

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas
relacionadas ao comportamento higiênico”.

Rogério Aparecido Pereira

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas
relacionadas ao comportamento higiênico”.

Rogério Aparecido Pereira
Orientador: Prof. Dr. Lionel Segui Gonçalves

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Entomologia

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Rogério Aparecido Pereira

“Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas
relacionadas ao comportamento higiênico”.

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008

PEREIRA, ROGERIO APARECIDO

Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas relacionadas ao comportamento higiênico. Rogério Aparecido Pereira; Orientador: Lionel Segui Gonçalves – Ribeirão Preto, 2008

121p.: 28 il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP – Departamento de Biologia

1. *Apis mellifera* . 2. Comportamento higiênico. 3 Comportamento de abelhas. 4. monitoramento individual de abelhas. 5 . abelhas africanizadas

Dedico

Aos meus pais Benedito e em especial minha mãe Wilma, meu amor primeiro e o maior de todos, por seu incondicional amor e por sempre estar a meu lado me incentivando e me dando forças nos momentos mais difíceis;

À Elaine minha amada irmã e Renato meu cunhado, por apoiar-me em todos os momentos de minha vida;

À Ana Laura, minha sobrinha que amo tanto por seu carinho e respeito.

Agradeço,

À Deus, por ter me permitido a vida...

Ao Prof. Dr. Lionel Segui Gonçalves, pela oportunidade, orientação, e transmissão de valiosíssimos conhecimentos, mas acima de tudo pela imensa amizade e carinho a mim dispensado;

À Prof^a. Dr^a. Luci Rolandi Bego, por ter me ensinado a dar os primeiros passos no estudo do comportamento de abelhas;

À Prof^a. Dr^a Zilá L. P. Simões, Prof^a. Dr^a. Márcia M. G. Bitondi, Prof. David de Jong, Prof. Ademilson E. E. Soares e Prof. Klaus H. Hartfelder, pela convivência e amizade durante todos estes anos;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Entomologia, pela amizade e presteza em resolver nossos problemas;

Ao Prof. Dr. Evandro Camillo, pela agradável companhia e seu bom humor contagiante;

À secretária do Programa de pós-graduação em Entomologia e acima de tudo minha grande amiga, Renata Andrade Cavallari, pela paciência, carinho e por estar sempre disposta a me ajudar nos momentos mais difíceis, fazendo de tudo para resolver meus problemas, minha eterna gratidão;

Aos técnicos Adelino Penatti, João José dos Santos, Jairo de Souza, Luiz Roberto Aguiar e Roberto Mazzuco, pelos serviços prestados durante todos estes anos;

À Sr^a. Karin Gonçalves Rossi e 6 P Marketing e Propaganda Ltda (www.6p.com.br) pelo fornecimento dos números plastificados usados na marcação individual das abelhas, sem os quais, este trabalho não seria tão minucioso;

À minha “família científica” Tiago Mauricio Franco, Gesline Fernandes de Almeida, Vanessa de Andrade Bugalho, Marina Lopes Grassi e Daiana Almeida, família que eu carinhosamente apelidei de “Família Higiênica Diploide Enxameatória de Africanização” cada um sabe o porque;

À minha grande amiga inseparável,” irmã”, companheira de todas as horas e também integrante da família científica Michele Manfrini Moraes, por todos estes maravilhosos anos de convivência e carinho a mim dispensado. **AMO VOCÊ**

Aos meus grandes amigos e minha segunda família: Erica Tanaka, Érika Lis, André Marcelo, Denise, Val, Gil, Luciano, Luciana, Sandro, Marcelinho, Regiana, Danilo, Mariane, Julio e agora a nossa pequena Maria Julia, obrigado por estarem sempre a meu lado nos bons e maus momentos de minha vida;

Às grandes amigas do Departamento de Ecologia, Solange Bispo, Ana Carolina Roselino e Selma Bellusci, e embora muito distante dos olhos mas bem perto do coração Veronika M. Schmitz, por estarem sempre comigo pro que der e vier;

Às amigas Marcela B. Laure; Vera Lucia Figueiredo e Ana Maria Boneti e ao Pedro Roberto Prado, pelas agradáveis conversas durante o nosso tradicional cafezinho da manhã;

Aos amigos do bloco A: Ana Durvalina Bontorim, Aline Aleixo, Geusa Simone de Freitas, Anete Lourenço, Karina Guidugli, Rodrigo Dalacqua, Juliana Martins, Fernanda Torres, Moises Elias, Mônica Florecki, Ana Rita Batistela, Amanda Freire, Ana Paula Farnesi, Sergio Azevedo, Weyder Cristiano, Carlos Lobo, Paulo Emilio Alvarenga, Francis de Moraes, Alexandre Cristino, Adriana Mendes, Michele Prioli, Fabio Capelari, Camila Maia, Tathiana Melo, Liliane Macedo e Ivan Akatso

Aos vigilantes Carlos, Ernandes , Rubens e Luciano pelas trocas das fitas de vídeo durante as filmagens no período noturno;

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o período do doutorado.

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto;

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por ter me acolhido para a realização deste trabalho;

À empresa Santa Emilia Distribuidora de Veículos e Autopeças por ter me concedido a bolsa de estudos enquanto funcionário, meus eternos agradecimentos

À XXIII turma do Curso de Biologia da Faculdade Barão de Mauá, saudades...

Flor-de-ir-embora

(Fátima Guedes)

Flor de ir embora
é uma flor que se alimenta
do que a gente chora
Rompe a terra, decidida,
flor do meu desejo
de correr o mundo afora
Flor de sentimento
amadurecendo, aos poucos,
a minha partida
Quando a flor abrir inteira
muda a minha vida
Esperei o tempo certo
E lá vou eu, e lá vou eu
flor de ir embora, eu vou
E agora esse mundo é meu.

RESUMO

“Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas relacionadas ao comportamento higiênico”

Com a finalidade de se aprofundar os estudos sobre as atividades individuais das abelhas africanizadas envolvidas no comportamento higiênico a presente tese foi desenvolvida, tendo como objetivo principal o estudo detalhado ou monitoramento de todo o processo dentro de uma colônia. Foram utilizadas três colônias higiênicas e três colônias não higiênicas bem como duas colméias de observação com paredes de vidro (1 contendo abelhas higiênicas e 1 contendo abelhas não higiênica) instaladas em uma sala de observações existente no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina – USP. As colméias de observação continham cada uma aproximadamente 3.000 abelhas africanizadas *Apis mellifera* provenientes das colônias higiênicas e não higiênicas, as quais, ao nascer, foram marcadas com etiquetas coloridas e numeradas fixadas ao tórax. Para a análise detalhada dos comportamentos foram utilizadas filmadoras Panasonic e equipamentos de vídeo cassete para gravações bem como técnicas especiais de filmagens que permitiram o monitoramento individual das abelhas 24 horas por dia, durante todo o processo envolvido no comportamento higiênico. Foram realizadas um total de 11,064 horas de filmagens, sendo 5,568 horas para colméias higiênicas e 5,496 horas para as colméias não higiênicas. Para efeito comparativo foram testados 3 tipos de favos, ou seja, favos velhos e novos (contendo crias mortas pelo método de perfuração) e favos contendo crias mortas pelo método do congelamento, os quais eram embutidos, por meio de uma moldura metálica, no quadro de cria da colméia de observação. Os favos foram inseridos em diferentes período do dia, para se averiguar se existiam diferenças comportamentais em períodos diurnos e noturnos. Para as análises estatísticas as médias foram comparadas utilizando-se os Test-t e Test Mann-Whitney, bem como análises de variancia ANOVA e ANOVA Rank, levando-se em consideração a normalidade das amostras. Foi verificado que de um modo geral, mesmo utilizando-se de três tipos de favos (favos novos, favos velhos e favos congelados) o comportamento higiênico tem um padrão semelhante tanto em colméias higiênicas quanto em colméias não higiênicas. Em ambas colméias, constatou-se que, além dos comportamentos já conhecidos de desoperculação das células e remoção das crias mortas, as abelhas executam também outras três atividades, a saber: inspeção pré desoperculação das células de cria, introdução das

antenas no interior das células contendo a cria morta e inspeção da cria morta. Verificou-se que as operárias iniciam as atividades do comportamento higiênico em idades bastante jovens (2 dias) e que, dentro de uma colônia, existem operárias que são especializadas em desempenhar comportamentos específicos nas diferentes etapas do comportamento higiênico, ou seja, algumas abelhas apenas pré inspecionam as células, algumas somente introduzem as antenas nos orifícios dos opérculos, outras apenas inspecionam as células contendo as crias mortas, outras somente desoperculam e outras somente removem as crias. Entretanto, existem também operárias que realizam duas ou mais destas tarefas relacionadas ao comportamento higiênico. Com relação ao comportamento de desoperculação, verificou-se que as operárias são mais ativas quando apresentam idades entre 3 a 14 dias, já para o comportamento de remoção as operárias que o manifestam com maior intensidade são aquelas com idades entre 2 a 14 dias. Embora tanto abelhas mais jovens quanto abelhas mais velhas possam desopercular as células ou remover as crias, as análises estatísticas comprovaram que a idade das mesmas não influencia no tempo de realização das duas atividades (desoperculação e remoção). Foi constatado que as operárias desenvolvem as atividades de desoperculação e remoção em menos tempo ou mais rapidamente nos favos novos do que nos favos velhos e congelados, independente de serem de colônias higiênicas ou não higiênicas. As análises estatísticas mostraram também não haver influência do período do dia (diurno ou noturno) no tempo gasto nestes comportamentos de desoperculação e remoção. Ficou também estatisticamente comprovado que o tempo ocioso do comportamento higiênico, ou seja, o intervalo de tempo que uma célula contendo a cria morta fica sem receber a visita de operárias removedoras, nas colméias não higiênicas é superior ao tempo ocioso das colméias higiênicas. Este tempo de ociosidade, aliado ao fator genético, pode ser considerado como um fator determinante na classificação de uma colônia em higiênica ou não higiênica. As atividades descritas no presente trabalho serviram para demonstrar experimentalmente e pela primeira vez o superior comportamento de remoção das crias mortas pelas operárias das colméias higiênicas em relação as não higiênicas, resultados que representam um importante subsidio para as pesquisas apícolas, justificando a importância de se usar o comportamento higiênico nos programas de seleção e melhoramento das abelhas africanizadas.

ABSTRACT

“Monitoring the individual activities of Africanized bees related to hygienic behavior”

We studied the behavior of individual Africanized bees (*Apis mellifera*) that performed hygienic behavior. Observations were made of bees from three hygienic and three non-hygienic colonies placed in two single-frame observation hive colonies (one containing hygienic bee and one containing non-hygienic bees). Each of the observation hive colonies was populated with approximately 3,000 newly emerged bees from the hygienic or non-hygienic colonies; they were all individually marked on the thorax with colored and numbered tags. The behaviors were filmed and monitored in such a way that the bees could be observed 24 hours per day while they performed hygienic behavior. A total of 11,064 hours of filming was done, 5,568 hours of the hygienic bees and 5,496 hours of the non-hygienic bees. Three types of killed brood were used in the tests: old and new brood combs with pin-perforated brood and combs with freeze-killed brood. The experimental comb pieces were placed in a metal molding that was embedded in the observation colony comb. Combs were introduced at different times of day to observe if there were differences in diurnal versus nocturnal removal behaviors. Statistical comparisons of means were made with the Student t-test and the Mann-Whitney test, as well as with ANOVA and ANOVA Rank, depending on the normality of the samples. Generally, independent of the type of brood comb or how the brood was killed, the hygienic behavior patterns were similar in the hygienic and non-hygienic bees. In both colonies, it was observed that besides the already-known behaviors of uncapping and removal of the dead brood, the bees also performed three other types of behaviors: inspection of the cells before uncapping, introduction of their antennae into the cells containing dead brood and inspecting the dead brood. It was found that the workers initiated their hygienic-behavior activities at quite a young age (two days) and that within each colony there were workers that were specialized in certain steps of the hygienic behavior process. Some bees only did initial inspections of capped brood, some only introduced their antennae into the holes in the cappings, others only inspected cells containing dead brood, others only uncapped and others only removed the dead brood. However, there were also bees that performed two or more of these hygienic behavior tasks. Uncapping was most common among bees 3-14 days old,

while removing was most common among 2-14 day-old bees. Both young and old bees can uncap or remove brood. There was no significant difference in the time taken to perform these two tasks by younger versus older bees. Both hygienic and non-hygienic bees were faster at uncapping new brood comb with pin-killed brood than pin-killed brood in old comb or brood in comb that had been frozen to kill the brood. The time taken for these behaviors was also not influenced by time of day. Non-hygienic bees took longer to find and begin examining dead brood than did hygienic bees. This delay appears to be a determining factor for the classification of a colony as hygienic or non-hygienic. These observations demonstrate and confirm the superiority of hygienic bees for removing dead brood. This justifies the use of this characteristic in selection programs to improve disease resistance in honey bees.

Índice

Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Breve histórico da apicultura no Brasil	2
1.2 Generalidades sobre o comportamento higiênico	6
1.2.1 Genética do comportamento higiênico	7
1.2.2 O comportamento higiênico como resistência às doenças da cria ..	10
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Local de trabalho e espécies utilizadas	21
3.2 Montagem das colméias de observação	21
3.3 Equipamentos utilizados e técnicas de filmagem	24
3.4 Diferentes situações em que foi verificado o comportamento higiênico	25
3.4.1 – Utilização de favos novos e favos velhos no comportamento higiênico.	25
3.4.2 – Crias mortas pelo método do congelamento.....	28
3.4.3 – Comportamento higiênico em períodos noturnos e diurnos.....	29
3.5 – Análise estatística	30
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 – Idade das abelhas que participam do comportamento higiênico.....	33
4.2 – Monitoramento individual das operárias que realizaram o comportamento higiênico em períodos diurno e noturno	62
4.3 – Comparação do comportamento higiênico nos três tipos de tratamentos PARÂMETROS TEMPORAIS	93

5 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
6 – BIBLIOGRAFIA	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Breve histórico da apicultura no Brasil

A apicultura brasileira vem sendo explorada desde o ano de 1839, quando os colonizadores europeus introduziram no País, as primeiras abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*), também conhecidas como abelhas pretas ou alemãs. Esta introdução se deu principalmente no Sul do País, onde, na época, as tecnologias utilizadas baseavam-se em metodologias européias, em especial a tecnologia alemã face à grande concentração germânica naquela região. Naquele período, a apicultura ainda não era vista como uma atividade muito importante, uma vez que as pessoas criavam as abelhas mais como uma atividade de lazer ou então como uma atividade secundária, entretanto, aos poucos, esta atividade foi se expandindo para o sudeste do Brasil e as demais regiões.

Embora o clima brasileiro e a grande variedade de espécies vegetais aqui existentes fossem propícios para a exploração da apicultura, o Brasil não teve o desenvolvimento que se esperava para tal atividade, uma vez que o País ainda tinha uma produção anual muito pequena quando comparado com a produção de mel nos países vizinhos, como por exemplo no caso da Argentina, que na década de 50 se destacava como o maior produtor apícola da América do Sul. Este fato chamou a atenção das nossas autoridades que na época convidaram o geneticista brasileiro Warwick Estevan Kerr, para analisar o problema desta baixa produtividade num país com condições tão favoráveis para a exploração apícola. Após realizar estudos a respeito da produtividade de várias raças de abelhas, o Prof. Kerr constatou que na África existiam abelhas mais produtivas que as européias, então foi aí que no ano de 1956 realizou uma viagem até a África do Sul e após constatar a alta produtividade da abelha africana *Apis mellifera scutellata*, decidiu introduzi-la no Brasil.

