructor* em abelhas africanizadas vem se mantendo baixo desde sua introdução no Brasil, no final da década de 1970, sem causar prejuízo aparente à atividade apícola e não requerer tratamento químico. Os resultados encontrados também sugerem a manutenção de níveis baixos de infestação.

A infestação por *Varroa destructor* mede, indiretamente, o grau de tolerância a esse ácaro. A partir dos níveis de infestação sobre as abelhas adultas (IAb) e a cria (IC), as colônias foram classificadas como tolerantes a *Varroa destructor* ($IAb < 5\%$; $IC < 5\%$), não-tolerantes ($IAb > 15\%$; $IC > 15\%$) e intermediárias ($5 \leq IAb < 15\%$; $5 \leq IC < 15\%$). Deste modo, dezenove colônias foram qualificadas de intermediárias pelo nível de infestação sobre a cria. Enquanto seis colônias foram classificadas como intermediárias pelo nível de infestação

sobre as abelhas adultas. As demais foram consideradas tolerantes a esse ácaro, considerando tanto os níveis de infestação sobre a cria quanto sobre as abelhas adultas, segundo classificação de Spivak & Reuter (2001b). Nenhuma colônia foi qualificada como não-tolerante em ambos os critérios, revelando a resistência natural de abelhas africanizadas contra *Varroa destructor*.

Alguns mecanismos de resistência a *Varroa destructor* têm sido sugeridos, como o pequeno tamanho das células de cria (Message & Gonçalves, 1995; Piccirillo & De Jong, 2003); comportamento higiênico (Guerra Jr. *et al.*, 2000); comportamento de limpeza do ácaro do próprio corpo e das companheiras (Moretto *et al.*, 1991ab, 1993); tempo reduzido de desenvolvimento da cria de operária (Message, 1986); e taxa de infertilidade dos ácaros (Message, 1986; De Jong *et al.*, 1982; Ritter & De Jong, 1984; Medina & Martins, 1999). Contudo, a resistência a esse ácaro pode ser uma complexa interação de todos desses mecanismos (Message, 1997).

Essa seleção de colônias tolerantes à *Varroa destructor* visa prevenir o uso de acaricidas que poderia selecionar linhagens susceptíveis a esse ácaro, reduzir a resistência natural das abelhas e aumentar o custo de produção. A contaminação de produtos apícolas com resíduos químicos também poderia trazer implicações à saúde humana, desvalorizá-los comercialmente, e inviabilizar a produção de mel orgânico.

A sazonalidade afeta a infestação de colônias pelo ácaro (Moretto *et al.*, 1991b; Pegoraro *et al.*, 2000), uma vez que a redução de disponibilidade de recursos alimentares sempre aumenta o grau de infestação por *Varroa destructor* (Pegoraro *et al.*, 2000). A área de cria e o número de abelhas adultas pequenos pode resultar em taxas de infestação por *Varroa destructor* elevadas, pois o número de ácaros não reduz, proporcionalmente, com a população de abelhas. Além disso, tanto os ácaros que as abelhas adultas conseguem retirar de seu corpo quanto àqueles que migram naturalmente irão completar seu ciclo reprodutivo na cria.

Contudo a infestação por *Varroa destructor* foi considerada baixa, tanto na amostragem da cria quanto das abelhas adultas, apesar do manejo nas colônias revelarem uma quantidade restrita de recursos alimentares, área de cria reduzida e população de abelhas adultas pequena.

4.1.4. Investigação de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em mel

Nenhuma colônia apresentou sinais clínicos de cria pútrida americana e todas as amostras de méis apresentaram resultados negativos quanto à presença de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Isto significa que *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* não está presente nos apiários de origem da setenta colônias investigadas, situados na microrregião de Viçosa, Minas Gerais.

Algumas investigações epidemiológicas têm sido realizadas em apiários dessa região (Carvalho & Message, 2004; Gonçalves, 2004; Castagnino *et al.*, 2006b), porém não existe monitoramento oficial do governo brasileiro da saúde das colônias. Além disso, poucos apicultores têm conhecimento sobre as patologias que afetam as abelhas e a forma de controle.

4.1.5. Relação entre comportamento higiênico, infestação por *Varroa destructor* e resistência às doenças de cria

As colônias inspecionadas não exibiam sinais clínicos de doença de cria, e somente nas colônias nº53 e nº61 verificaram-se cria giz, embora pouco disseminada no ninho. Recentemente essa doença foi registrada na região (Castagnino *et al.*, 2006b). A ocorrência insignificante de doenças de crias na população de colônias estudadas indica a possibilidade de manejo sem o uso de drogas veterinárias.

O percentual de comportamento higiênico não apresentou relação com a taxa de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria ($r=-0,07589$; $P>0,05$) e a taxa de infestação por *Varroa destructor* sobre as abelhas adultas ($r=0,11133$; $P>0,05$). Os níveis de infestação por esse ácaro e o número de células limpas pelas abelhas também não apresentaram correlação significativa ($r=0,18$; $P>0,05$) em Arechavaleta-Velasco & Guzmán-Novoa (2001).

A relevância do comportamento higiênico para conferir tolerância às abelhas melíferas contra *Varroa destructor* não é clara (Arechavaleta-Velasco & Guzmán-Novoa, 2001). As diferenças entre as colônias sugerem que este mecanismo possa contribuir para a tolerância das abelhas, mas seu efeito em abelhas adultas é atribuído especialmente à habilidade das abelhas de removerem esse ácaro de seu próprio corpo e do corpo de suas companheiras (Moretto *et al.*, 1991a, 1993).

A taxa de infestação por *Varroa destructor* nas abelhas adultas não apresentou relação com a taxa de infestação por *Varroa destructor* na cria ($r=0,03986$; $P>0,05$). Isto pode ter sido decorrente das baixas taxas de infestação desse ácaro observadas na cria e abelhas adultas.

Apenas dezenove (6, 10, 16, 25, 28, 29, 31, 33, 36, 39, 46, 48, 50, 58, 73, 77, 85 e 88) das setenta e sete colônias testadas foram selecionadas nesse estudo, considerando o comportamento higiênico ($>80\%$), a taxa de infestação por *Varroa destructor* sobre a cria ($\%IC<5$) e a taxa de infestação por *Varroa destructor* sobre as abelhas adultas ($\%IAb<5$). Um programa de seleção massal deve dispor de elevado número de colônias matrizes para evitar problema de consangüinidade (Gonçalves & Gramacho, 1999), por isto, as colônias desse trabalho foram provenientes de diferentes regiões para evitar parentesco.

Uma vez que a saúde da colônia depende da interação de vários fatores genéticos e ambientais, a seleção de colônias também deve utilizar, futuramente, outros critérios, além de testes que avaliam o comportamento higiênico e os níveis de infestação por ácaro.