O objetivo do geneticista era realizar uma seleção para reduzir a alta agressividade destas abelhas, sem que houvesse mudanças na sua produtividade, entretanto, um acidente causado por um apicultor, mudou a história das abelhas africanas no Brasil, quando houve a retirada da tela excludora (para impedir a saída da rainha e conseqüentemente causar uma enxameação) das colônias onde se encontravam as abelhas importadas que estavam em quarentena e, desse modo,

houve a saída de enxames para a natureza. Estas saídas permitiram que houvessem cruzamentos dessas abelhas com as abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *A. m. ligustica*,) que já existiam no Brasil, dando origem a um polihíbrido, as abelhas africanizadas que atualmente conhecemos. Salienta-se que a terminologia abelhas africanizadas foi dada a estes polihíbridos, por Gonçalves (1974) devido ao fato de que nestes, prevaleceram as características consideradas como negativas das abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*), dentre as quais destacam-se a alta agressividade e extrema tendência enxameatória, o que lhes proporcionou uma rápida expansão pelas Américas. Sem dúvida alguma, a chegada destas abelhas no continente americano causou profundas mudanças de hábitos por parte dos apicultores e técnicos apícolas dos países por onde elas passaram, devido ao grande desconhecimento e ao despreparo no seu manejo. Todos foram forçados a mudar as técnicas apícolas que utilizavam para trabalhar com as abelhas européias, adaptando-se agora a trabalhar com as abelhas africanizadas (Gonçalves e Stort, 1994) e a partir de 1970, quando ocorreu o Primeiro Congresso Brasileiro de Apicultura em Florianópolis (SC) foi dado o primeiro passo para as mudanças nos rumos da apicultura brasileira, a qual atualmente se tornou uma atividade profissional lucrativa (Gonçalves, 2004).

Durante vários anos, após a introdução destas abelhas no Brasil, devido ao impacto negativo que foi criado, o principal motivo da introdução destas abelhas no país, ou seja, a sua intensa atividade forrageira que lhe confere alta produtividade constatada anteriormente pelo Prof. Kerr na literatura internacional e posteriormente em seus estudos de produtividade, ficou em segundo plano (Gonçalves e Stort, 1994). Entretanto, nos dias atuais, a apicultura brasileira tem progredido muito com as abelhas africanizadas, sendo que estas não mais representam sérios problemas como nos anos 60 quando eram totalmente indesejáveis, e atualmente, a prática apícola com este tipo de abelha é considerado um ótimo investimento, sendo que para tal, nenhum outro tipo de abelha é encontrado em quase todas as regiões do País (Gonçalves, 2004).

No intuito de se reduzir a agressividade das abelhas africanizadas, alguns apicultores importaram ou introduziram clandestinamente rainhas de abelhas européias no País, o que resultou na ocorrência de várias doenças e pragas apícolas. Assim sendo, no Brasil, já foram diagnosticadas várias doenças e parasitoses,

destacando-se entre elas a Nosemose, a Cria Pútrida Européia, a Paralisia, a Acariose, a Cria Ensacada, a Cria Giz e, mais recentemente, a Varroatose causada pelo ácaro ectoparasita *Varroa destructor* (in Gramacho, 1999).

As doenças de cria são fatores decisivos na competição entre diversas raças ou linhagens de abelhas, uma vez que as mais resistentes a estas doenças ou pragas são justamente aquelas que se destacam na manutenção de um bom nível de população e, portanto, na produtividade (Cosenza e Silva, 1972).

Como as doenças da cria causam danos às colônias, e conseqüentemente, prejuízos ao apicultor, lamentavelmente muitos deles fazem uso de produtos químicos para combater estas doenças, e isto faz com que ocorra a contaminação dos produtos apícolas (mel, cera, geléia real, etc.) pelos antibióticos, acaricidas, fungicidas, etc. e desta forma, estes produtos das abelhas tendem a apresentar resíduos químicos, o que os tornam inviáveis para serem levados ao mercado. Infelizmente, esses fatos já foram registrados em vários países, havendo inclusive o bloqueio para exportação dos produtos até mesmo do maior produtor mundial de mel, a China (produtora de mais de 250 mil toneladas de mel/ano), que no período de 2001-2004 ficou fora do mercado internacional, devido ao uso em seus apiários do antibiótico cloranfenicol que é proibido tanto no mercado dos Estados Unidos como da Europa (a Alemanha e os Estados Unidos são os maiores importadores de mel do mundo).

O fato da China ter perdido boa parcela do mercado internacional de mel, contribuiu muito para a entrada de outros países neste mercado, inclusive do Brasil que nunca havia se destacado como exportador, passando a ocupar uma importante posição no cenário do comércio internacional de mel (Gonçalves, 2004). Entretanto, recentemente, o Brasil sofreu um bloqueio de suas exportações de mel para a Europa, face à inoperância do Ministério da Agricultura, que deixou de atender as normas exigidas e devidamente anunciadas e reforçadas em novembro de 2005 pelo Mercado Europeu para a exportação de mel do Brasil, e de acordo com Gonçalves (2006) é preciso que haja uma solução urgente por parte de nossas autoridades do Ministério da Agricultura para que seja cancelado pelos europeus o bloqueio das exportações de mel para a Europa pois, se o impasse não for resolvido em breve a nossa apicultura certamente entrará em uma série crise, o que infelizmente será um retrocesso ou o “caos na apicultura brasileira”.

Mesmo diante de um fato tão lamentável como este por parte de nossas autoridades, existem ainda grandes perspectivas de crescimento da apicultura brasileira.

Felizmente, na região Nordeste do Brasil, existem instituições que vem apoiando programas de incentivo ao uso de práticas apícolas adequadas que propiciem a produção de produtos apícolas de alta qualidade para atender as exigências do mercado nacional e internacional. O exemplo mais marcante é o programa de incentivo à apicultura do Sebrae do Rio Grande do Norte. Somente nos últimos três anos (2003 a 2005), o Sebrae-RN capacitou mais de 3.000 apicultores. Nesse período foram criadas 25 associações e 32 casas de mel, sendo que os apicultores capacitados já manipulam mais de 50 mil colméias e muitos dos quais já atingiram médias de produção de 50 kg por colméia, fato que demonstra o grande potencial apícola do Estado e da região. Até o ano de 2000, o nordeste brasileiro não aparecia nas estatísticas brasileiras de exportação de mel, sendo que a região Sul do Brasil era responsável por aproximadamente 80% do mel exportado. Entretanto no ano de 2003 os Estados da região Nordeste do país aumentaram significativamente sua produção, sendo responsáveis por cerca de 29% do mel brasileiro exportado enquanto a região Sul e Sudeste foram responsáveis por cerca de 35% cada, respectivamente, e as outras regiões por cerca de 4% (Gonçalves, 2004). Este fato, associado a outras estatísticas recentes relatando aumento do número de colônias, número de apicultores e de associações nos vários estados nordestinos, mostra claramente o grande potencial apícola da região.

Para se preservar a apicultura brasileira, é necessário que tenha continuidade um controle sanitário eficiente para evitar a entrada e propagação de novas doenças. Há também a necessidade de se investir ainda mais em pesquisas sobre patologia apícola e melhoramento genético de abelhas através da seleção de linhagens resistentes à doenças), visto que toda vez que uma larva ou pupa morre dentro do favo, devido à ação de um agente patogênico, causa um sério problema para as abelhas adultas da colônia. Isso porque a cria afetada pode tornar-se um foco de infecção que poderá colocar em risco todos os indivíduos que estão em desenvolvimento (Stort & Gonçalves, 1994). Desse modo, é de extrema importância que as operárias retirem as crias mortas, e tal retirada é feita através de um comportamento denominado comportamento higiênico, o qual funciona como um me

canismo de defesa natural contra doenças e pragas apícolas. Daí a importância de se investir em pesquisas relacionadas a este tema, uma vez que, as mais diversas informações que tivermos a respeito deste comportamento tão importante para as colônias de abelhas, aliada às pesquisas sobre patologia apícola, serão de grande valia para a aplicação em programas de melhoramento de abelhas na seleção de linhagens resistentes à doenças, o que é de extrema importância para a apicultura brasileira.

1.2 - Generalidades sobre o comportamento higiênico

A primeira observação sobre o comportamento higiênico em *Apis mellifera* foi registrada na década de 1930, quando se tentava determinar se existia resistência por parte das abelhas da colônia, à Cria Pútrida Americana (AFB), uma doença causada pela bactéria *Paenibacillus larvae* (Park, 1936 e Park *et al.* 1937), uma vez que foi observado que algumas abelhas apresentavam um certo grau de resistência às doenças. Foi observado ainda, que esta resistência era herdável e que consistia de resistência fisiológica e com componente comportamental. Posteriormente, em 1943, Woodrow & States também verificaram esta resistência, porém neste caso os autores concluíram que a mesma era basicamente comportamental, no qual constataram que as abelhas operárias tinham a habilidade de descobrir e remover crias atacadas pelo *P. larvae*, antes de ocorrer a esporulação. Tarr (1937) demonstrou que o estado vegetativo do patógeno não era infeccioso e, conseqüentemente, quando as abelhas removiam precocemente as larvas doentes, mas ainda sem esporos antes de assumir a consistência filamentosa, elas não se contaminavam e, portanto, não transmitiam a doença para as crias sadias. Desse modo, este comportamento passou então a ser visto como uma das melhores alternativas no controle desta e de outras doenças de cria. (*in* Gramacho, 1999).

Diante disso, várias pesquisas vêm sendo feitas nesse sentido e muitos autores comprovam que o comportamento higiênico constitui uma fonte de resistência natural a varias doenças das abelhas, tais como: Cria Pútrida Americana

(Spivak & Reuter, 2001), contra a Cria Giz (Gilliam *et al.*, 1983; Milne, 1983; Taber, 1986, Invernizzi, 2001).

O comportamento higiênico é definido como a capacidade das abelhas detectarem e removerem crias mortas ou doentes do interior da colméia (Rothenbuhler, 1964a, b; Gonçalves & Kerr, 1970 *in* Gramacho, 1999), apesar de ser também definido por Message (1979) como a remoção de qualquer material estranho no interior da colméia. Existe ainda uma ampliação do conceito “higiênico” nas abelhas, como foi o caso da introdução, por Moretto (1993) do caráter higiênico para abelhas que conseguem se livrar do ácaro *Varroa destructor*, que atualmente é uma das pragas que mais causam problemas à apicultura comercial em grande parte do mundo, embora no Brasil as abelhas africanizadas tem se mostrado tolerantes a este parasita (De Jong & Gonçalves, 1998). Nas abelhas do gênero *Apis*, este comportamento tem se tornado cada vez mais importante, uma vez que, conforme já exposto, funciona como um eficiente mecanismo comportamental de resistência à doenças da cria (Gilliam *et al.*, 1983; Rath & Drescher, 1990; Palacio *et al.*, 2000; Spivak & Reuter, 2001).

1.2.1 – Genética do comportamento higiênico

Atualmente, sabe-se que a base do comportamento higiênico é genética. O número de genes que o controla tem sido avaliado em vários caminhos sendo o primeiro trabalho encontrado na literatura sobre esse assunto o de Walter Rothenbuhler (1964a).

Foi em 1956 que Rothenbuhler & Thompson desenvolveram as primeiras linhagens de abelhas resistentes à doenças de cria através da utilização de rainhas de um apicultor (Sr. Brown), oriundas de rainhas filhas de algumas gerações de colônias de seu apiário que sobreviveram a um ataque severo de Cria Pútrida Americana (AFB), e outras provenientes de diversos apicultores. Assim, neste estudo desenvolveram-se duas linhagens que foram denominadas linhagem “Brown”, resistente à AFB e linhagem “Van Socoy”, susceptível à AFB. Entretanto, foi em 1964 que

Rothenbuhler observou uma diferença de comportamento entre as linhagens endogâmicas, no qual verificou que duas das linhagens eram resistentes a esta doença e removiam as crias mortas, enquanto que as outras duas linhagens eram susceptíveis à doença e não removiam as crias mortas de dentro das células. Analisando a resposta da primeira geração (F1), resultado do cruzamento entre as linhagens “Brown” e “Van Scoy” (respectivamente linhagens resistente e susceptíveis à AFB), e da resposta de retrocruzamentos de zangões filhos da rainha F1 com rainhas resistentes (“Brown”), Rothenbuhler (1964b) descobriu que o comportamento higiênico das abelhas *Apis* era controlado por dois pares de genes recessivos, o gene *u* = uncapper (desoperculador) e o gene *r* = remover (removedor) que, em homozigose (*uu/rr*) permitem que as abelhas portadoras de ambos os genes sejam classificadas como higiênicas, as quais são capazes de desopercular as células remover crias mortas ou doentes de seu interior (*in* Gramacho, 1995). Assim, os genótipos *D*_ / *R*_ determinam, portanto o comportamento não higiênico e a combinação desses genes permite a obtenção de 4 fenótipos e 9 genótipos diferentes, o que significa que dentro de uma colméia podem haver abelhas que desoperculam as células e removem as crias mortas ou doentes (Figura 1a), apresentando o genótipo *uu/rr*, sendo classificadas portanto como abelhas higiênicas, podem haver também abelhas que não desoperculam as células e nem removem as crias mortas ou doentes (Figura 1b), as quais apresentam o genótipo *UU/RR*, *UU/Rr*, *Uu/RR* e *Uu/Rr* e são classificadas como abelhas não higiênicas. Existem ainda dentro de uma colônia, outras abelhas também classificadas como não higiênicas: as abelhas não higiênicas não removedoras, portadoras dos genótipos *uu/RR* e *uu/Rr* e as abelhas não higiênicas removedoras, as quais portam os genótipos *UU/rr* e *Uu/rr*. No primeiro caso (não higiênicas não removedoras) as abelhas somente desoperculam as células contendo a cria morta ou doente, porem não as remove (Figura 1c) já no segundo caso (não higiênica removedoras) as operárias são capazes somente de remover a cria se o opérculo da célula for aberto por outra abelha. De qualquer forma, dentro de uma colméia podem existir, portanto, estes 9 tipos de genótipos dependendo do acasalamento da rainha.



Figura 1 – Representações das características das células de cria que são deixadas por abelhas higiênicas ou não higiênicas dependendo do seu genótipo. (a) as células foram desoperculadas e as crias removidas; (b) as células não foram desoperculadas nem tiveram suas crias removidas e (c) as células somente foram desoperculadas mas as crias permaneceram

Em 1988, Moritz fez uma reavaliação dos dados obtidos por Rothenbuhler no modelo de dois loci e propôs um modelo de 3 pares de genes, sugerindo que o comportamento higiênico poderia, na verdade ser o resultado de um mecanismo genético mais complexo do que a simples segregação Mendeliana. Embora o autor não tenha testado experimentalmente sua hipótese, de acordo com o mesmo, existiria então um par de genes responsáveis pela desoperculação e dois pares responsáveis pela remoção.

Baseado em observações experimentais da remoção de crias infestadas com ácaros *Varroa destructor* em abelhas higiênicas, Gramacho (1999) enfatizou que a primeira etapa no processo higiênico é a pontuação do opérculo de cera sobre a célula que contém a cria morta, doente ou infestada. A pontuação corresponde a um ou vários orifícios no opérculo (Figura 2), os quais são seguidos pela desoperculação da célula e remoção parcial ou total da cria. Assim, a autora também propôs um modelo baseado em três pares de genes recessivos: dois que controlariam a pontuação e o comportamento desoperculação (u_1 e u_2) e um (r) que controlaria a remoção. No entanto, Kefuss *et al.* (1996) acreditam que o comportamento higiênico seja determinado por 20 a 30 genes e consideram que este ainda não está completamente esclarecido, necessitando assim de mais investigações (Gramacho, 1999).

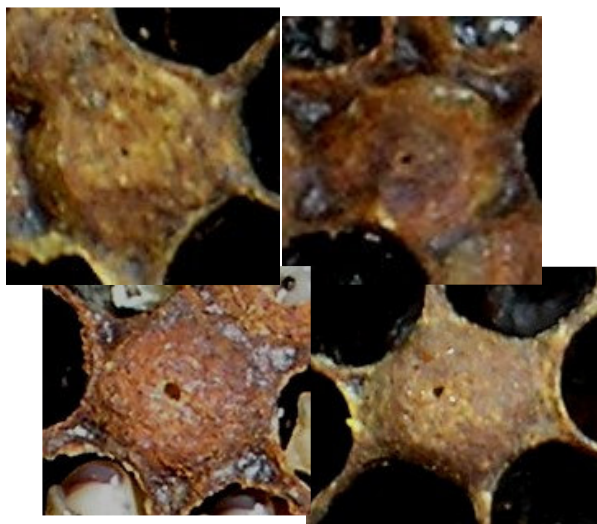


Figura 2 – Células de cria com opérculos pontuados

Recentemente, Lapidge *et al.* (2002) verificaram, através de técnicas moleculares, que a base do comportamento higiênico é ainda mais complexa, e segundo os autores, muitos genes estariam contribuindo para o desempenho do mesmo, uma vez que, durante seus cruzamentos foram detectados até 7 loci associados a este comportamento.

Embora o comportamento higiênico já esteja bem descrito, existem ainda alguns pontos não bem esclarecidos face à grande variabilidade de comportamentos das abelhas quanto à limpeza das células de cria, necessitando assim de outros estudos abordando os vários aspectos deste comportamento.

1.2.2 - O comportamento higiênico como resistência às doenças da cria

A resistência à doenças em abelhas *Apis mellifera* é uma característica que está diretamente relacionada com o comportamento higiênico ou de limpeza da colônia, uma vez que, quanto menos foco de infecção existir na colônia, mais sadias estarão as abelhas (Gonçalves, 1994 *in* Gramacho, 1995).

Após o trabalho pioneiro de Rothenbuhler (1964a, b) o comportamento higiênico tornou-se bastante conhecido e tem sido amplamente estudado por vários

pesquisadores, principalmente como subsídios para selecionar colônias resistentes às doenças (*in* Gramacho, 1995; 1999).

Visando testar a capacidade de limpeza dos favos para determinar a resistência às doenças de cria, bem como efetuar uma comparação entre as abelhas africanas, caucasianas e híbridas, Cosenza e Silva (1972) realizaram experimentos nestas espécies através da introdução de pedaços de favo com crias mortas pelo método de congelamento e verificaram que abelhas africanas são significativamente mais resistentes que as caucasianas e as híbridas, pois foi a única espécie a apresentar 100% de remoção da cria morta. Utilizando-se do mesmo método de avaliação (congelamento), Kamel *et al.* (2003) comprovaram que no Egito as colônias de *Apis mellifera lamarckii* tiveram um nível de comportamento higiênico significativamente maior do que as colônias de *Apis mellifera carnica* e segundo os autores, existiram diferenças significativas quanto à taxa de remoção de crias entre estas duas linhagens, sugerindo assim, que a ocorrência natural do comportamento higiênico é mais alto em *lamarckii* do que na *carnica* egípcia.

Anteriormente, Gilliam *et al.* (1983) verificaram que as abelhas podem detectar e remover crias com sintomas de Cria Giz, antes que o apicultor possa perceber, e que nas colônias resistentes (colônias higiênicas) houve uma maior eficiência na remoção das crias doentes, enquanto que as colônias suscetíveis (de comportamento higiênico baixo) foram contaminadas ainda mais com o fungo causador da Cria Giz, *Ascophaera apis*, o qual contaminava diferentes substratos das colônias.

Objetivando estudar a relação entre o comportamento higiênico e as doenças da cria, bem como determinar a mudança no comportamento higiênico em uma população de *Apis mellifera* selecionada sem o uso de inseminação instrumental, Palacio *et al.* (2000) desenvolveram na Argentina um experimento durante cinco anos e puderam verificar que as colônias higiênicas apresentaram uma menor frequência de doenças da cria quando comparadas com colônias não higiênicas. De acordo com os autores, houve um nítido aumento do comportamento higiênico nas colônias após quatro anos de seleção das mesmas, demonstrando que é possível aumentar a frequência de colônias higiênicas em populações com rainhas fecundadas naturalmente.

No ano de 2001, Spivak & Reuter desenvolveram estudos semelhantes em colônias selecionadas, porém, neste caso as rainhas foram inseminadas artificialmente. Os autores verificaram que as colônias higiênicas que foram selecionadas mostraram ser resistentes à Cria Pútrida Americana (AFB), pois, das colônias que apresentaram sintomas clínicos da doença durante o período de estudo, uma grande porcentagem recuperou-se por si própria. Em contraste, de todas as colônias não higiênicas que apresentaram os mesmos sintomas, apenas uma recuperou-se. Neste mesmo trabalho, os autores puderam verificar que as colônias higiênicas mostraram resistência à Cria Giz tão bem quanto à AFB.

Além das doenças da cria causada por vírus ou bactérias, um dos principais problemas da apicultura é uma praga denominada Varroatose, causada pelo ácaro *Varroa destructor* (anteriormente denominado *Varroa jacobsoni*), um ecto-parasita que ataca tanto a cria como os adultos das abelhas do gênero *Apis*. Esta praga tem causado seríssimos danos à apicultura, principalmente em países de clima temperado (Gramacho e Gonçalves, 1997). Na América do Sul, o ácaro *Varroa destructor* chegou primeiramente ao Paraguai no ano de 1971, sendo ele introduzido naquele País através da importação de rainhas infestadas provenientes do Japão (De Jong & Gonçalves, 1981). Embora não cause a perda excessiva das colônias, um grande número de pesquisas vêm sendo realizadas na tentativa de se encontrar uma solução para resolver o problema da varroatose sem o uso de acaricidas, no Brasil e em outras partes do mundo.

Vários são os fatores que implicam na infestação do ácaro *Varroa destructor* em colônias de abelhas melíferas, e dentre estes podemos citar as condições climáticas e a raça da abelha infestada (De Jong *et al.*, 1984). Desse modo, com o propósito de verificar a influência destes fatores na dinâmica populacional de *Varroa destructor*, Moretto (1988) realizou um experimento em 3 regiões climaticamente distintas, utilizando-se de duas raças de abelhas *Apis mellifera* africanizada e italianas. Ao comparar os dois grupos de abelhas com relação ao grau de infestação em abelhas adultas, independentemente da localidade, os resultados mostraram que a *Varroa* encontrou melhores condições de desenvolvimento nas abelhas italianas em relação às africanizadas, sugerindo assim que a infestação da mesma deve estar relacionada tanto com o tipo racial de abelha como com a região climática. Neste mes

mo experimento, o autor observou que a taxa reprodutiva das fêmeas de *Varroa* em células de crias de operárias de abelhas africanizadas e européias varia com a estação do ano, sendo a primavera o tempo de ocorrência de um maior número de descendentes por fêmea adulta invadindo as células de cria de operárias. Em *Apis*

mellifera iberica, Flores Serrano *et al.* (2001) também observaram um comportamento higiênico sendo influenciado pela estação do ano ao comparar a resposta higiênica das abelhas no verão e inverno. Os autores comprovaram que durante o verão a taxa de limpeza das células de cria infestadas, foi superior quando comparada com a limpeza no inverno, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as estações. Pelo contrário, não ocorreu o mesmo quando considerou-se o comportamento de retirada do ácaro e reoperculação das células com a cria, o qual mostrou-se maior durante o período de inverno, existindo assim, claras diferenças quando comparou-se as respostas das abelhas entre as duas estações.

Em 1979, Message observou que as mudanças de algumas variáveis climáticas como a temperatura e a umidade relativa do ar, afetavam mais a eficiência do comportamento higiênico das colméias de Ribeirão Preto e Viçosa – MG. Essas variações comportamentais foram atribuídas a algum fator ambiental (provavelmente climático), visto que uma mesma colônia foi testada em dois diferentes locais, correspondendo portanto, ao mesmo genótipo testado em ambientes diferentes. Neste mesmo trabalho, o autor comparou o comportamento higiênico durante o dia e a noite e pôde verificar que as operárias apresentam a mesma eficiência neste comportamento em ambos os períodos, porém houve uma leve tendência deste comportamento ser mais eficiente em período diurno, talvez devido à necessidade de se obter células vazias e limpas para que sejam depositados mel e pólen, ou além da postura da rainha.

Como climas tropicais são muitas vezes caracterizados por alta umidade, Kraus & Velthuis, (1997) examinaram o impacto dos altos níveis de umidade relativa (UR) sobre a reprodução do parasita em células de crias de operárias. Os favos de cria contendo as células infestadas foram mantidos em uma incubadora, onde a UR foi cuidadosamente controlada. Os autores concluíram que houve uma diferença significativa na porcentagem de reprodução das fêmeas de *Varroa destructor*, sendo

que estas reagiram muito sensivelmente a altas taxas de UR e quase nunca se reproduziram em níveis acima de 80% de UR.

No que diz respeito à raça da abelha infestada, Moretto & Mello Jr. (1999) verificaram que esta é de crucial importância para o desenvolvimento da varroatose, uma vez que observaram que o grau de infestação foi maior em abelhas italianas do que em abelhas africanizadas. Os resultados encontrados neste experimento vêm ao encontro àqueles obtidos anteriormente por Moretto *et al.* (1993) que também encontraram um baixo grau de infestação da *Varroa* entre abelhas africanizadas em colônias que continham ambas espécies (africanizadas e italianas). Posteriormente, resultados semelhantes também foram reportados por Guerra Jr. *et al.* (2000). De acordo com Moretto *et al.* (1993), isto é consequência da capacidade defensiva dessas abelhas contra o parasita.

O modo pelo qual as abelhas adultas livram-se do ácaro no momento em que são infestadas, bem como estas livram as crias da infestação do parasita, também já foram alvos de estudos. Moretto *et al.* (1991; 1993) observaram que as abelhas africanizadas tornaram-se agitadas imediatamente após terem sido inoculadas com o ácaro *Varroa destructor*, já nas abelhas italianas, os movimentos foram menos freqüentes apresentando uma menor taxa de remoção quando comparada às africanizadas.

Em um estudo com ácaros coletados do fundo de colônias de abelhas africanizadas, Corrêa-Marques (1996) notou a ocorrência de mutilações em várias partes do corpo destes, indicando possíveis ataques pelas operárias. Anteriormente, Boecking & Drescher (1991) já haviam levantado esta hipótese quando também realizaram coletas de vários ácaros mortos no fundo de colônias de *Apis mellifera* e verificaram que estes estavam injuriados. Este fato foi comprovado mais tarde por Guerra Jr. (2000) quando obteve êxito e conseguiu registrar um ácaro sendo removido de uma célula de cria infestada. O autor notou que a operária capturou o parasita com a mandíbula e o jogou para fora da célula.

Além da condição climática e raça da abelha infestada, o fator alimento também pode exercer certa influência na taxa de reprodução das fêmeas de *Varroa destructor*. Em experimentos conduzidos por Moretto *et al.* (1996; 1997) em abelhas africanizadas *Apis mellifera* os autores determinaram o efeito do suprimento de pólen e mel na habilidade reprodutiva do ácaro, e verificaram que os três parâmetros

reprodutivos estudados (reprodução total, reprodução efetiva e porcentagem das fêmeas férteis) foram positivamente correlacionadas com o pólen armazenado. Em contraste, nenhuma correlação foi detectada entre a quantidade de mel e a reprodução da *Varroa* em células de cria de operárias. Anteriormente, Moretto (1993) já havia observado este fato, mostrando que um maior fluxo de pólen possibilitou um maior percentual de fêmeas com descendentes em relação a um período de menor fluxo. Já no ano de 2000, Janmaat & Winston concluíram que a influência do pólen estocado na colônia e a infestação da pupa pelo ácaro *Varroa destructor* em colônias de *Apis mellifera* exerceu influência na longevidade e idade de forrageamento das operárias. De acordo com esses autores, as operárias criadas em colônias com baixo estoque de pólen iniciaram o forrageamento em uma idade mais jovem e tiveram um ciclo de vida mais curto do que operárias criadas em colônias com alta disponibilidade de pólen. Similarmente, operárias iniciaram o forrageamento mais cedo e tiveram um menor ciclo de vida quando foram infestadas com o ácaro *Varroa destructor* enquanto pupas.

O número de parasitas que invadem uma célula de cria pode influenciar de forma significativa no comportamento higiênico. Isto foi verificado por Boecking & Drescher (1991) quando em seus experimentos introduziram até 2 ácaros em células de cria de *Apis mellifera* e verificaram que estas células infestadas foram detectadas pelas operárias higiênicas em vários graus. Os autores puderam observar que a resposta de remoção aumentou de acordo com a taxa de infestação, concluindo portanto que a intensidade de remoção das colônias está significativamente correlacionada com o nível desta infestação. Rath & Drescher (1990) já haviam notado este mesmo comportamento em *Apis cerana* quando igualmente infestaram algumas células com 2 ácaros e verificaram que em 24 horas as abelhas removeram as crias das células duplamente infestadas a uma porcentagem mais alta do que a cria unicamente infestada. Posteriormente, este mesmo fato foi verificado por Flores *et al.* (1998) em *Apis mellifera ibérica* e Guerra Jr. (2000) em operárias italianas e africanizadas, indicando que o incremento da invasão tende a aumentar a porcentagem de remoção de células de operárias infestadas artificialmente com o parasita. De acordo com Boecking & Drescher (1994), o próprio cheiro do ácaro dentro das células com crias pode ser um fator estimulante para a percepção das abelhas, entretanto, Aumeier & Rosenkranz

(2001) verificaram que em colônias de *Apis mellifera*, o cheiro do parasita parece ter pouca importância como um sinal de reconhecimento para o desencadeamento do comportamento higiênico.

De qualquer forma, acredita-se que outras pesquisas abordando vários aspectos do comportamento higiênico deverão ainda ser realizadas na tentativa de se descobrir como este realmente se processa nas abelhas *Apis mellifera*, visto que além de ser um comportamento interessantíssimo, é um mecanismo de defesa natural desta espécie.