Nesse sentido, recomenda-se avaliar também a resistência larval a cria giz (Gilliam *et al.*, 1983; Spivak & Reuter, 1998b) e a cria pútrida americana (Rothenbuhler & Thompson, 1956; Spivak & Reuter, 1998ab; Brødsgaard & Hansen, 2003), a SRA (Ibrain & Spivak, 2006), o “grooming” (Moretto *et al.*, 1991ab, 1993), o nível de resposta à infestação com *Acarapis woodi* (Gary & Page, 1987; Villa & Danka, 2005), e a eficiência de filtração do proventrículo (Sturtevant & Revell, 1953).

De um modo geral, a situação sanitária das colônias pode ser considerada boa, embora não exista um histórico dos dados epidemiológicos da região para uma avaliação comparativa. Com a seleção espera-se contribuir para uma melhoria geral no nível de resistência às doenças e ectoparasitas nas colônias comerciais da microrregião de Viçosa, Minas Gerais.

4.2. Comparação entre tamanho dos pêlos do proventrículo em operárias de *Apis mellifera*

Como pode ser observa na Figura 4, a Micrografia eletrônica de varredura (MEV) dos proventrículos mostrou que os pêlos filiformes são arredondados da base até três quartos (3/4) do seu comprimento. O

comprimento total desses pêlos ($64,85 \pm 24,45 \mu\text{m}$) foi semelhante ao registrado por Peng & Marston (1986) para abelhas italianas ($70 \mu\text{m}$).

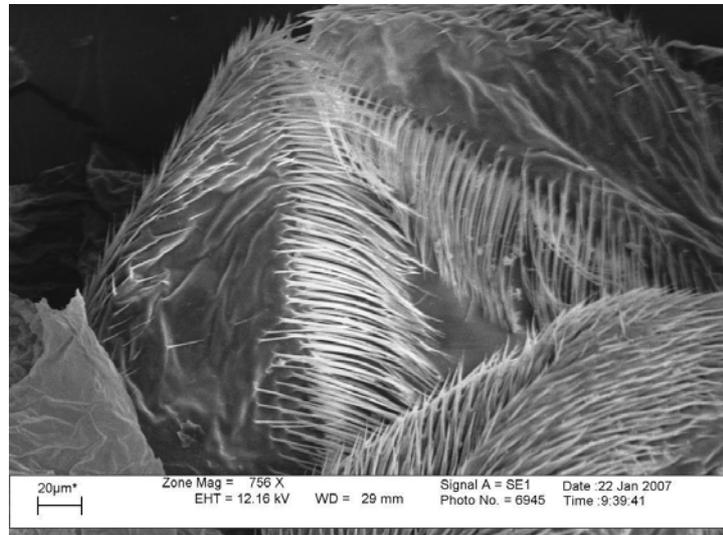


Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura dos pêlos em um lábio do proventrículo de operárias de *Apis mellifera*.

Os pêlos mais curtos apresentaram aproximadamente até um terço ($1/3$) do comprimento dos filiformes e o número era reduzido. A função dos pêlos curtos na superfície externa dos lábios é desconhecida (Peng & Marston, 1986).

Na Tabela 3 pode se observar que o comprimento dos pêlos do proventrículo das operárias diferiu estatisticamente entre as colônias. Essa característica pode ser usada na seleção e melhoramento genético, se for comprovado que o tamanho dos pêlos influencia na eficiência de captura de pequenas partículas em baixa concentração.

O comprimento dos pêlos do proventrículo de *Apis mellifera* foi semelhante entre as castas temporais de suas operárias ($F=0,42$; $P>0,05$). O comprimento dos pêlos não apresentou correlação com a área dos ácidos da glândula hipofaríngea ($r=0,06509$; $P=0,0935$). Por isto, a coleta de abelhas para estudos do tamanho dos pêlos do proventrículo não será influenciada pelo estágio ou atividade que a abelha realiza.

Tabela 3. Comprimento médio e desvio padrão dos pêlos filiformes do proventrículo de operárias de *Apis mellifera*.

Colônia	Pêlos filiforme do proventrículo	
	Comprimento* (μm)	Desvio Padrão (\pm)
1	63,35 bc	14,08
2	59,71 c	8,68
3	60,23 c	10,52
4	69,29 ab	10,89
5	72,45 a	48,35

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (F=64,83; P<0,0001).

O que poderia ser considerado na coleta é o fato das forrageiras apresentarem maior taxa de transferência de pólen do intestino para o reto que as abelhas da área de cria (Bailey, 1952). Isto pode reduzir o risco de infecção da colônia quando entram em contato com alimento contaminado.

Lotmar (1939) verificou que abelhas nutrizas de *Apis mellifera* apresentam intestino maior que as de outras operárias realizando tarefas diferentes. Serrão & Cruz-Landim (1995) verificaram que o diâmetro do bulbo proventricular diferiu entre operárias, rainhas e machos de *Scaptotrigona postica*.

Foi evidenciado diferença no tamanho do bulbo proventricular entre as abelhas durante a dissecação do intestino das abelhas. Esta diferença no tamanho do bulbo proventricular de operárias pode está relacionada ao comportamento de acasalamento poliândrico das rainhas, que resulta em uma grande variância genética entre o tamanho das operárias (Crozier & Page, 1985; Palmer & Oldroyd, 2000; Crozier & Fjerdingsstad, 2001; Tarpy & Page, 2001). Outra hipótese para tal diferença no tamanho da abelha operária adulta esta relacionada ao tamanho das células de cria (Piccirillo & De Jong, 2003). O tamanho das células de cria é determinante para o tamanho da abelha operária adulta (Piccirillo & De Jong, 2003). Isto torna importante a substituição de favos velhos no manejo das colônias para evitar a redução do volume das células devido ao acúmulo de casulos e outros materiais aderentes.

Assim, uma diferença entre colônias na habilidade de filtração de esporos bacterianos pelo proventrículo (Plurad & Hartman, 1965; Sturtevant & Revell, 1953) também pode estar relacionada ao tamanho do bulbo proventricular das operárias e, conseqüentemente, ao tamanho da abelha. Um bulbo proventricular maior, provavelmente, apresentará maior capacidade de remoção das partículas em suspensão.

A concentração de grãos de pólen é reduzida em taxas elevadas nos primeiros minutos, e então se torna menos acentuada quando a concentração de pólen no papo está em nível baixo (Bailey, 1952). Quando o tamanho dos quatros bolos de pólen aumenta além da capacidade de expansão das bolsas, estes se unem e formam um grande bolo; então, os músculos circulares da região proximal das placas basais relaxam para permitir sua passagem para o ventrículo (Peng & Marston, 1986). Assim sendo, um proventrículo maior pode permitir ações mais eficientes de captura e ingestão de partículas e o armazenamento de maior volume de pólen nas quatro bolsas, por conseguinte, uma formação mais rápida do bolo de pólen final e sua liberação no ventrículo.

A variabilidade no tamanho do bulbo (diâmetro e comprimento) pode explicar a diferença na eficiência de filtração do proventrículo entre colônias. Esta característica pode ser utilizada na seleção e melhoramento de abelhas resistentes a doenças com via de infecção pelo canal alimentar.

4.3. Eficiência de filtração do proventrículo em operárias de *Apis mellifera*

A concentração inicial de grãos de pólen de Amaranthaceae no xarope foi de $9,33 \times 10^6$ grãos de pólen/mL. A redução no volume da suspensão (20 μ L) fornecida foi mínima, pois as abelhas estavam praticamente imobilizadas; além disso, a solução de sacarose ingerida é armazenada no papo, onde não ocorre digestão e absorção (Maddrell & Gardiner, 1980).

Um clareamento da cor da suspensão foi observado com o aumento do tempo após a alimentação possivelmente devido à reação do azul de metileno (partículas $< 0,001 \mu\text{m}$) com o tecido celular do papo das abelhas.

Na Tabela 4 pode se observar que os coeficientes de regressão (b_1) mostraram diferença estatística ($P < 0,0001$) entre as equações linearizadas. A função exponencial $y = a e^{bx}$ foi aplicada aos dados observados, linearizando-se a função para $\ln(y) = b_0 + b_{ix}$, onde $a = e^{b_0}$ e $b = b_1$, onde $y =$ concentração de pólen em qualquer tempo t , $a =$ concentração inicial de pólen, $e = 2,71828$ e $b = T$, onde T é o tempo constante (Fig. 5).

Tabela 4. Valores do intercepto (a), coeficiente de regressão (b_1) e coeficiente de determinação (r^2) entre a concentração de grãos de pólen no papo de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) e o tempo após a alimentação líquida.

Colônia	a	$b_1^{(1)}$	r^2
1	16,15308	-0,1093 a	0,79
2	16,00071	-0,0703 b	0,72
3	15,87289	-0,0758 ab	0,56
4	16,17630	-0,0558 c	0,71

⁽¹⁾Valores com a mesma letra não são diferentes estatisticamente ($p < 0,0001$, teste de Tukey).

O número de grãos de pólen nas colônias nº1 e nº3 foram reduzidos em um taxa maior que as demais ao final de 30 minutos. Isto mostra que essas colônias podem ter uma maior proteção contra doenças de cria.

Bailey (1952), fornecendo uma suspensão de pólen de concentração com a mesma base decimal ($1,45 \times 10^6$ grãos de pólen/mL) e mesmo volume (20 μ L) utilizados nessa pesquisa obteve uma curva e coeficiente de regressão ($a=0,10889$) parecidos com os da colônia nº1. O mesmo autor afirmou que alterações no volume da alimentação oferecida, no tamanho das partículas em suspensão e na concentração afetaram a taxa e a eficiência de filtração do proventrículo. Assim, a homogeneidade das condições experimentais assegurou a avaliação precisa das colônias neste estudo.

A colônia nº3 teve uma taxa de redução inicial superior à da colônia nº1, porém, no final sua eficiência real de filtração (redução de grãos de pólen na suspensão) foi menor (Fig. 5). Todas as colônias apresentaram redução nos grãos de pólen da suspensão durante 30 minutos (média=1312031 grãos de pólen/mL), mas o número final de partículas ainda seria considerado elevado se fossem partículas de um agente patogênico, visto que a dose letal oral (DL_{50}) de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* é igual a 8,49 esporos (Brødsgaard *et al.*, 1998).

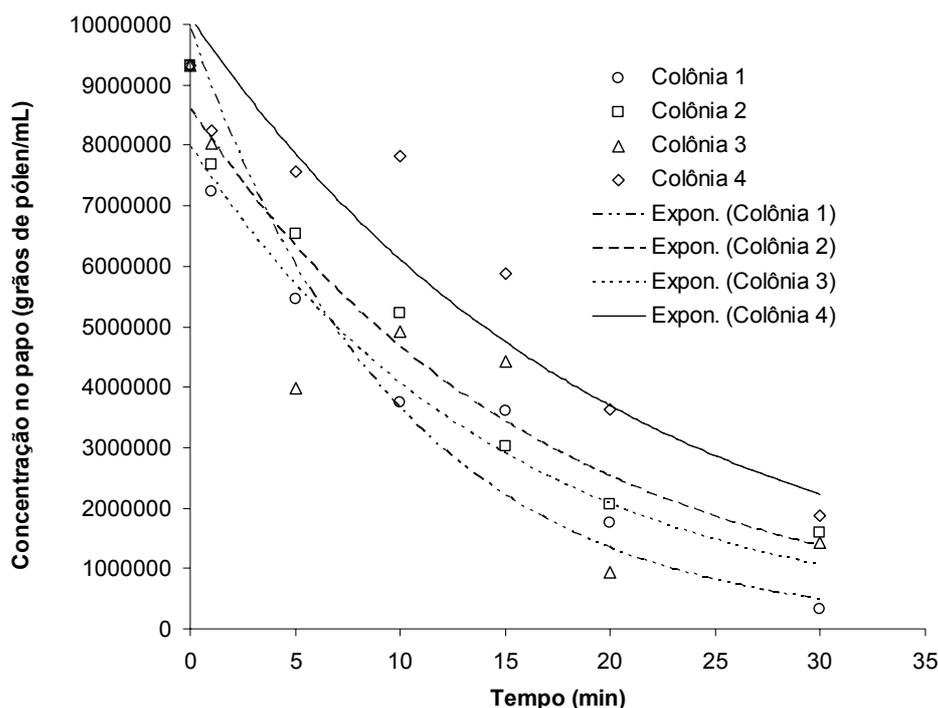


Figura 5. Relação entre a concentração de grãos de pólen no papo de operárias de *Apis mellifera* e o tempo após a alimentação líquida (colônia nº 1 $y = 10332760,12 * e^{-0,1093x}$, colônia nº 2 $y = 8892421,90 * e^{-0,0703x}$, colônia nº 3 $y = 7825435,91 * e^{-0,0758x}$ e colônia nº 4 $y = 10599315,70 * e^{-0,0558x}$).

Woodrow & Holst (1942) verificaram que as abelhas removeram esporos de *Aspergillus* na mesma extensão que grãos de pólen. No entanto, Bailey (1952) observou que a concentração inicial de 2×10^6 esporos de *Nosema apis* mostrou coeficiente de regressão ($a=0,14678$) superior ao alcançado com grãos de pólen ($a=0,10889$) com o mesmo volume de suspensão a qual as abelhas eram alimentadas ($20 \mu\text{L}$), sugerindo que as partículas pequenas eram filtradas mais eficientemente que aquelas maiores na mesma concentração.