2. OBJETIVOS

Conforme se constata na literatura, a existência de muitos trabalhos sobre o comportamento higiênico ainda pouco se sabe até o momento como se processa o comportamento higiênico dentro de uma colônia, ou seja, a seqüência das atividades executadas pelas abelhas, a freqüência de cada atividade, o tempo de execução das mesmas, o número de abelhas envolvidas, etc. Isto é devido ao fato de que a maioria dos trabalhos efetuados sobre o comportamento higiênico se baseiam apenas na conseqüência do mesmo, cujo resultado final vai levar à desoperculação das células e remoção das crias que estavam mortas, doentes ou infestadas. Assim, duas perguntas principais tornaram-se o foco deste trabalho:

O que realmente ocorre, e como as operárias se comportam dentro de uma colônia quando se realiza um teste de comportamento higiênico?

Além do fator genético, existem outros fatores que contribuem para uma menor ou maior porcentagem de crias removidas no período de 24 horas, o que conseqüentemente a classificaria em higiênica ou não higiênica?

Desse modo, com a finalidade de fornecer conhecimentos essenciais para a continuidade dos trabalhos sobre este assunto, o presente trabalho foi desenvolvido no sentido de se estudar detalhadamente como se processa o comportamento higiênico das abelhas africanizadas. Assim, este trabalho teve dos seguintes objetivos específicos:

- ✓ Verificação das atividades desenvolvidas pelas operárias durante o processo de remoção da cria, bem como as idades em que as mesmas realizam tais atividades;

- ✓ Estudar minuciosamente o comportamento higiênico nas células de cria, tendo como foco os mínimos detalhes deste comportamento, quais sejam: quantas e quais abelhas estão envolvidas na realização do mesmo, se existe uma divisão de tarefas entre as operárias ao executarem o comportamento de limpeza de uma célula de cria, qual atividade as operárias desenvolvem com maior frequência, se operárias com idades diferentes removem a cria com a mesma eficiência.

- ✓ Verificar se existem variações no comportamento higiênico em períodos diurno e noturno;

- ✓ Verificar se existem diferenças comportamentais com relação à remoção da cria pelas operárias em 4 diferentes situações, ou seja: em favos novos, em favos velhos, pelo método de perfuração e método do congelamento.

Para a obtenção dos objetivos, salienta-se que todos os parâmetros supra citados são verificados tanto nas colônias higiênicas quanto nas não higiênicas para efeito comparativo.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Local de trabalho e espécies utilizadas

Para a escolha do material a ser estudado, inicialmente, foram realizados testes de comportamento higiênico (teste de perfuração) seguindo a mesma metodologia utilizada por Gramacho (1995; 1999), em 50 colônias de abelhas africanizadas existentes no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Após a realização dos testes, foram selecionadas 3 colônias de maior porcentagem de remoção da cria (mais de 90% de remoção) e 3 colônias de menor porcentagem de remoção da cria (menos de 20% de remoção), as quais serviram como doadoras de operárias recém nascidas para serem introduzidas nas colméias de observação.

Os experimentos para coleta de dados referente aos comportamentos individuais foram desenvolvidos em uma sala de observações situada no mesmo departamento, e para tal, foram utilizadas 2 colméias de observação com paredes de vidro e capacidade para 1 quadro sendo uma colméia para colônia higiênica e uma colméia para a colônia não higiênica.

3.2 - Montagem das colméias de observação

A colméia de observação utilizada constou de uma armação de madeira medindo 53 cm X 53 cm x 34 cm, construída para receber um quadro de uma colméia modelo Langstroth. As paredes laterais da colméia foram constituídas por lâminas de vidro transparente, removíveis e com 3 mm de espessura. Na parte superior da colméia foi feito um orifício, sobre o qual foi colocado, periodicamente, um frasco de vidro contendo alimento (xarope de água com açúcar), o qual foi fornecido às abelhas de acordo com a necessidade da colônia. Na abertura frontal da colméia, foi inserido um tubo de polietileno transparente, o qual por sua vez foi inserido em um orifício feito na parede da sala de observações atravessando-a, dan-

do livre acesso ao exterior às abelhas que estavam dentro da colméia de observação.

Inicialmente, cada colméia de observação consistiu de 1 quadro de cria contendo abelhas adultas, não marcadas, de várias idades (para que a colônia mantivesse sua estrutura normal de idade), alimento (pólen e mel) e uma rainha fecundada e em postura. Foi permitido à rainha a realização das posturas, entretanto, não se permitiu a emergência da prole oriunda destas posturas, ao invés disso, os quadros de cria onde ocorreram estas posturas, foram trocados, a cada 15 dias, por outros quadros contendo apenas ovos, larvas e alimento, garantindo assim, um maior número possível de abelhas marcadas dentro da colméia.

Após a montagem das colméias de observação e a adaptação da população ali existente, foi iniciado o processo de marcação de abelhas. Para tal, freqüentemente foram retirados quadros de cria operculada de operárias com idade aproximada de 18 a 19 dias e transferidos para caixas de madeira especiais (gaiolas) medindo 46 cm x 25 cm x 7cm, com paredes coberta por uma malha de metal bastante fina e mantidos dentro de uma estufa com temperatura e umidade controladas em torno de $\pm 34^{\circ}\text{C}$ e 70%, respectivamente. Para a marcação de abelhas, foram utilizados indivíduos de 6 colônias, sendo 3 higiênicas e 3 não higiênicas, garantindo assim que dentro da colméia de observação existissem abelhas oriundas de 3 colméias diferentes, porém da mesma linhagem higiênica ou não higiênica.

Diariamente, um total de 400 operárias (200 higiênicas e 200 não higiênicas) recém nascidas foram marcadas com etiquetas numeradas e coloridas fixadas no tórax (Figura 3) para identificação individual e introduzidas dentro das colméias a serem observadas. Vale ressaltar que as combinações de cores das etiquetas permitiram a marcação de até 5.000 abelhas para introdução dentro de cada colméia, e destas, um total entre 70 a 80% foram mantidas no quadro de cria das colméias a serem observadas.

Embora uma boa quantidade de abelhas marcadas fossem introduzidas diariamente nas colméias de observação, devido à manipulação constante para a troca de quadros, algumas vezes houve uma queda na população das mesmas, e para que o tamanho populacional fosse mantido constante dentro da colméia evitan-

do assim o que ocorresse um processo enxameatório (abandono da colméia pelas abelhas), pelo menos a cada dez dias foram introduzidas 100 abelhas não marcadas oriundas das mesmas colônias.



Figura 3 – Operárias recém nascidas numeradas para identificação individual

Para que houvesse uma melhor aceitação pelas operárias já existentes na colméia de observação, antes da introdução, as recém nascidas marcadas foram mantidas inicialmente em uma câmara de retenção adaptada na parte superior da própria colméia por um período de 12 a 16 horas. Esta câmara consiste de uma abertura feita na parte superior da colméia, na qual foi colocada uma tela de proteção (Figura 4a) que mantém as abelhas recém nascidas separadas daquelas já existentes na colméia, porém, esta separação não é completa, visto que a tela permite um contato entre as operárias mais velhas de dentro da colméia e as mais jovens que estão dentro da câmara (Figura 4b) para a realização de trofaláxis, bem como a eliminação de qualquer odor diferente ao das abelhas, como por exemplo, o cheiro da cola utilizada ou da própria mão.

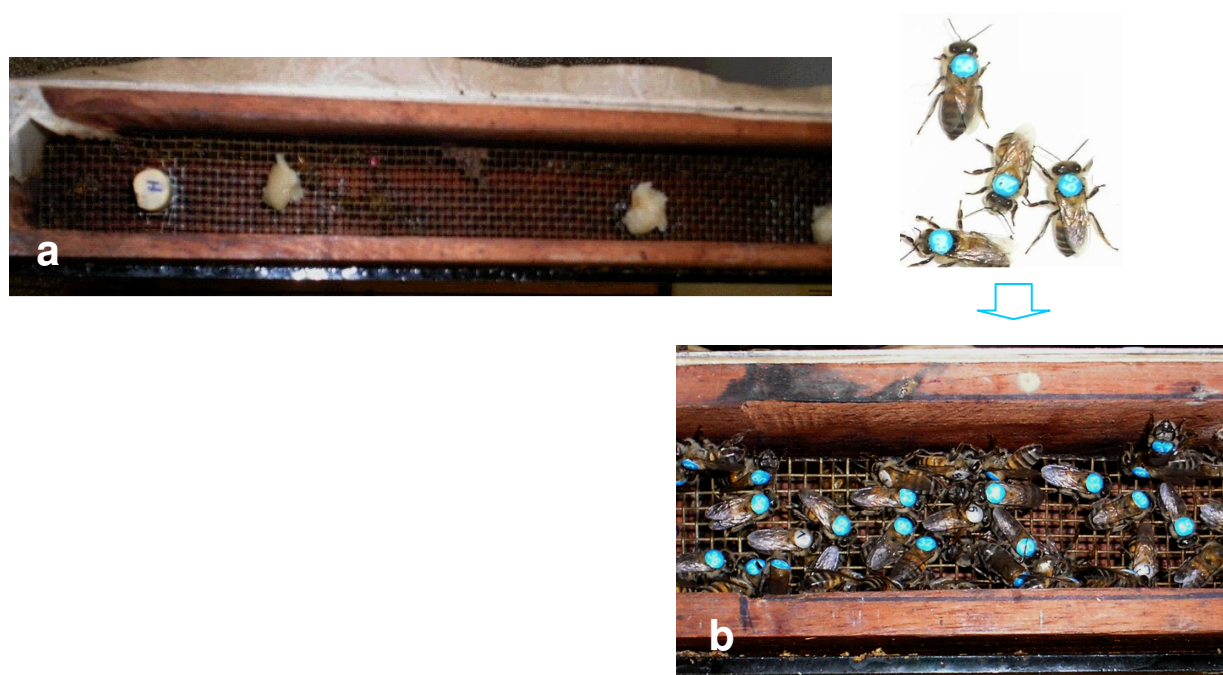


Figura 4 – (a) vista da câmara de retenção adaptada na colméia de observação; (b) operárias recém nascidas já introduzidas na câmara

3.3 - Equipamentos utilizados e técnicas de filmagem

Para o estudo das atividades envolvidas no comportamento higiênico foram utilizadas técnicas de videofilmagens. Esta é uma valiosa ferramenta que pode ser utilizada no estudo de comportamentos complexos ou pouco freqüentes, a qual possibilita geralmente detectar os atos relevantes de um comportamento e a seqüência em que os mesmos se apresentam (Palácio, 2005). Foram utilizadas duas câmeras de vídeo Panasonic, S-VHS, modelo NV-9000 e dois monitores de vídeo coloridos. Acoplados aos monitores e às câmeras foram utilizados aparelhos de videocassete estéreo (Figura 5a).

Para evitar distúrbios nas colméias durante as filmagens, as mesmas foram cobertas com papel celofane vermelho (Figura 5b), onde apenas a área a ser filmada foi exposta à luz, e a parte traseira da colméia (a qual não estava sendo filmada) foi coberta com um papel cartão preto. A iluminação desta área foi realizada através de aparelhos com fonte de luz fria (1 em cada colméia), uma vez que a ilumina

nação adequada foi de extrema importância, devido ao fato da abelha africanizada abandonar com muita facilidade a colméia caso qualquer distúrbio aconteça.

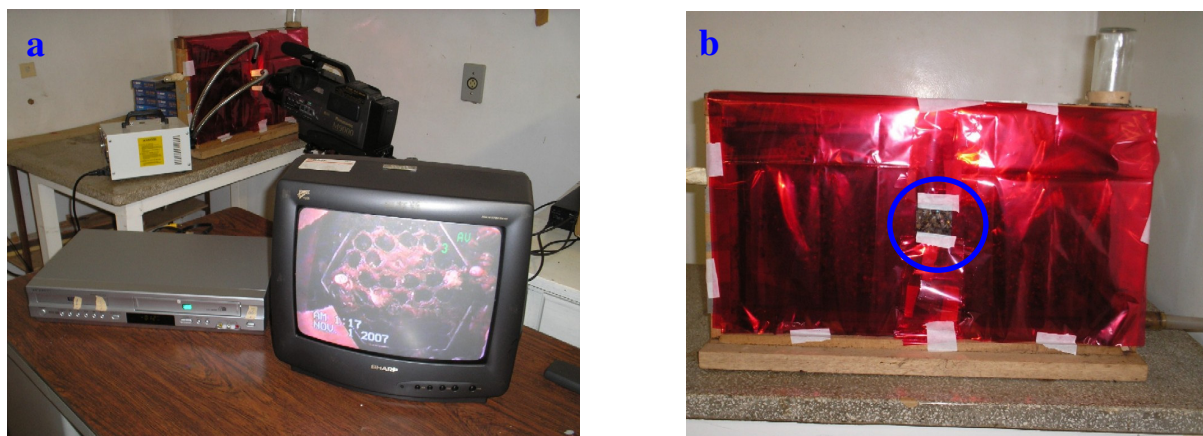


Figura 5 – Equipamentos utilizados para a filmagem dos comportamentos individuais relacionados ao comportamento higiênico: **(a)** vista geral da sala de observações e equipamentos de filmagem **(b)** colméia de observação coberta com papel celofane. Verifica-se (na área circulada) que somente a região a ser filmada permaneceu descoberta

3.4 - Diferentes situações em que foi verificado o comportamento higiênico

Objetivando verificar se existem diferenças comportamentais por abelhas africanizadas quanto à remoção da cria morta, foram criadas 4 situações diferentes, a saber:

3.4.1 - Utilização de favos novos e favos velhos no comportamento higiênico

Este experimento baseou-se na metodologia utilizada por Message (1979), na qual foi utilizado um suporte de metal em forma de moldura de 12 cm X 5 cm (Figura 6a). Dentro deste suporte foi embutido um pedaço de favo contendo cria operculada (Figura 6b), que por sua vez, foi introduzido no favo de cria a ser levado para a colméia de observação (Figura 6c).