Apesar do tamanho do grão pólen utilizado no ensaio ($15 \mu\text{m}$) (Barth, 1989) ser maior que os esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* ($1,1 \times 0,5 \mu\text{m}$) e de *Nosema apis* ($4 \times 2,25 \mu\text{m}$), a resposta comportamental deve representar a capacidade real de filtração de pólen, pois as condições experimentais foram uniformes para as abelhas de todas as colônias.

O conteúdo de esporos de *Aspergillus* suspensos em xarope foi reduzido em aproximadamente 70 a 85% após dois a quatro dias, em estudo realizado por Woodrow & Holst (1942). Thompson & Rothenbuhler (1957) verificaram que colônias de abelhas alimentadas com milhões de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em xarope durante vários dias mostraram uma redução no número de esporos do alimento armazenado no favo. Além da redução na

quantidade de inoculo na colônia pela ação das abelhas higiênicas que removem as larvas doentes e mortas, o mecanismo de filtração do proventrículo pode reduzir, em parte, o risco de infecção das larvas com alimento contaminado com agentes patogênicos.

Outros mecanismos também podem atuar integrados à ação do proventrículo das operárias para conferir maior proteção à cria contra doenças. Por exemplo, a proteção diferencial das larvas por abelhas adultas contra a cria pútrida americana pode ser atribuída a um fator antibacteriano presente no alimento larval secretado por glândulas das abelhas nutrizas (Thompson & Rothenbuler, 1957). O extrato do conteúdo intestinal de abelhas adultas de colônias infectadas com número elevado de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, inibiram completamente o crescimento do estágio vegetativo e a germinação de esporos desse patógeno (Riessberger-Gallé *et al.*, 2001). A presença de pólen influenciou a mortalidade de larvas infectadas com esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Rinderer *et al.*, 1974). O pólen também pode conter microrganismos antagonistas ao *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Brødsgaard *et al.*, 1998). Extratos de pólen de *Zea mays* coletados nas corbículas e no “pão da abelha” inibiram o crescimento de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em altas concentrações, porém esse tipo pólen coletado diretamente das flores apresentou efeito inibidor do crescimento, porém mais fraco (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001).

O teste de eficiência de filtração do proventrículo poderia ser incluído em programas de seleção e melhoramento de colônias resistentes às doenças de cria. A realização de testes em campo pode proporcionar maiores informações sobre esse mecanismo, sendo que as pesquisas com o agente patogênico devem estar limitadas a locais onde estejam estabelecidos.

5. CONCLUSÕES

- Tanto o método de perfuração quanto o de congelamento da cria, foi considerado eficiente para avaliar o comportamento higiênico.
- A frequência de colônias higiênicas na população foi baixa.
- Os níveis de infestação por *Varroa destructor* diagnosticados tanto na cria quanto nas abelhas adultas foram baixos na maioria das colônias.
- O *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* não foi detectado no mel das colônias.
- O comportamento higiênico, o nível de *Varroa destructor* infestando a cria e as abelhas adultas, a presença de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no mel e a ocorrência de doença de cria foram utilizados como critérios para a seleção de colônias tolerantes a determinadas patologias.
- O estudo da relação entre o tamanho do bulbo e a eficiência de filtração de partículas do proventrículo pode esclarecer melhor este mecanismo de resistência contra doenças nas colônias de *Apis mellifera*.
- A metodologia para avaliação da eficiência de filtração do proventrículo de operárias pode ser aplicada na seleção de colônias resistentes às doenças de crias.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALIPPI, A.; RINGUELETAND, J.; CERIMELE, E. Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease. **Journal of Herbs, Spices and Medical Plants**, v.4, p.9-16, 1996.
- ALLEN, M.; BALL, B. The incidence and world distribution of the honey bee viruses. **Bee World**, v.77, p.41-162, 1996.
- ARATHI, H. S.; SPIVAK, M. Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behaviour in the honeybee, *Apis mellifera* L. **Animal Behaviour**, v.2, p.57-66, 2001.
- ARECHA VALETA-VELASCO, M. E.; GUZMÁN-NOVOA, E. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Apidologie**, v.32, p.157-174, 2001.
- BACHANOVA, K.; KLAUDINY, J.; KOPERNICKY, J.; SIMUTH, J. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamida gel. **Apidologie**, v.33, p.259-269, 2002.
- BAILEY, L. The action of the proventriculus of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. **The Journal of Experimental Biology**, v.29, p.310-326, 1952.
- BALL, B. V.; ALLEN, M. F. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. **Annals of Applied Biology**, v.113, p.237-244. 1988.
- BAILEY, L.; BALL, B. V. **Honey Bee Pathology**. London: Academic Press, 1991. 124 p.
- BAILEY, L.; BALL, B. V.; PERRY, J. N. The prevalence of viruses of honey bee in Britain. **Annals of Applied Biology**, v.97, p.109-118, 1981.
- BAILEY, L.; BALL, B. V.; PERRY, J. N. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. **Annals of Applied Biology**, v.103, p.13-20, 1983.
- BAMBRICK, J. F. Resistance to American foulbrood in honey bees V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. **Journal of Insect Pathology**, v.6, p.284-304, 1964.
- BAMBRICK, J. F.; ROTHENBUHLER, W. C. Resistance to American foulbrood in honey bees. IV. The relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistance and in a susceptible line. **Journal of Insect Pathology**, v.3, p.381-390, 1961.
- BARTH, O. M. **O pólem no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989. 150p. il.
- BÍLIKOVÁ, K.; WU, G.; SIMUTH, J. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. **Apidologie**, v.32, p.275-283, 2001.

- BOECKING, O.; SPIVAK, M. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie**, v.30, p.141-158, 1999.
- BOECKING, O.; W. DRESCHER. Response of *Apis mellifera* L. colonies infested with *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie** 22: 237-241, 1991.
- BOECKING, O.; W. DRESCHER. The removal responses of *Apis mellifera* L. colonies to brood in wax and plastic cell after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud. and to freeze-killed brood. **Experimental and Applied Acarology**, v.16, p.321-329, 1992.
- BOECKING, O; RITTER, W. Grooming and removal behaviour of *Apis mellifera intermissa* in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. **Journal of Apicultural Research**, v.3, p.127-134, 1993.
- BOGDANOV, S. Antibacterial substances in honey. **Swiss Bee Research Center**, 1997. 10p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n.º62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Anexo, Capítulo XIX Pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p.14-51.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota técnica. DAS Nº 52/2006**. Ocorrência de “cria pútrida americana” no município de Quatro Barras, Estado do Paraná – Brasil. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/2CE4B18D25BB1514E040A8C075021ACA>>. Acesso em: 10 dez. 2006.
- BRØDSGAARD, C. J.; HANSEN, H. Tolerance mechanisms against American foulbrood in honey bee larvae and colonies. **Apiacta**, v.38, p.114-124, 2003.
- BRØDSGAARD, C. J.; RITTER, W.; HANSEN, H. Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. **Apidologie**, v.29, p.569-578, 1998.
- BRØDSGAARD, C. J.; RITTER, W.; HANSEN, H.; BRØDSGAARD, H. F. Interactions among *Varroa jacobsoni* mites, acute paralysis virus, and *Paenibacillus larvae larvae* and their influence on mortality of larval honeybees *in vitro*. **Apidologie**, v.31, p.543-554. 2000.
- CARVALHO, A. C. P. **Pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* como agente causador da cria ensacada brasileira em *Apis mellifera* L.** 1998. 60p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- CARVALHO, A. C. P.; CAMPO, L. A. O.; CARVALHO, G. A. Pólen tóxico como causa da Cria Ensacada Brasileira. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 3., 1998, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 1998. p.277.
- CARVALHO, A. C. P.; MESSAGE, D. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoidae) which causes sacbrood-like symptoms. **Apidologie**, v.35, p.89-90, 2004.
- CASTAGNINO, G. L. B.; FUNARI, S. R. da C.; ARBOITTE, E. B. M. Z.; WEBWER, M. N. Doença Cria giz *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir em abelhas *Apis mellifera* L. na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.36, p.1909-1911, 2006a.
- CASTAGNINO, G. L. B.; MESSAGE, D.; BARRETO, R. W. Primeiro relato da doença "cria-giz" em abelhas *Apis mellifera* no Estado de Minas Gerais. **Revista Ceres**, v.53, p.234-236, 2006b.
- CASTEELS, P.; AMPE, C. H.; JACOBS, F., VAECK, M.; TEMPST, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. **EMBO Journal**, v.8, p.2387-2391. 1989.
- CASTEELS, P.; AMPE, C. H.; RIVIERE, L.; VAN DAMME, J.; ELICONE, C. H.; FLEMING, M.; JACOBS, F.; TEMPST, P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). **European Journal of Biochemistry**, v.187, p.381-386, 1990.
- CASTEELS P.; TEMPEST P. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.199, p.339-345, 1994.
- CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Toxicidade de *Stryphnodendron adstringens* e *Dimorphandra mollis* (barbatimão) em operárias de *Apis mellifera*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 4., 1998, Bahia. **Anais...** Bahia, 1998, p.183.
- CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Plantas tóxicas para as abelhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.547-551, 2005.
- CISDASC. Instrução de serviço nº11/2006. **GEDSA**. Florianópolis, 2006. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/html/legislacao/Instrucao_Servi_co_Cria_P_Americana_1-12.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2007.
- COLIN, M. E. Factors affecting disease outbreaks and seriousness. In: Colin, M. E.; Ball, B. V.; Kilani, M. (Eds.). **Bee disease diagnosis**. Zaragoza (ESP): CIHEAM Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, 1999. p.25-29.

- CORRÊA-MARQUES, M. H.; ISSA, M. R. C.; DE JONG, D. Classification and qualification of damage *Varroa Jacobsoni* found in drebis of Africanized honey bee colonies as criteria for selection? **American Bee Journal**, v.140, p.820-824, 2000.
- COSENZA, G. W.; SILVA, T. Comparação entre a capacidade de limpeza de favos de abelha africana, da abelha caucasiana e de suas híbridas. **Ciência e Cultura**, v.24, p.1153-1158, 1972.
- COSTA, P. S. C. **Cria Pútrida Americana: comparação de técnicas de detecção de esporos em mel e avaliação em amostras nacionais e importadas**. 1995. 74p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P-L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; VANENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONS, J. F.; EGHOLM, M.; PETTIS, J. S.; LIPKIN, W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v.318, p.283-287, 2007.
- CRAILSHEIM, K.; RIESSBERGER-GALLÉ, U. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. **Apidologie** 32: 91-103, 2001.
- CROZIER, R. H.; PAGE, R. E., JR. On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.18, p.105-115, 1985.
- CROZIER, R. H.; FJERDINGSTAD, E. J. Polyandry in social Hymenoptera: disunity in diversity? **Annales Zoologici Fennici**, v.38, p.267-285. 2001.
- DANKA, R. G.; VILLA, J. D. Evidence of autogrooming as a mechanism of honey bee resistance to tracheal mite infestation. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p.39-46, 1998.
- DANKA, R. G.; VILLA, J.D. Autogrooming by resistant honey bees challenged with individual tracheal mites. **Apidologie**, v.34, p.591-596, 2003.
- DE JONG, D.; GONÇALVES, L. S. The *Varroa* problem in Brazil. **American Bee Journal**, v.127, p.186-189, 1981.
- DE JONG, D.; MORSE, R. A.; EICKWORT, G. C. Mites pests of honey bees. **Annual Review of Entomology**, v.27, p.229-252, 1982.
- DECANNI, L. I.; COLLINS, A. M.; EVANS, J. D. Variation and heritability in immune gene expression by diseased honeybees. **Journal of Heredity**, v.98, p.195-201, 2007.
- DUSTMANN, J. H. Natural defense mechanisms of a honey bee colony against diseases and parasites. **American Bee Journal**, v.133, p.431-434, 1993.

- EVANS, J. D. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.105-111, 2004.
- EVANS, J. D.; ARONSTEIN, K.; CHEN, Y. P.; HETRU, C; IMLER, J-L; JIANG, H.; KANOST, M.; THOMPSON, G.; ZHOU, Z.; HULTMARK, D. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.15, p.645-656, 2006.
- EVANS, J. D.; PETTIS, J. S. Colony-level effects of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. **Evolution**, v.59, p.2270-2274, 2005.
- FELDLAUFER, M. F.; KNOX, D. A.; LUSBY, W. R.; SHIMANUKI, H. Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. **Apidologie**, v.24, p.95-99, 1993.
- FERREIRA, D. F. **Estatística Básica**. Lavras: Editora UFLA, 2005. 664p il.
- FLECHTMANN, C. H. W.; AMARAL, E.; SANTOS, F. D. Ocorrência da acariose no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 4., Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1976.
- FONTANA, R.; MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; KONNO, K.; CÉSAR, L. M. M.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Peptides**, v.25, p.919-928, 2004.
- FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo: EPU - EDUSP (coleção Temas de Biologia v.13), 1980.
- GARY, N. E; PAGE, R. E. Jr. Phenotypic variation in susceptibility of honeybees, *Apis mellifera*, to infestation by tracheal mites, *Acarapis woodi*. **Experimental and Applied Acarology**, v.3, p.291-305, 1987.
- GILLIAM, M.; TABER, S.; RICHARDSON, G. V. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. **Apidologie**, v.14, p.29-39, 1983.
- GILLIAM, M.; TABER, S.; LORENZ, B. J.; PREST, D. B. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.314-325, 1988.
- GLIŃSKI, Z.; JAROSZ, J. Mechanical and biochemical defenses of honey bees. **Bee World**, v.76, p.110-118, 1995a.
- GLIŃSKI, Z.; JAROSZ, J. Cellular and humoral defenses in honey bees. **Bee World**, v.76, p.195-205, 1995b.
- GLIŃSKI, Z.; JAROSZ, J. Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. **Apiacta**, v.36, p.12-24, 2001.