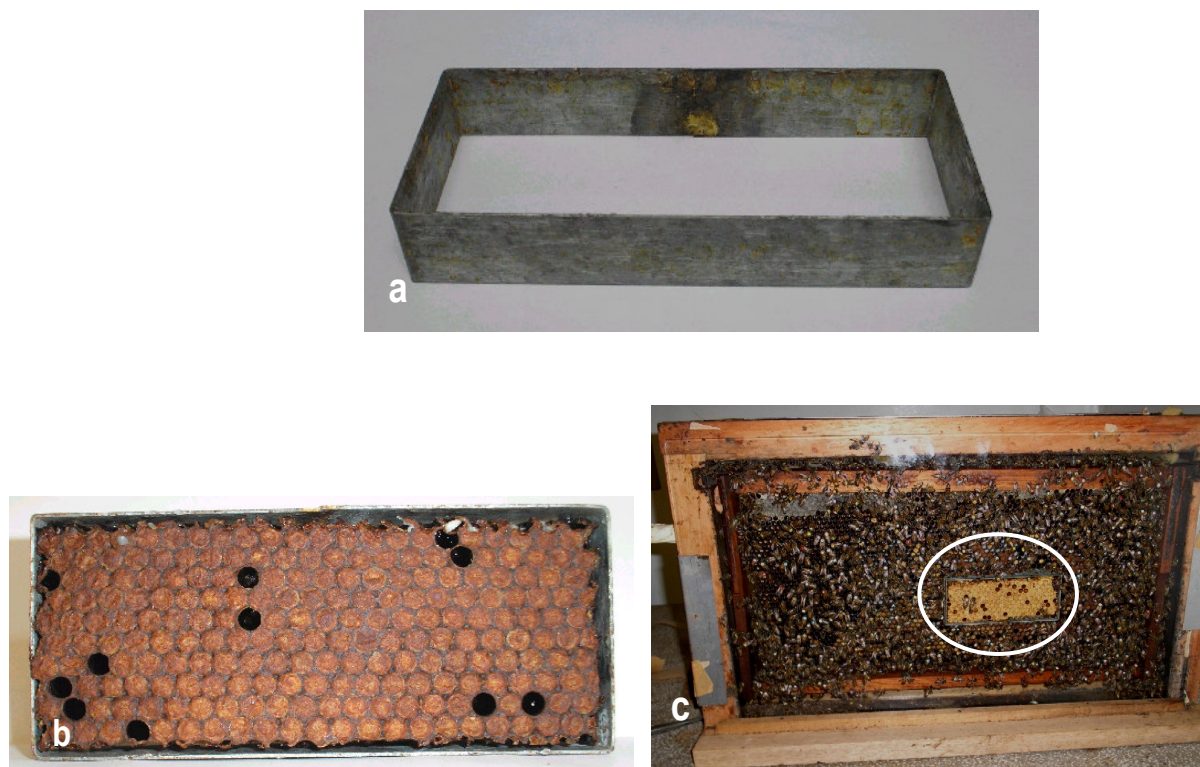


Figura 6 – Favo utilizado para filmagens dos comportamentos individuais. (a) favo suporte de metal (b) pedaço de favo recortado e montado no suporte (b) favo suporte embutido no quadro de crias e já introduzido na colméia de observação (área circutada)

Os favos novos foram obtidos de enxames recém capturados na natureza e os favos velhos foram obtidos de colônias existentes no apiário do Departamento. Os favos suportes novos apresentavam uma coloração bastante clara de tonalidade amarela bem clara a bege (Figura 7a) e de consistência muito frágil. Assim como Message (1979) também foi percebido essa consistência quando do corte dos mesmos para a montagem dos favos suportes, tendo sido requerido um cuidado bastante especial para evitar que muitas células fossem danificadas, e quando isso ocorria, as crias ali existentes foram removidas com o auxílio de um pinça, de modo que somente as células cujos opérculos estavam intactos é que foram utilizadas no experimento. Os favos suportes velhos apresentavam uma coloração mais escura, de tonalidade marrom (Figura 7b) e eram de consistência mais rígida que o anteriormente citado.



Figura 7 – Favos suportes inseridos nos quadros de cria a serem levados para as colméias de observação. **(a)** favo novo **(b)** favo velho.

Depois de inseridos nos quadros de cria, os favos suporte foram levados às colméias de observação conforme já exposto acima e feito isso, foi iniciado o experimento.

Nesta situação, foi utilizado o método de perfuração de Newton & Ostasiewski (1986), testado e modificado por Gramacho & Gonçalves (1994), o qual consta na perfuração, por intermédio de um alfinete entomológico nº 1, de crias operculadas de operárias com idade aproximada de 10 a 14 dias. A cada dia a ser observado, foi escolhida uma área contendo 40 células de cria operculadas, sendo que 20 foram submetidas ao tratamento de perfuração e 20 serviram como controle. Depois de perfuradas as células de cria, deu-se início ao processo de filmagem que teve duração de 24 horas.

Para garantir uma melhor visualização das abelhas trabalhando no favo que estava sendo filmado, o favo suporte foi inserido parcialmente no quadro de cria (Figura 8) de modo que o espaço existente entre o vidro colméia de observação e o próprio favo suporte, fosse de apenas 1 abelha evitando assim a sobreposição de duas ou mais operárias sobre a célula que estava sendo observada.



Figura 8 – Vista lateral do favo suporte parcialmente inserido no quadro de cria

3.4.2 – Crias mortas pelo método do congelamento

Para este experimento, também foram utilizados favos suportes de metal porém com formato hexagonal (Figura 9a). Após a inserção de um pedaço de favo de cria no suporte, este foi levado ao freezer por um período de 24 horas para que as crias fossem mortas pelo método do congelamento. Passado este tempo, o pedaço de favo foi retirado do congelador e deixado à temperatura ambiente por no mínimo 2 horas para que houvesse a secagem dos opérculos, bem como o descongelamento das crias que foram congeladas. Em cada quadro de cria foram inseridos dois favos suporte hexagonais, um servindo de tratamento contendo as crias mortas e outro servindo como controle (Figura 9b). Do mesmo modo que no experimento anterior, após a inserção dos favos suporte hexagonais, os quadros de cria foram levados às colméias de observação e deu-se início à filmagem dos comportamentos.

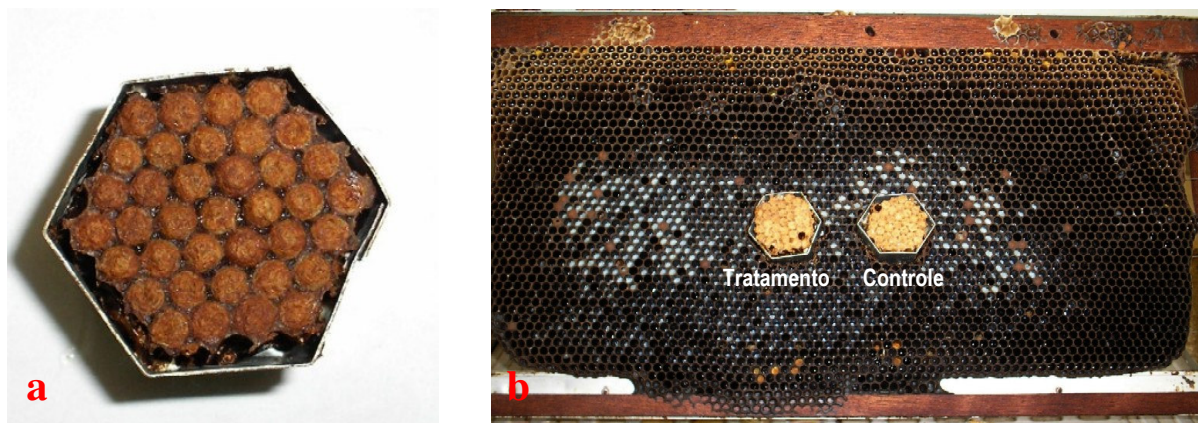


Figura 9 – Favos suportes hexagonais utilizados no experimento de crias mortas pelo método de congelamento. **(a)** pedaço de favo inserido no suporte **(b)** favos inseridos no quadro de cria. Verifica-se 1 favo suporte tratado e 1 favo suporte controle

3.4.3 – Comportamento higiênico em períodos noturnos e diurnos

Neste experimento, foi verificado se o comportamento higiênico por parte das operárias tem a mesma eficiência em períodos diurnos quando algumas saem a campo para forragear, ou se este comportamento é mais eficiente em períodos noturnos quando todas as abelhas estão confinadas dentro da colônia, e se há inclusive a participação destas campeiras no processo de remoção da cria.

Este experimento foi realizado nas diferentes situações já relatadas (isto é, favos velhos e favos novos, crias mortas por congelamento e crias mortas por perfuração), e para tal, a metodologia aqui utilizada, foi a mesma também mencionada nos itens anteriores.

Para se averiguar se há diferenças comportamentais, os favos foram tratados em diferentes períodos do dia sempre 24 horas anteriormente às observações, sendo que para a comparação do comportamento em períodos diurnos estes foram tratados entre as 8 e 9 horas da manhã e em períodos noturnos, o tratamento se deu entre as 17:30 e 18:30 horas, garantindo assim que fosse verificado o trabalho das operárias no comportamento higiênico nos dois períodos.

3.5 – Análise estatística

Antes da aplicação do teste de comparação de médias, os dados foram analisados quanto a sua normalidade. Quando os dados encontravam-se com distribuição normais, as comparações par a par de médias foram analisadas através do Test-t, em caso negativo (não normais) foi aplicado o Test Mann-Whitney.

No caso de distribuição normal, para a comparação de três ou mais grupos aplicou-se o teste ANOVA, e quando não o ANOVA on Ranks.

Quando o ANOVA mostrou diferenças, os comportamentos par a par foram feitos o teste de Dunn's.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações do comportamento higiênico geralmente são feitas a partir de observações das células com crias operculadas de operárias, diretamente no favo, 24 ou 48 horas após a morte das crias pelo método de perfuração, ou congelamento, respectivamente. Estudos comprovam que não existem diferenças nos resultados entre os dois métodos testados (Gramacho, 1995) no entanto, a eficácia na remoção das crias mortas em ambos métodos, certamente depende do tempo em que o teste permanece em execução (Pires *et al.*, 2006). De qualquer maneira, independente do tipo de teste realizado, nenhum tipo de informação a respeito do comportamento das abelhas durante o processo de remoção da cria é obtido. Através de estudos detalhados do comportamento higiênico realizado por Gramacho (1999), foi possível a determinação das principais etapas envolvidas no processo de remoção da cria morta. Foi verificada a ordem de seqüência das atividades das abelhas, desde a pontuação do opérculo, desoperculação da célula até a limpeza total das células que continham tais crias, entretanto, ainda assim, algumas questões com relação a como se processa o comportamento higiênico dentro de uma colônia permaneceram obscuras.

No presente estudo, foi possível o esclarecimento de algumas destas questões, uma vez que foram realizadas um total de 11.064 horas de filmagens, sendo 5.568 horas de filmagens para colméias higiênicas e 5.496 horas para a colméias não higiênicas.

Os resultados obtidos serão apresentados em duas partes. A primeira tratando de maneira geral os comportamentos, visto que eles foram comuns para ambos grupos de colméias sem diferenciação nos 3 tratamentos utilizados, isto é, nos favos velhos, favos novos e favos contendo cria morta pelo método do congelamento, os quais foram chamados de favos congelados. A segunda parte tratando de forma individual estes comportamentos em ambos períodos, diurno e noturno. Para a análise dos resultados que serão apresentados na primeira parte, os seguintes dados foram registrados:

- Idades das operárias mais jovens e mais velhas que realizaram o comportamento;
- Frequência de visitas pelas operárias de acordo com as idades em cada tratamento, ou seja, em que idades as operárias realizaram o comportamento com mais frequência;
- Concentração geral (nos três tratamentos juntos) das idades em que realizam os cinco comportamentos;
- Total de visitas que cada um dos três tratamentos recebem das operárias para a realização dos comportamentos.

Além disso, outros parâmetros temporais relacionados a todo o processo de remoção da cria desde o momento da introdução do favo até o final da remoção (ou o período de 24 horas no caso de remoção parcial) serão apresentados.

4.1 – Idade das abelhas que participaram do comportamento higiênico

Em muitos insetos sociais, as operárias realizam diferentes tarefas em diferentes períodos de suas vidas (Wilson, 1974 *in* Tofilski, 2002). Dentre as várias tarefas desenvolvidas pelas abelhas do gênero *Apis*, uma de grande importância relaciona-se com a limpeza do ninho. Estas tarefas de limpeza podem ser divididas em dois grupos: preparação do alvéolo (primeira atividade que as operárias participam logo após emergirem) e serviço de sanidade e higiene geral do ninho (Winston, 2003), onde

está incluído o comportamento de limpeza das células de cria, ou comportamento higiênico propriamente dito. Algumas pesquisas relacionadas a este assunto, têm dado enfoque em qual período da vida (idade) as abelhas realizam tal tarefa.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que tanto no período noturno, quando no período diurno, durante o processo de remoção da cria, ou comportamento higiênico, nas três situações analisadas (favo novo, favo velho e favos congelados) as abelhas realizaram cinco comportamentos diferentes sem muita distinção de idade a saber:

a) Inspeção pré desoperculação

Antes de iniciar as etapas que compreendem o comportamento higiênico, algumas operárias realizam um comportamento de inspeção pré desoperculação, o qual consistiu em tocar rapidamente com as antenas o opérculo da célula que continha a cria morta.

Os resultados obtidos indicaram que em ambas colméias (higiênica e não higiênica) e nas três situações analisadas, isto é, favos novos, favos velhos e favos congelados as operárias o realizaram em idades distintas (figuras 10 e 11).

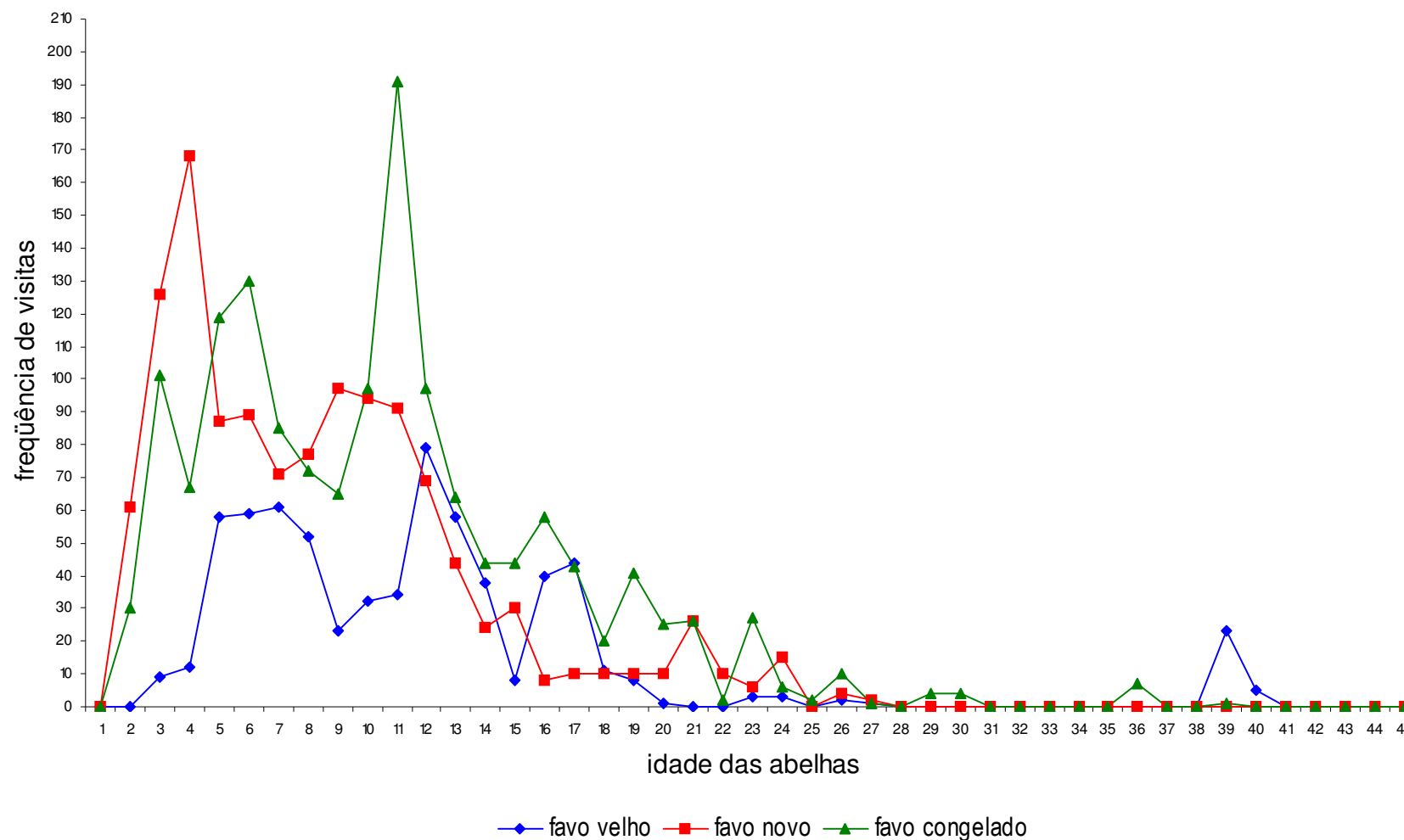


Figura 10 - Comparação da frequência de visitas de operárias que realizaram comportamento de pré inspeção nas células de cria na colméia higiênica

Como pode ser verificado, tanto na colméia higiênica quanto na colméia não higiênica as operárias que realizaram a atividade de pré inspeção da células de cria apresentavam idades em geral entre 2 e 40 dias com maior frequência de visitas nos favos novos e congelados, porém, parecem não ter preferência pelo tipo de tratamento, uma vez que as idades para a realização deste comportamento estiveram bem distribuídas nas três situações. As abelhas higiênicas com 2 dias de idade (mais jovens) foram vistas trabalhando apenas nos favos novos e congelados, já a mais jovem vista nos favos velhos contava 3 dias de idade e a mais velha, com 40 dias.