- GONÇALVES, J. C. **Avaliação de esporos *Paenibacillus larvae subsp. larvae* em mel de apiários do estado do Piauí e de métodos de detecção.** 2004. 39p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D.; NOGUEIRA, R. H. Infestation of feral honey bee colonies in Brazil by *Varroa jacobsoni*. **American Bee Journal**, v.122, p.249-251, 1982.
- GONÇALVES, L. S.; KERR, W. E. Genética, Seleção e Melhoramento. 1. Noções sobre genética e melhoramento em abelhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1., Florianópolis, 1970. **Anais...** Florianópolis, 1970. p.8-36.
- GONÇALVES, L. S.; GRAMACHO, K. P. Seleção de abelhas para resistência a doenças de crias através do comportamento higiênico. **Mensagem Doce**, v.52, p.2-7, 1999.
- GRAMACHO, K. P. **Estudo do comportamento higiênico em *Apis mellifera* como subsídio a programas de seleção e melhoramento genético em abelhas.** 1995. 108p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GRAMACHO, K. P. **Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas *Apis mellifera*.** 1999. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: CONGRESSO LATINOIBEROAMERICANO DE APICULTURA, 4., 1994. **Anais...** Córdoba, Argentina, 1994. p.45.
- GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. A comparative study of hygienic behavior in several honey bee races. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 20., **Proceedings...** Firenzy, Italy, 1996. p.445
- GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Comportamento higiênico em *Apis mellifera* e novas perspectivas sobre o controle da varroatose. **Mensagem Doce**, v.41, p.4-9, 1997.
- GUERRA JR, J. C. V.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D. 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**, v.23, p.89-92, 2000.
- GUIMARÃES, N. P.; GONÇALVES, A. H. C. Ocorrência e tratamento de cria pútrida européia (EFB) e nosemose no município de Baependi (MG). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 2., 1977, Curitiba. **Anais...** Gonçalves, L. S. (Ed.). Curitiba, 1977. p.205-206.

- HANSEN, H.; BRØDSGAARD, C. J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v.85, p.5-23, 1999.
- HANSEN, H.; RASMUSSEN, B. The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus larvae*. **Danish Journal of Plant and Soil Science**, v.90, p.81-86, 1986.
- HARBO, J. R.; HARRIS, J. W. Selecting honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. **Apidologie**, v.30, p.183-196, 1999.
- HOAGE, T. R.; ROTHENBUHLER, W. C. Larval honey bee response to various doses of *Bacillus larvae* spores. **Journal of Economic Entomology**, v.59, p.42-44, 1966.
- HORNITZKY, M. A. Z. The spread of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* infection in an apiary. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p.261-265, 1998.
- IBRAHIM, A.; SPIVAK, M. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. **Apidologie**, v.37, p.31-40, 2006.
- INVERNIZZI, C. Resistencia a la enfermedad de cría yesificada por colonias de *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higiénico (Hymenoptera, Apidae). Iheringia, **Série Zoologia**, v.91, p.109-114, 2001.
- KHALIL, M. I.; MOTALLIB, M. D. A.; ANISUZZAMAN, A. S. M.; SATHI, Z. S.; HYE, M. A.; SHAHJAHAN, M. Antibacterial activities of different brands of unifloral honey available at the northern region of Bangladesh. **The Sciences**, v.1, p.389-392, 2001.
- KLEE, J.; BESANA, A.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; NANETTI, A.; TAM, D.; CHINH, T.; PUERTA, F.; RUZ, J.; KRYGER, P.; MESSAGE, D.; HATJINA, F.; KORPELA, S.; FRIES, I.; PAXTON, R. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.96, p.1-10, 2007.
- LAPIDGE, K. L.; OLDROYD, B. P.; SPIVAK, M. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. **Naaturwissenschaften**, v.89, p.565-568, 2002.
- LEWIS, L. F.; ROTHENBUHLER, W. C. Resistance to american foulbrood in honey bees: III. Differential survival of the two kinds of larvae from two drone mating. **Journal of Insect Pathology**, v.3, p.197-215, 1961.
- LOPES, M. T. do R.; GONÇALVES, J. C.; MESSAGE, D.; PEREIRA, F. de M.; OLIVEIRA, L. DE A.; SILVA, A. F. da; Doenças e inimigos naturais das abelhas. Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, 2004. 26p. (Embrapa Meio-Norte. Documentos; 103)

- LOTMAR, R. Der Eiweis-soffwechsel im Bienenvolk (*Apis mellifera*) Während der Überwinterung. **Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz**, Bern, v.53, p.34-70, 1939.
- MADDRELL, S. H. P., GARDINER, B. O. C. The permeability of the cuticular lining of the insect alimentary canal. **The Journal of Experimental Biology**, v.85, p.227-237, 1980.
- MALLON, E. B.; BROCKMANN, A.; HEMPEL-SCHMID, P. Immune response inhibits associative learning in insects. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.270, p.2471-2473, 2003.
- MEDINA, L. M.; MARTINS, S. J. A comparative study of *Varroa jacobsoni* reproduction in worker cells of honey bee (*Apis mellifera*) in England and Africanized bees in Yucatan, México. **Experimental and Applied Acarology**, v.23, p.659-667, 1999.
- MELATHOPOULOS, A. P.; WINSTON, M. L.; WHITTINGTON, R.; SMITH, T.; LINDBERG, C.; MUKAI, A.; MOORE, M. Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honeybees (Hymenoptera: Apidae), their mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. **Journal of Economic Entomology**, v.93, p.199-209, 2000.
- MESSAGE, D. **Efeito de condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas *Apis mellifera***. 1979, 136p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MESSAGE, D. **Aspectos reprodutivos do ácaro *Varroa jacobsoni* e seus efeitos em colônias de abelhas africanizadas**. 1986 146p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MESSAGE, D. Management and disease problems of africanized bees in Brazil. **The Central Association of Bee-Keepers**, 1997. 15p.
- MESSAGE, D. Colméias vazias. **Ciência Hoje**, v.241, p.50-5, 2007.
- MESSAGE, D.; GONÇALVES, L. S. Estudo da resistência comportamental à Cria pútrida européia em *Apis mellifera adansonii* (africanizadas). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 4., Curitiba, **Anais...** Curitiba INCRA/FAEP, 1976. p.185-195.
- MESSAGE, D.; GONÇALVES, L. S. Efeito das condições climáticas e da colônia no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 5.; CONGRESSO LATINO-