Analisando-se as maiores frequências de visitas em cada idade, verificou-se que estas se deram por abelhas de idades diferentes nos três tratamentos, ou seja, 12 dias nos favos velhos (79 visitas), 4 dias nos favos novos (168 visitas) e 11 dias nos favos congelados (191 visitas). Verificou-se que mesmo havendo esta variação no número máximo de visitas, de um modo geral, as maiores concentrações de abelhas pré inspecionando as células de cria operculadas ocorreram entre aquelas que estiveram com idades entre 3 e 17 dias, havendo uma oscilação desta frequência para as operárias com idades entre 18 e 27 dias. As operárias que estiveram presentes com idade superior a estas, isto é, 29, 30 e 36 dias de vida foram vistas apenas trabalhando nos favos congelados e somente duas operárias com idade ainda mais avançada (39 e 40 dias) foram encontradas pré inspecionando células nos favos velhos.

Ao analisar os três tratamentos quanto ao número total de visitas pelas operárias higiênicas, verifica-se que este foi maior nos favos congelados, os quais receberam um total de 1.483 visitas, seguidos dos favos novos com um total de 1.239 visitas e por último os favos velhos somando 664 visitas.

A colméia não higiênica não apresentou diferenças tão marcantes com relação à idade das operárias que realizaram esta tarefa nos três tratamentos, no entanto, constatamos também menor frequência de visitas nos favos velhos. Foi observado que as operárias mais jovens também foram aquelas de 2 dias de idade, no entanto, na colméia não higiênica elas foram vistas trabalhando nos três tratamentos, assim como na colméia higiênica a operária mais velha (33 dias) também trabalharam somente nos favos velhos (Figura 11).

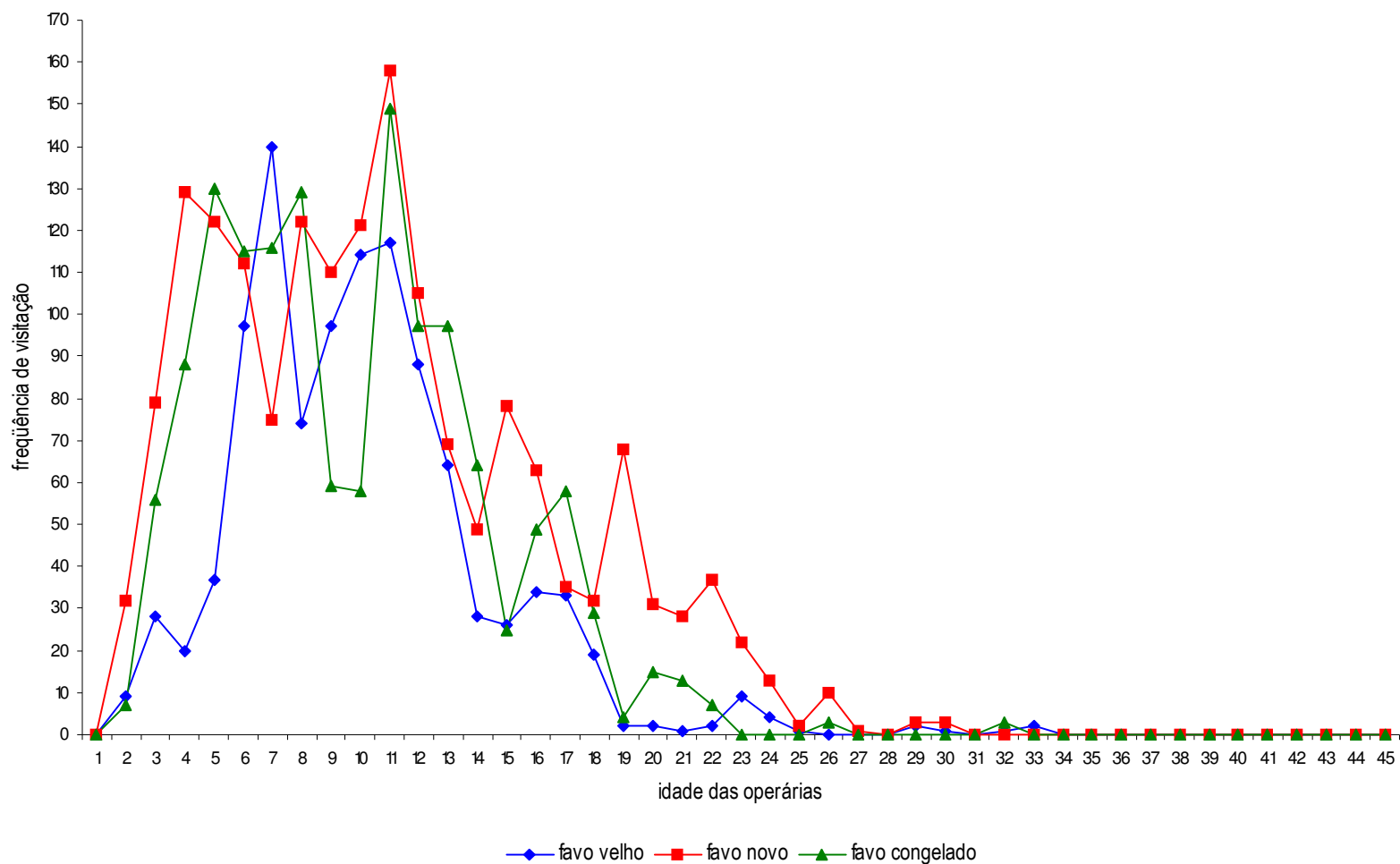


Figura 11 - Comparação da frequência de visitas de operárias que realizaram comportamento de pré inspeção nas células de cria na colméia não higiênica

Analisando-se a figura 11, é possível verificar que as maiores freqüências de visitas por grupos de operárias de acordo com a idade, ocorreram naquelas com idade de 7 dias nos favos velhos, os quais receberam até 140 visitas destas operárias e 11 dias nos favos novos e congelados totalizando 158 visitas para os favos novos e 149 visitas para os favos congelados. Ressalta-se que a maior freqüência de visitas nos favos congelados deu-se entre operárias com idade entre 5 e 11 dias de vida. No entanto, ao se compararem as figuras 10 e 11 constata-se que a maior freqüência de visitas aos favos congelados tanto pelas abelhas higiênicas quanto pelas abelhas não higiênicas deu-se por abelhas com 11 dias de vida, embora na colméia não higiênica esta freqüência mostrou-se menor quando comparada com a colméia higiênica.

Com relação à maior concentração de abelhas ou freqüência de visitas de abelhas que pré inspecionaram as células operculadas nos três tratamentos na colméia não higiênica, isto verificou-se entre as operárias com idades de aproximadamente entre 3 e 12 dias, tanto nas higiênicas quanto nas não higiênicas, havendo posteriormente um declínio no número de visitas nas demais idades. Como já relatado anteriormente, na colméia higiênica foram vistas abelhas de até 40 dias de idade, ao passo que na colméia não higiênica não foram observadas abelhas com mais de 33 dias pré inspecionando células em nenhum dos três tratamentos.

Em estudos realizados sobre o comportamento higiênico na presença de cria afetada pelo fungo *Ascosphaera apis*, Palácio (2005) também encontrou uma maior dispersão de operárias inspecionando células nas colméias não higiênicas quando comparada com colméias higiênicas, embora a autora tenha considerado como atividade de inspeção tanto visitas às células operculadas quanto as células já desoperculadas.

No que diz respeito ao número total de visitas que os tratamentos receberam, verificou-se que na colméia não higiênica, os favos congelados também receberam menos visitas (1.371 visitas) do que na colméia higiênica, já nos favos novos e velhos o número total de visitas foi maior do que na colméia higiênica, ou seja, 1.052 e 1.709 visitas para os favos velhos e novos, respectivamente.

b) Introdução das antenas no interior da célula de cria

Logo após a célula ter sido perfurada, ou após a pontuação da mesma pelas operárias, algumas abelhas de distintas idades (higiênicas e não higiênicas) introduziam as antenas no interior da célula contendo a cria morta.

Na colméia higiênica, a idade das operárias que realizaram este comportamento nos favos velhos e novos tinham entre 2 e 40 dias de idade, sendo que as mais velhas vistas eram as mesmas operárias já observadas anteriormente realizando o comportamento de pré inspeção. Nos favos congelados as mais jovens observadas tinham 4 dias de idade e a mais velha (1 operária) apresentava 20 dias (Fiugra 12).

Verifica-se que a maior frequência de visitação com introdução das antenas foi registrada nos favos velhos, seguidos pelos favos novos com frequência 50% mais baixa. No favo congelado praticamente não ocorreu esse comportamento, registrando-se raros casos com algumas abelhas com 6 e 16 dias de vida, porém em baixíssima frequência (máximo de 13 visitas).

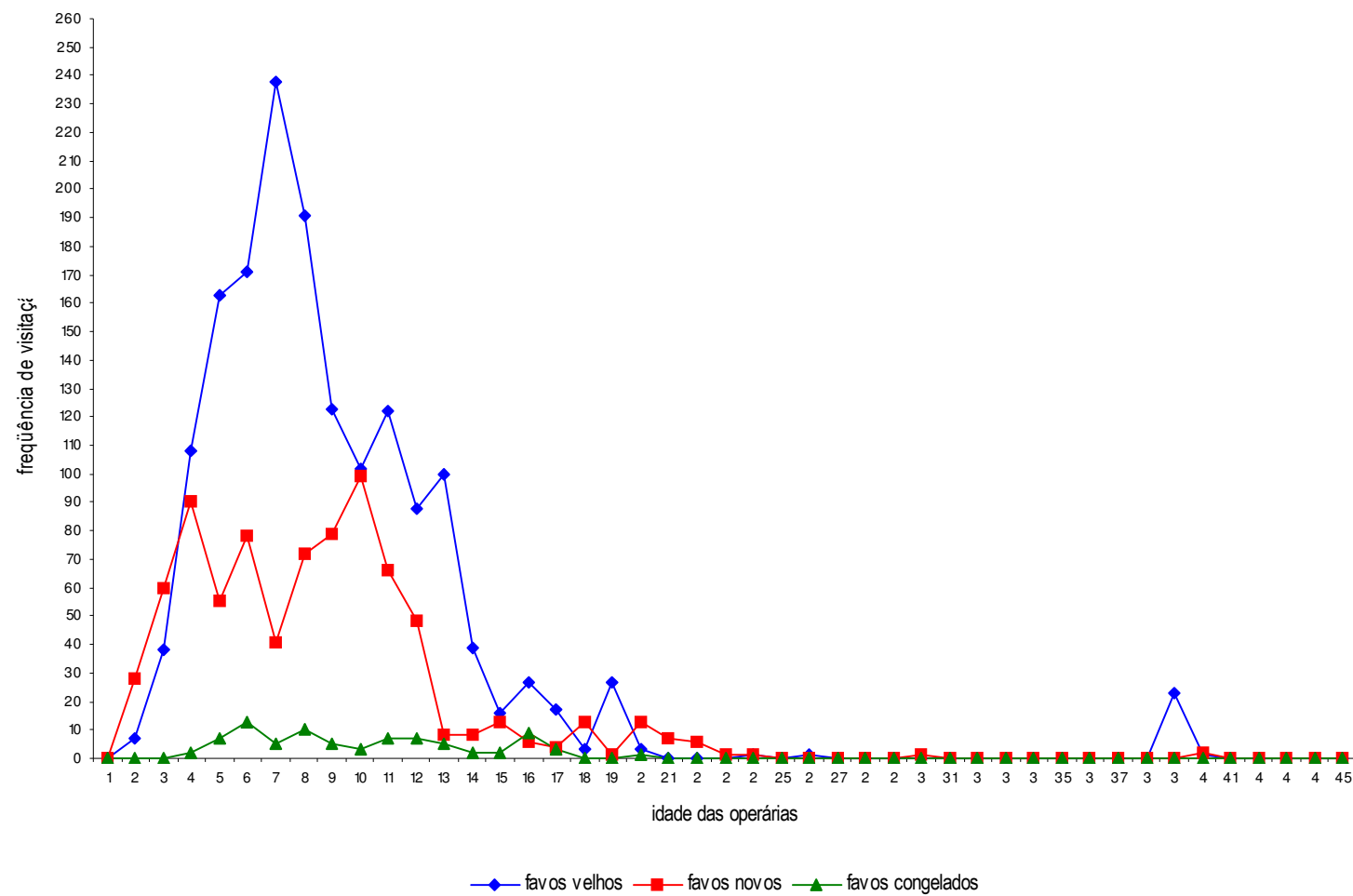


Figura 12 - Comparação da frequência de visitas de operárias que realizaram comportamento de introdução das antenas no interior das células de cria na colméia higiênica

Analisando-se a figura 12, é possível verificar ainda que nos favos velhos, uma maior frequência de visitas ocorreu entre as operárias com idades de 7 dias (238 visitas) e nos favos novos nas abelhas com 10 dias (99 visitas).

Ao se comparar o comportamento de pré inspeção da célula com o comportamento de introdução das antenas no interior das células de cria, constata-se que a maior frequência de abelhas higiênicas executando ambos os comportamentos ocorre aproximadamente na mesma faixa etária (2 e 20 dias de idade). No entanto, observa-se oscilações com redução até zero na frequência de visitas entre operárias que se encontravam com idades de 15 a 23 dias. Abelhas com idades de 24 a 38 dias de vida não apresentaram o comportamento de introdução das antenas em nenhum dos três tipos de favo, porém, ocorreu um caso raro de abelhas com 39 dias de vida que realizaram a introdução das antenas (aproximadamente 20 vezes) no interior das células de cria de favos velhos.

Quanto ao número total de visitas feitas pelas operárias com a introdução das antenas no interior das células de cria nas três situações, os favos velhos, receberam um total de 1.609 visitas, favos novos receberam 800 visitas e os favos congelados receberam apenas 81 visitas com introdução das antenas.

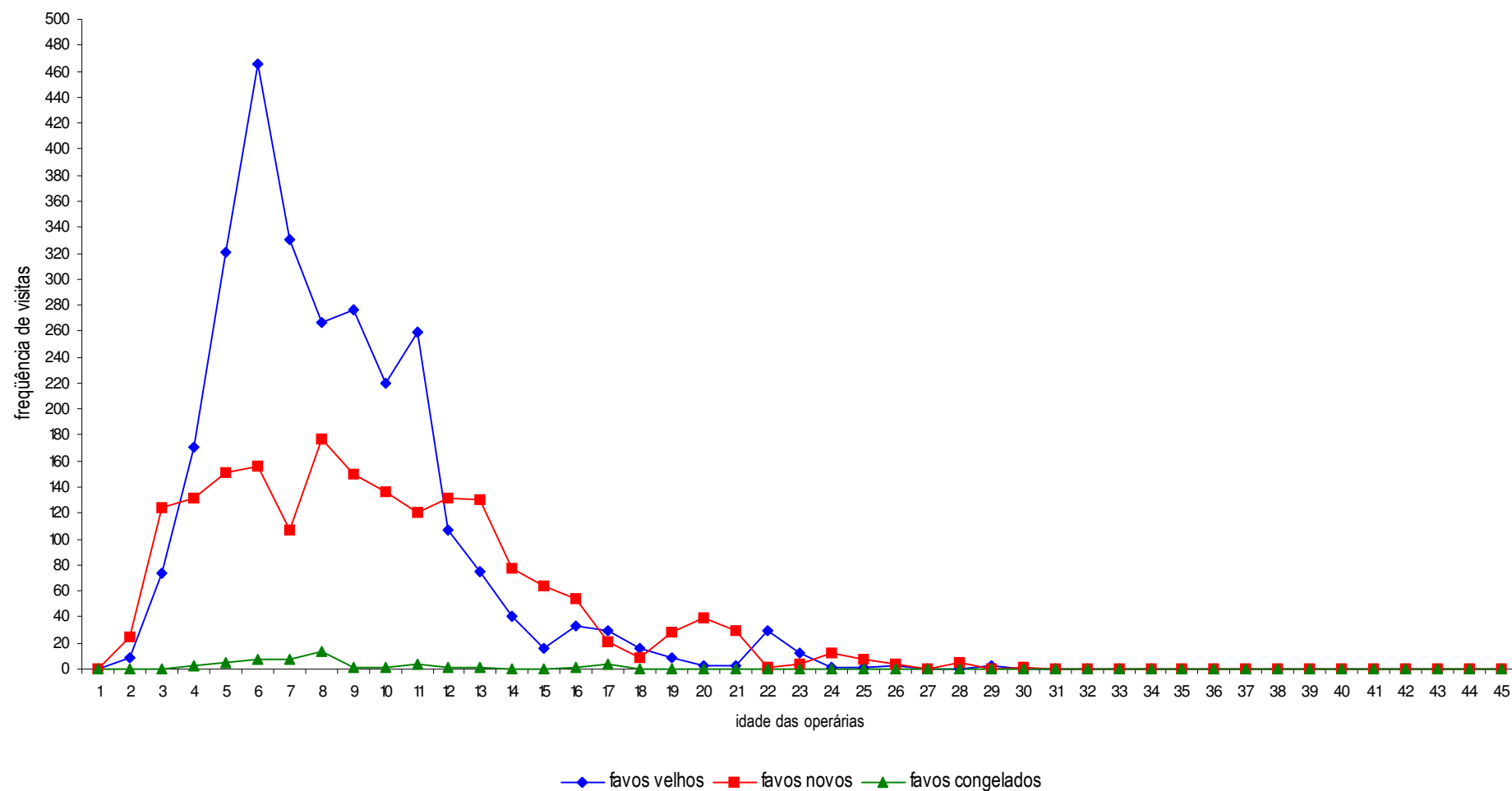


Figura 13 - Comparação da frequência de visitas de operárias que realizaram comportamento de introdução das antenas no interior das células de cria na colméia não higiênica

Com relação à faixa etária das operárias que introduziram as antenas no interior da célula de cria nas colméias não higiênicas, verificou-se que esta foi aproximadamente entre as operárias de 2 e 28 dias de vida (Figura 13), e igualmente à colméia higiênica, as mais jovens foram vistas trabalhando apenas nos favos novos e velhos. O mesmo fato observado na colméia higiênica, também ocorreu com as abelhas não higiênicas nos favos congelados onde praticamente não se observou o comportamento de introdução das antenas dentro da célula de cria (com raros casos de abelhas com 8 e com 17 dias de idade).

Através da figura 13, é possível constatar ainda que a maior frequência de visitas (por grupos de operárias) para introdução das antenas no interior das células de cria na colméia não higiênica, ocorreu com as operárias com idades de 6 dias nos favos velhos (total de 466 visitas) e idade de 8 dias nos favos novos e congelados, apresentando um total de 177 e 13 visitas, respectivamente.

De um modo geral verificou-se que a maior concentração de visitas das abelhas não higiênicas se observou entre as operárias com idade de 3 a 13 dias, ocorrendo um decréscimo no número de visitas por parte das abelhas com idades entre 14 a 26 dias. Nenhuma operária com 27 dias ou mais foi vista realizando o comportamento de introdução das antenas no interior das células de cria nos três tipos de favos.

Na colméia não higiênica, o número total destas visitas para introdução das antenas nos favos velhos foi maior quando comparada à colméia higiênica, ou seja, ele recebeu um total de 2.773, enquanto que os favos novos e congelados receberam 1.895 e 48 visitas, respectivamente.

Certamente, o ato de introduzir as antenas no interior das células de cria, pode ser considerado como um tipo de inspeção uma vez que ele evidencia a percepção da cria morta por parte das operárias, pois de acordo com Lambin *et al.*, 2005, os movimentos antenares funcionam como indicadores da detecção de odores em abelhas melíferas e segundo Gramacho (1999), após algum tempo de perfurada, ocorre a liberação de substâncias putrefatas, e isto conseqüentemente induz o desencadeamento do comportamento higiênico nas abelhas africanizadas *Apis mellifera*. Uma vez detectada a presença da cria morta ou doente através da inserção

das antenas no interior das células de cria, as operárias iniciaram então a segunda etapa do comportamento higiênico, que foi a desoperculação da célula de cria.

c) Desoperculação da célula contendo a cria morta

Os gráficos das figuras 14 e 15 apresentam as frequências de desoperculação das células de cria nos três tratamentos (favos velhos, favos novos e favos congelados) e de acordo com a idade das operárias das colméias higiênica e não higiênica.

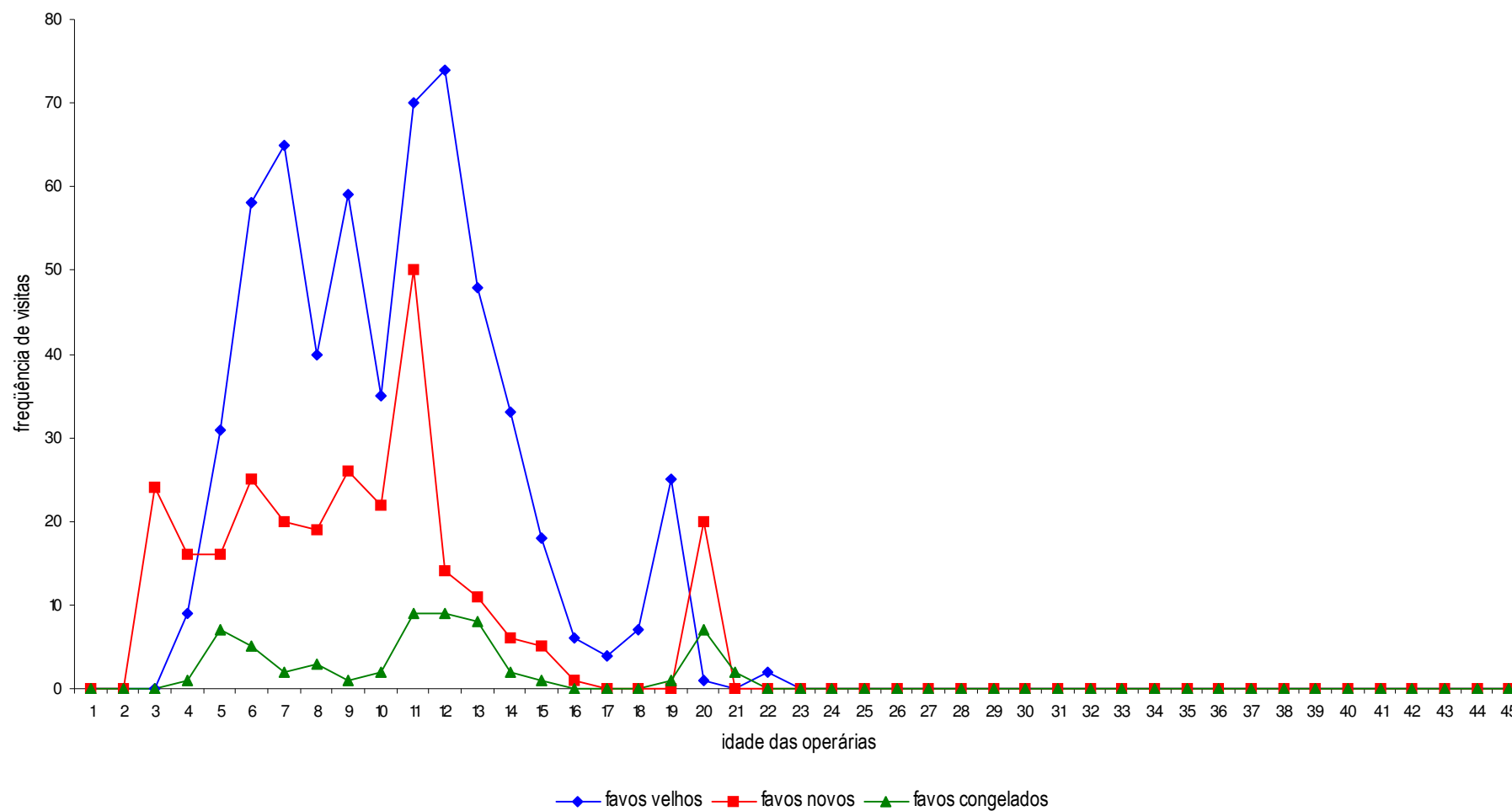


Figura 14 - Comparação da frequência de visitas de operárias que desopercularam as células de cria na colméia higiênica

Ao se analisar o comportamento de desoperculação da colméia higiênica (Figura 14), constata-se que as operárias mais jovens que realizam a desoperculação das células de cria manifestam o comportamento a partir de 3 dias de idade até 22 dias. A desoperculação das células nos favos novos é feita principalmente por abelhas com idades entre 3 e 11 dias (20 a 50%). A desoperculação nos favos velhos é feita principalmente por abelhas com idade entre 5 a 11 dias (30 a 70%) e a desoperculação nos favos congelados é realizada por abelhas cujas idades variam de 5 a 20 dias, porém, em frequência não superior a 10%. As abelhas mais jovens (3 dias) foram vistas trabalhando somente nos favos novos e a mais velha (22 dias) nos favos velhos. Assim como nos outros comportamentos citados anteriormente, as maiores frequências de visitas por grupos de operárias também foram feitas por abelhas de idades diferentes nos três tratamentos, embora coincidentemente nos favos velhos este pico (maior frequência) tenha ocorrido com as abelhas de 11 e 12 dias, as quais realizaram 70 e 74 visitas, respectivamente, para desopercular as células de cria. O maior número de visitas nos favos novos foi feito pelas abelhas que também apresentaram 11 dias de vida, sendo que estas fizeram até 50 visitas para a desoperculação, já os favos congelados tiveram dois picos e as abelhas apresentavam 5 a 6 dias e 11 a 12 dias, respectivamente. As maiores concentrações de abelhas desoperculadoras nos três tratamentos juntos ocorreram entre aquelas com idades entre 5 e 12 dias, havendo a seguir uma pequena queda e um novo pico entre 19 e 20 dias principalmente nos favos velhos e novos, respectivamente. Operárias com 21 dias foram vistas trabalhando somente nos favos congelados e com 22 dias somente nos favos velhos. Não foram observadas operárias com mais de 22 dias realizando o comportamento de desoperculação. Quanto ao número total de visitas que as células receberam para o comportamento de desoperculação, verifica-se que este foi maior nos favos velhos, os quais receberam 585 visitas, seguidos dos favos novos com até 275 visitas e por último os favos congelados que somaram apenas 60 visitas.

Com relação ao comportamento de desoperculação na colméia não higiênica, foi possível verificar que as abelhas desoperculadoras mais jovens da mesma forma que na colméia higiênica também foram aquelas de 3 dias de idade, entretanto a mais velha já tinha 29 dias de vida (Figura 15).