- IBERO-AMERICANO DE APICULTURA, 3., Viçosa, 1980. **Anais...** Viçosa, Editora Imprensa Universitária da UFV. 1980. p.140-141.
- MESSAGE, D.; GONÇALVES, L. S. Effect of the size of worker brood cells of Africanized honey bees on infestation and reproduction of the ectoparasite mite *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie**, v.26, p.381-386, 1995.
- MILNE, C. P. J. Estimates of the heritabilities of and genetic correlation between two components of honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behaviour: uncapping and removing. **Annals of the Entomological Society of America**, v.78, p.841-844, 1985.
- MOLAN, P. The antimicrobial activity of honey. 1.The nature of the antibacterial activity. **Bee World**, v.73, p.5-28, 1992.
- MOMOT, J. P.; ROTHENBUHLER, W. C. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. **Journal of Apicultural Research**, v.10, p.11-21, 1971.
- MORETTO, G. **Estudos de algumas variáveis relacionadas a um mecanismo de defesa de operárias de *Apis mellifera* à Varroatose e à taxa de reprodução do ácaro *Varroa jacobsoni***. 1993. 115p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MORETTO, G.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D. Africanized bee are more efficient at removing *Varroa jacobsoni* – preliminary data. **American Bee Journal**, v.131, p.434, 1991a.
- MORETTO G, GONÇALVES, L. S; DE JONG, D. Heritability Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. **Revista Brasileira de Genética**, v.16, p.71-77, 1993.
- MORETTO G, GONÇALVES, L. S; DE JONG, D.; BICHUETTE, M. Z. The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. in infestations in Brazil. **Apidologie**, v.22, p.197-203, 1991b.
- MORETTO, G.; LEÔNIDAS, J. de M. Infestation and distribution of the mites *Varroa destructor* in colonies of africanized bees. **Brazilian Journal of Biology**, v.63, p.83-86, 2003.
- MORETTO, G.; PILATTI, A.; DE JONG, D.; GONÇALVES, L. S.; CASSINI, F. Reduction of *Varroa jacobsoni* in the State of Santa Catarina, in Southern of Brazil. **American Bee Journal**, v.135, p.498-500, 1995.
- MORITZ, R. F. A. A reevaluation of the two-locus model for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). **The Journal of Heredity**, v.79, p.257-262, 1988.
- MORSE, R. A.; GONÇALVES, L. S. Varroa disease, athreat to world beekeeping. **Gleanings in Bee Culture**, v.107, p.179-181, 1979.

- NARAYANAN, K. Insect defense: its impact on microbial control of insect pests. **Current Science**, v.86, p.800-814, 2004.
- NASCIMENTO, C. B. Pesquisa de endo e ecto-parasitas de *Apis mellifera*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1., 1970, Florianópolis. **Anais...** Wiese, H. (Ed.). Florianópolis, 1970. p.199-207
- NASCIMENTO, C. B.; MELLO, R. P. de; SANTOS, M. W.; NASCIMENTO, R. V. do; SOUZA, D. J. Ocorrência de acariose em *Apis mellifera*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.6, p.77-60, 1971.
- NETER, J.; WASSERMAN, W. **Applied linear statistical models**. Richard D. Irwin, Homewood, Illinois, 1974. 842p.
- NEWTON, D. C.; OSTASIEWSKI JR., N. J. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal**, v.126, p.278-281, 1986.
- NZEAKO, B. C.; HAMDY, J. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. **Medical Sciences**, v.2, p.75-79, 2000.
- PAGE, R. E.; GUZMÁN-NOVOA, E. G. The genetic basis of disease resistance. p. 471-491. In: Morse, R. A. (Ed.). **Honey bee pests, predators, and disease**. Ithaca and London, Comstock Publ. Ass., 1997.
- PALACIO, A. M.; BEDASCARRASBURE, E. L. Honey bee hygienic behavior and its relation to brood diseases. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF APIMONDIA, 37., Durban. **Proceedings...**, Durban, South Africa, 2001. v.CD.
- PALACIO, M. A.; FIGIN, I. E. E.; RUFFINENGO, S. R.; RODRIGUEZ, E. M.; DEL HOYO, M. L.; BEDASCARRASBURE, E. L. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. **Apidologie**, v.31, p.471-478, 2000.
- PALMER, K. A.; OLDROYD, B. P. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. **Apidologie**, v.31, p.235-248, 2000.
- PALMER, K. A.; OLDROYD, B. P. Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. **Naturwissenschaften**, v.90, p.265-268, 2003.
- PARK, O. W.; PELLET, F.; PADDOCK, F. B. Disease resistance and American foulbrood. **American Bee Journal**, v.77, p.20-25, 1937.
- PEGORARO, A.; MARQUES, E. M.; NETO, A. C.; COSTA, E. C. Infestação natural de *Varroa jacobsoni* em *Apis mellifera scutellata* (Hymenoptera: Apidae). **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.89-93, 2000.
- PENG, Y. S.; FANG, Y.; XU, S.; GE, L.; NASR, M. E. Response of foster Asian honey

- bee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.49, p.25-264, 1987.
- PENG, Y. S.; MARSTON, J. M. Filtering mechanism of the honey bee proventriculus. **Physiological Entomology**, v.11, p.433-439, 1986.
- PETTIS, J. S.; PANKIW, T. Grooming behavior by *Apis mellifera* L. in the presence of *Acarapis woodi* (Rennie) (Acari: Tarsonemidae). **Apidologie**, v.29, p.223-235, 1998.
- PICCIRILLO, G. A.; DE JONG, D. 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**, v.2, p.36-42, 2003.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14 ed. São Paulo: Livraria Nobel, 2000. 477p.
- PLURAD, S. B.; HARTMAN, P. A. The fate of bacterial spores ingested by adult honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.7, p.449-454, 1965.
- POHORECKA K. Effect of standardized plant herb extracts on general condition of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.48, p.415-419, 2004.
- PORRINE, C.; SABATINI, G. A.; GIROTTI S.; GHINI, S.; MEDRZYCKY, P. ; GRILLENZONI, F.; BORTOLOTTI, L.; GATTAVECCHIA, E.; CELLI, G. Honey bee and bee products as monitors of the environmental contaminations. **Apiacta**, v.38, p.63-70, 2003.
- QIN, X.; EVANS, J. D.; ARONSTEIN; K. A.; MURRAY, K. D.; WEINSTOCK, G. M. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. **Insect Molecular Biology**, v.15, p.715-718, 2006.
- RIESSBERGER-GALLÉ, U.; VON DER OHE, W.; CRAILSHEIM, K. Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the causative agent of the American foulbrood. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.77, p.231-236, 2001.
- RINDERER, T. E.; ROTHENBUHLER, W. C.; GOCHNAUE, T. A. Influence of pollen on susceptibility of honeybee larvae to *Bacillus-larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.23, p.347-350, 1974.
- RITTER, W.; DE JONG, D. Reproduction of *Varroa jacobsoni* Out in Europe, the Middle East and tropical South America. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v.98, p.55-57, 1984.
- ROCHA, H. C.; BAGAGLE, E.; FUNARI, S. R. C. Identificação do fungo *Ascosphaera apis* em colônias de abelhas *Apis mellifera* L. no Estado de São Paulo-SP. In:

- CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12., Salvador: CBA/FAABA, 1998. **Anais...**, 1998. p.247-248.
- ROSE, R. I.; BRIGGS, J. D. Resistance to American foulbrood in honeybees. IX. Effects of honeybee larval food on the growth and viability of *Bacillus larvae*, **Journal of Invertebrate Pathology**, v.13, p.74-80, 1969.
- ROSENKRANZ, P.; TEWARSON, N. C.; SINGH, A.; ENGELS, W. Differential hygienic behaviour towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to the mites. **Journal of Apicultural Research**, v.32, p.89-03, 1993.
- ROTHENBUHLER, W. C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. **Animal Behaviour**, v.5, p.578-584, 1964a.
- ROTHENBUHLER, W. C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killer brood. **American Zoology**, v.4, p.111-123, 1964b.
- ROTHENBUHLER, W. C.; THOMPSON, V. C. Resistance to American foulbrood in honey bees: I. Differential survival of larvae of different genetic lines. **Journal of Economic Entomology**, v.49, p.470-475, 1956.
- RUTTNER, F.; HÄNEL, H. Active defense against Varroa mites in a Carniolan strain of honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). **Apidologie**, v.23, p.173-187, 1992.
- SAS INSTITUTE Inc. **SAS/STAT: user's guide**, version 6, 4th edition, v.1, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989. 943p.
- SATTLER, A.; DISCONZI, M. S.; DUARTE, V.; JOSÉ, R. P. SILVEIRA. Ocorrência de cria giz (*Ascosphaera apis*) em apiários no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12., Salvador. **Anais...** Salvador: CBA, 1998. p.257.
- SCHUCH, D. M. T.; MADDEN, R. H.; SATTLER, A. An improved method for the detection and presumptive identification de *Paenibacillus larvae* spores in honey. **Journal of Agricultural Research**, v.40, p.59-64, 2001.
- SCHUCH, D. M. T.; TOCHETTO, L. G.; SATTLER, A. Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.441-444, 2003.
- SCHULZ, D. J.; HUANG, Z-Y.; ROBINSON, G. E. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.42, p.295-303, 1998.
- SEELEY, T. D. **Honeybee ecology**. A study of adaptation in social life. Princeton University Press, 1985.

- SELÇUK, H.; NEVIN, K. Investigation of antimicrobial effect of honey collected from various regions of Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.5, p.325-328, 2002.
- SERRÃO, J. E. A comparative study of the proventricular structure in corbiculate Apidae (Hymenoptera, Apidae). *Mícron*, v.32, p.379-386, 2001.
- SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. da. Comparative size and histology of the proventriculus and midgut among the female castes and males of the *Scaptotrigona postica* Latreille, 1804 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Biociências*, v.3, p.85-94, 1995.
- SILVA, R. M. B. A presença de *Acarapis woodi* no Vale do Paraíba, São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 4. Curitiba. *Annais...* Curitiba, 1976.
- SIT, U.; POULIN-COSTELLO, M. **Catalogue of curves for curve fitting**. Victoria: Forest Science Research Branch, 1994. 110p. (Biometrics information handbook, 4)
- SPIVAK, M. Hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, v.27, p.245-260, 1996.
- SPIVAK, M.; DOWNEY, D. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, v.91, p.64-70, 1998.
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M. Facultative expression of hygienic behaviour in honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research*, v.32, p.145-157, 1993.
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa mites. Part I: Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. *Bee World*, v.79, p.124-134, 1998a.
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part II: Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee World*, v.79, p.169-186, 1998b.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Honey bee hygienic behavior. *American Bee Journal*, v.138, p.283-286, 1998a.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie*, v.29, p.285-296, 1998b.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. *Varroa jacobsoni* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology*, v.94, p.326-31, 2001a.

- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera*, bred for hygienic behavior. **Apidologie**, v.32, p.555-565, 2001b.
- STEFANINI, M.; DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, v.216, p.173-174, 1967.
- STURTEVANT, A. P.; REVELL, I. L. Reduction of *Bacillus larvae* spores in liquid food of honeybees by action of the honey stopper, and its relation to the development of American foulbrood, **Journal of Economic Entomology**, v.46, p.855-860, 1953.
- SUTTER, G. R.; ROTHENBULER, W. C.; RAUN, E. S. Resistance to American foulbrood in honey bees VII Growth of resistance and susceptible larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.12, p.25-28, 1968.
- TARPY, D. R.; PAGE JR., R. E. The curious promiscuity of queen honey bees (*Apis mellifera*): evolutionary and behavioral mechanisms. **Annales Zoologici Fennici**, v.38, p.255-265, 2001.
- TEIXEIRA, E. W.; CHEN, Y.; MESSAGE, D.; PETTIS, J.; EVANS, J. D. Virus infections in Brazilian honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.99, p.117-119, 2008.
- TENÓRIO, E. G. **Comportamento higiênico em abelhas indígenas (*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 e *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811) e em abelhas africanizadas (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758)**. 1996. 54p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, v.443, p.931-949, 2006.
- THOMPSON, V. C. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. **Journal of Apicultural Research**, v.3, p.25-30, 1964.
- THOMPSON, V. C.; ROTHENBUHLER, W. C. Resistance to American foulbrood in honey bees. II. Differential protection of larvae by adults of different genetic lines. **Journal of Economic Entomology**, v.50, p.731-737, 1957.
- VILLA, J. D.; DANKA, R. G. Caste, sex and strain of honey bees (*Apis mellifera*) affect infestation with tracheal mites (*Acarapis woodi*). **Experimental and Applied Acarology**, v.37, p.157-164, 2005.
- WEDENIG, M.; RIESSBERGER-GALLÉ, U.; CRAILSHEIM. A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae larvae*. **Apidologie**, v.34, p.43-51, 2003.

- WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, L. K.; LU YINRONG. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. **Food Chemistry**, v.70, p.427-435, 2000.
- WILKES, K.; OLDROYD, B. **Breeding hygienic disease resistance bees**. Rural Industries Research and Development Corporation. 2002. 29p.
- WILSON, W. T. Resistance to american foulbrood in honey bees. XI. Fate of *Bacillus larvae* ingested by adults. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.17, p.247-255, 1971.
- WOODROW, A. W. Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. **Gleanings in Bee Culture**, v.69, p.148-151, 1941.
- WOODROW, A. W. Susceptibility of honey bee larvae to inoculations with spores of *Bacillus larvae*. **Journal of Economic Entomology**, v.35, p.892-895, 1942.
- WOODROW, W. A; HOLST, E. C. The mechanism of colony resistance to American foulbrood. **Journal of Economic Entomology**, v.35, p.327-330, 1942.