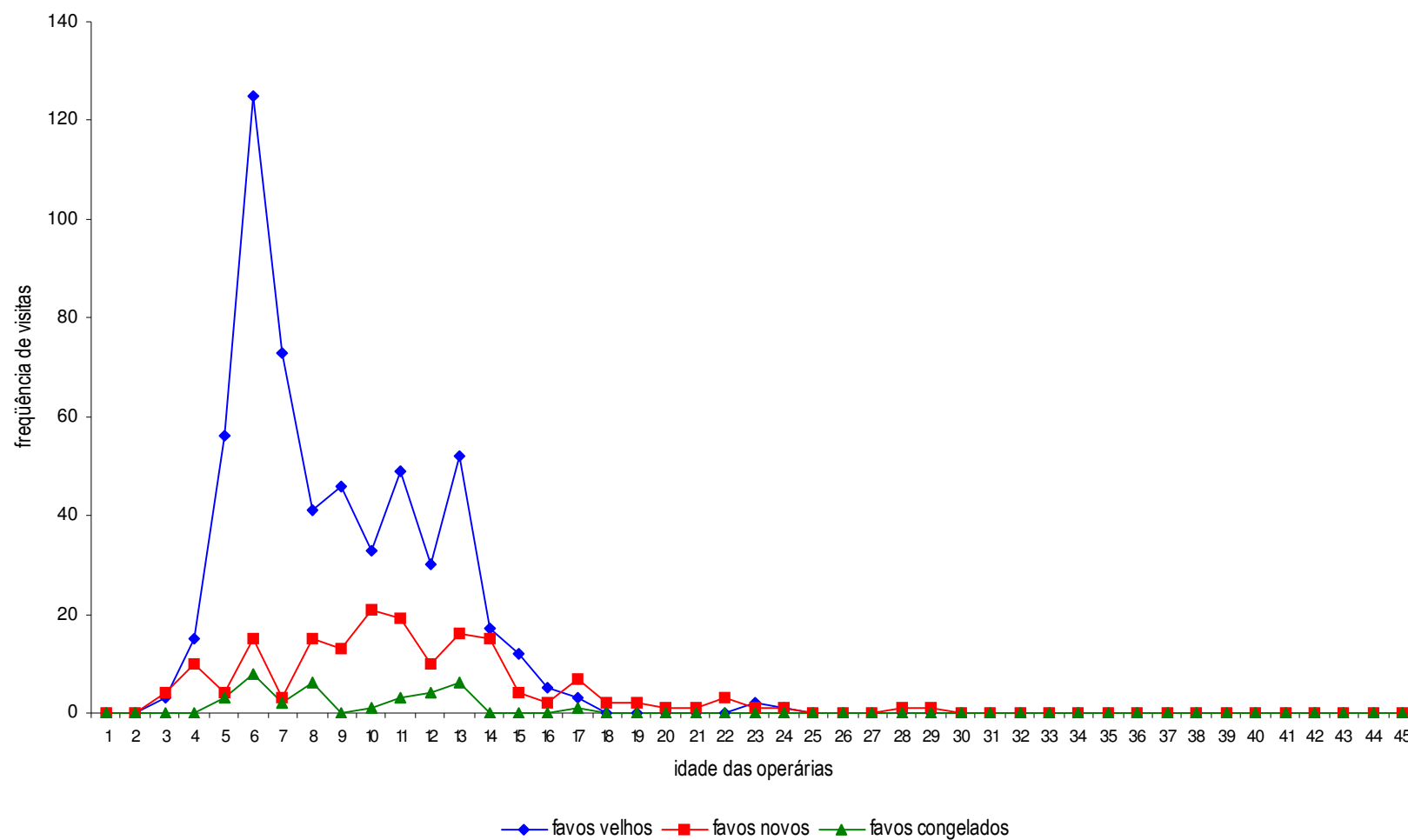


Figura 15 - Comparação da frequência de visitas de operárias que desopercularam as células de cria na colméia não higiênica

A desoperculação dos favos novos é feita principalmente por abelhas com idades entre 4 a 14 dias (10 a 20%). A desoperculação dos favos velhos por abelhas com idade entre 5 a 13 dias (50%), já a desoperculação das células nos favos congelados é feita por abelhas cujas idades oscilam entre 5 a 13 dias, porém com frequência ao redor de apenas 5%.

Analisando-se o comportamento de desoperculação das abelhas não higiênicas por grupos de idade, foi verificado que as maiores frequências de visitas das desoperculadoras nos favos velhos, foram realizadas pelas operárias que já contavam 6 dias de vida e realizaram um total de 125 visitas. Nos favos novos a maior frequência de visitas foi de abelhas com 10 dias e o número máximo de visitas foi de apenas 21. Nos favos congelados o número de visitas foi ainda menor. As maiores concentrações de abelhas desoperculadoras nos três tratamentos juntos, foram semelhantes às da colméia higiênica sendo que ocorrera com as operárias com idades entre 5 a 13 dias (na higiênica foi de 5 a 12 dias), existindo um declínio no número de visitas das operárias de 14 a 17 dias e uma oscilação tendendo a zero na frequência das operárias com 18 a 24 dias. Operárias com idades entre 25 e 27 dias não foram encontradas desoperculando células e apenas 1 operaria com 28 dias e 1 com 29 dias foram vistas realizando o comportamento de desoperculação nos favos novos.

Os resultados obtidos quanto ao número total de vezes que as operárias visitaram as células de cria para proceder a desoperculação, mostraram que, igualmente como ocorreu na colméia higiênica, este número foi maior nos favos velhos, com 563 visitas, também seguidos pelos favos novos com até 171 visitas e favos congelados com apenas 34 visitas das desoperculadoras.

Embora tenha ocorrido variação na idade das operárias que realizaram o comportamento de desoperculação das células de cria nas colméias higiênica e não higiênica, as idades estiveram bem próximas em ambas colméias. Estes resultados, de algum modo vem ao encontro dos observados por Invernizzi y Corbella (1999), cujos alegam que em seus experimentos o comportamento higiênico nas células de cria operculada foi realizado por operárias com idade média de 11,7 dias. Nossos resultados também corroboram àqueles encontrados por Guerra Jr. e Gonçalves (2000) quando realizaram experimentos com a introdução de ácaros dentro das células de cria

e verificaram que ocorre uma influência da idade da operária que participa na desoperculação da célula infestada com os ácaros. O intervalo de idade na qual os autores verificaram uma maior atividade deste comportamento pelas operárias foi entre 8 e 15 dias.

Recentemente, em um estudo descritivo das atividades envolvidas no comportamento higiênico, Palácio (2005) observou que 50% das abelhas que realizavam o comportamento de desoperculação em suas colônias higiênicas estiveram com idades entre 14 e 20 dias, enquanto que nas não higiênicas entre 14 e 19 dias. A autora também encontrou abelhas com idade mais jovem, isto é, abelhas de 6 e 7 dias nas colméias higiênica e não higiênica desoperculando células e também abelhas com 27 na colméia higiênica e 30 dias na colméia não higiênica, porém em baixas porcentagens.

Ao realizar experimentos documentando o repertório das abelhas durante o comportamento higiênico, Arathi *et al.* (2000) encontraram abelhas com idade média de 15,4 dias desoperculando as células de cria, embora Thakur *et al.* (1997) alegam que não ocorre a participação de operárias com mais de 14 dias de idade nos comportamentos de desoperculação e remoção pelas operárias de crias infestadas com o ácaro.

Nessa mesma direção em relação ao comportamento higiênico, no presente estudo foi verificado que além das operárias desoperculadoras existem outras que fazem o caminho contrário, ou seja, reoperculam as células de cria que já haviam sido pontuadas por outras operárias ou então já se encontrava em estágio inicial de remoção.

Embora tenham sido observadas em ambas colméias, o número de operárias reoperculadoras foi superior na colméia não higiênica, na qual foram verificadas 165 operárias reoperculando as células de cria, enquanto que nas colméias higiênicas, apenas 66 operárias.

Este fato já havia sido reportado por Boecking (1994) quando verificou que a remoção de crias infestadas com ácaros, não esteve restrita apenas a um comportamento fixo: detecção – desoperculação – remoção da cria parasitada, pois algumas vezes as operárias desopercularam as células da crias infestadas e após

algum tempo reoperculam novamente estas mesmas células que mais tarde, são novamente desoperculadas e as crias são removidas (*in* Guerra Jr., 2000)

Gramacho (1995) observou o mesmo fato quando desoperculou manualmente algumas células de cria objetivando verificar se esta desoperculação manual iria induzir a remoção das crias, no entanto, a autora observou que algumas células foram reoperculadas e somente 2 crias foram removidas.

Posteriormente, Flores Serrano *et al.* (2001) também observaram este comportamento de reoperculação em *Apis mellifera ibérica* quando realizaram experimentos com a introdução de ácaros dentro das células e constataram que em alguns casos as abelhas limpavam completamente as células de cria parasitadas, retirando os parasitas e a cria infestada, e em outros casos as abelhas retiraram os parasitas e reopercularam as células, respeitando a vida da cria, embora de acordo com os autores, o primeiro comportamento mostrou-se mais eficaz.

Recentemente, Arathi *et al.* (2006) também reportaram este fato ao analisar o perfil comportamental de operarias não higiênicas em colônias com diferentes proporções de abelhas higiênicas e, de acordo com os autores, uma hipótese alternativa é de que as abelhas não higiênicas reoperculam as células contendo cria morta ou doente porque elas possuem uma reduzida sensibilidade olfativa associada às doenças da cria. Em seus experimentos, Gramacho (1999), verificou que nas antenas das abelhas da linhagem higiênica existem um maior número de sensilas placodeas do que a linhagem não higiênica, e como as antenas funcionam como verdadeiros “narizes” para as abelhas, a autora supôs que as abelhas higiênicas devem apresentar uma maior capacidade de percepção olfativa do que as não higiênicas.

d) Inspeção da célula de cria

Um outro comportamento bastante interessante durante o desenvolvimento do comportamento higiênico das abelhas, está relacionado ao comportamento de inspeção da célula contendo a cria morta. Tal comportamento se observa quando a célula já está

completamente desoperculada e o processo de remoção já iniciado. Os resultados sobre o comportamento de inspeção da cria morta nos três tratamentos e de acordo com a idade das operárias higiênicas e não higiênicas estão nos gráficos das figuras 16 e 17.

O comportamento de inspeção da cria, consiste de uma rápida “olhada” dentro da célula de cria dos favos, acompanhada de movimentos antenares. Dependendo do estágio de remoção em que se encontra a cria, a operária que inspeciona, introduz completamente a cabeça e parte do tórax dentro da célula de cria. Do mesmo modo que o comportamento de desoperculação, as operárias da colméia higiênica realizam este comportamento em idade bastante jovem nos favos velhos e nos favos novos, ou seja, quando estavam com 2 e 3 dias de vida, respectivamente. Nos favos congelados, as mais jovens fizeram esta atividade quando atingiram 9 dias de vida.

A abelha mais velha observada quanto ao comportamento de inspeção da cria morta apresentou 27 dias e foi observada nos favos velhos (Figura 16).

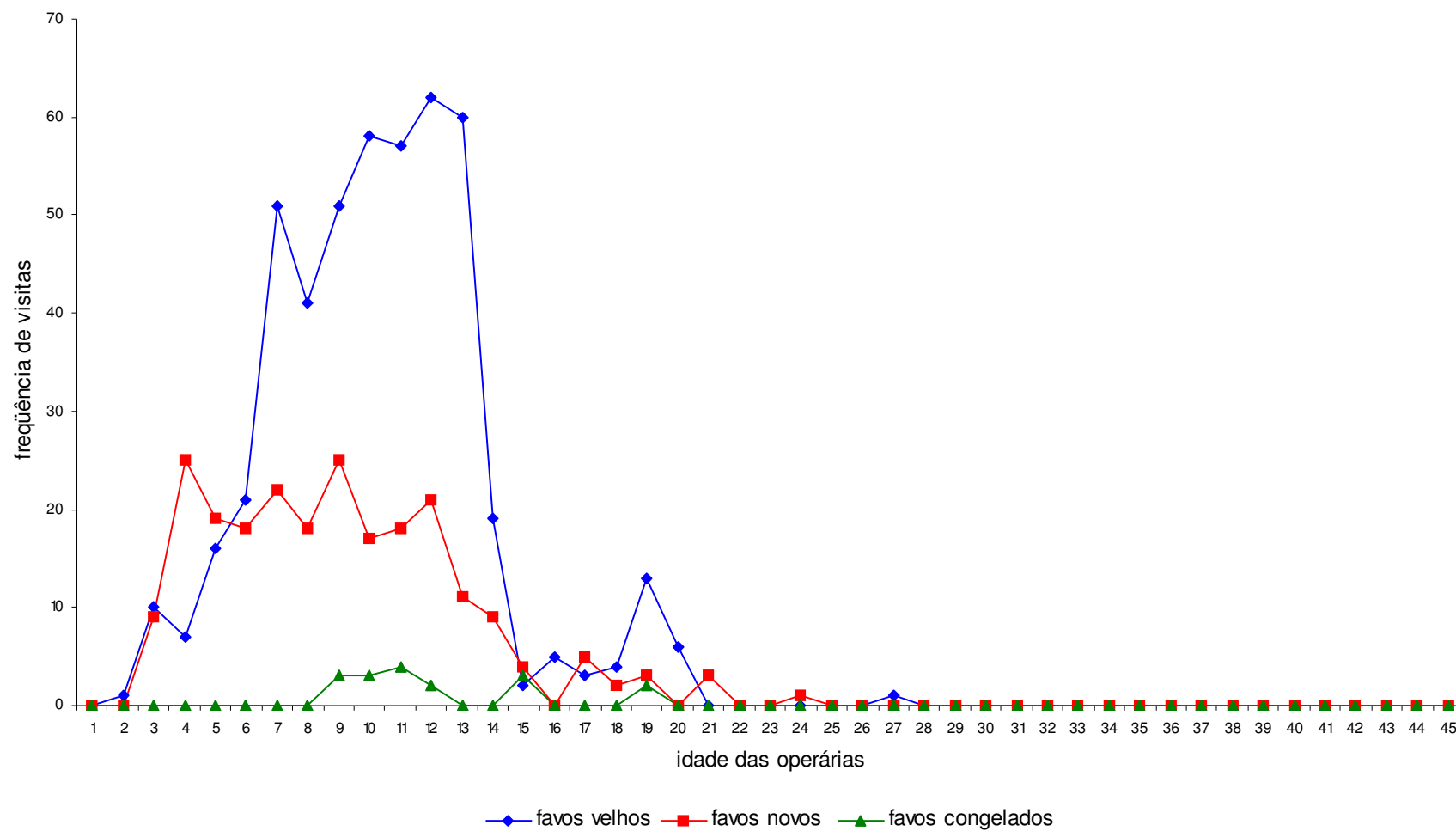


Figura 16 - Comparação da frequência de visitas de operárias que inspecionaram as células de cria na colméia higiênica

Analisando a figura 16, que corresponde à colméia higiênica, é possível ser verificado que as maiores freqüências de visitas para inspecionar a cria que estava sendo removida pelas operárias nos favos velhos ocorreram com as abelhas entre 7 e 13 dias sendo a menor freqüência com 12 dias (64 visitas), sendo aproximadamente a mesma faixa apresentada pelas operárias que desopercularam as células. A maior freqüência nos favos novos foi registrada para as operárias com idade bem mais jovem que aquelas dos favos velhos, ou seja, operárias com idade de 4 a 12 dias. Para os favos congelados, assim como no comportamento anterior, foi observado um pico máximo de visitas quando as operárias tinham completado 11 dias, apresentando um número muito reduzido quando comparado ao número de visitas nos outros dois tratamentos. Ao se fazer uma análise de forma mais ampla, constatou-se que as maiores concentrações de abelhas que inspecionavam a cria morta nos três tratamentos juntos, com as operárias com idades entre 3 e 14 dias, principalmente nos favos velhos, havendo mais uma vez, como nos comportamentos anteriores oscilações no número de visitas das operárias com idades mais avançadas, entre 15 e 21 dias. Foi verificada apenas 1 operária com idade de 24 dias nos favos novos e 1 com 27 dias inspecionando cria nos favos velhos.

Da mesma maneira que no comportamento de desoperculação, o número total de vezes que as operárias visitaram as células para inspecionar a cria, foi maior nos favos velhos do que nos favos novos e nos congelados. As operárias visitaram os favos velhos 488 vezes para inspecionar as crias, enquanto que nos favos novos elas fizeram 230 visitas e nos favos congelados apenas 17 visitas.

Ao se observar o gráfico da figura 17, constata-se que, na colméia não higiênica, as abelhas mais jovens a inspecionar as crias que estão sendo removidas nos favos velhos e novos tinham 2 dias de idade, ocorrendo a maior freqüência (pico) quando atingiram 6 dias no favo velho (com 99 visitas) e 10 dias (31 visitas) nos favos novos, já nos favos congelados a mais jovem foi aquela que apresentou 7 dias de idade (3 visitas). De modo semelhante ao que ocorreu na colméia higiênica, a operária mais velha foi observada inspecionando a cria nos favos velhos, e já tinha alcançado 26 dias de idade.

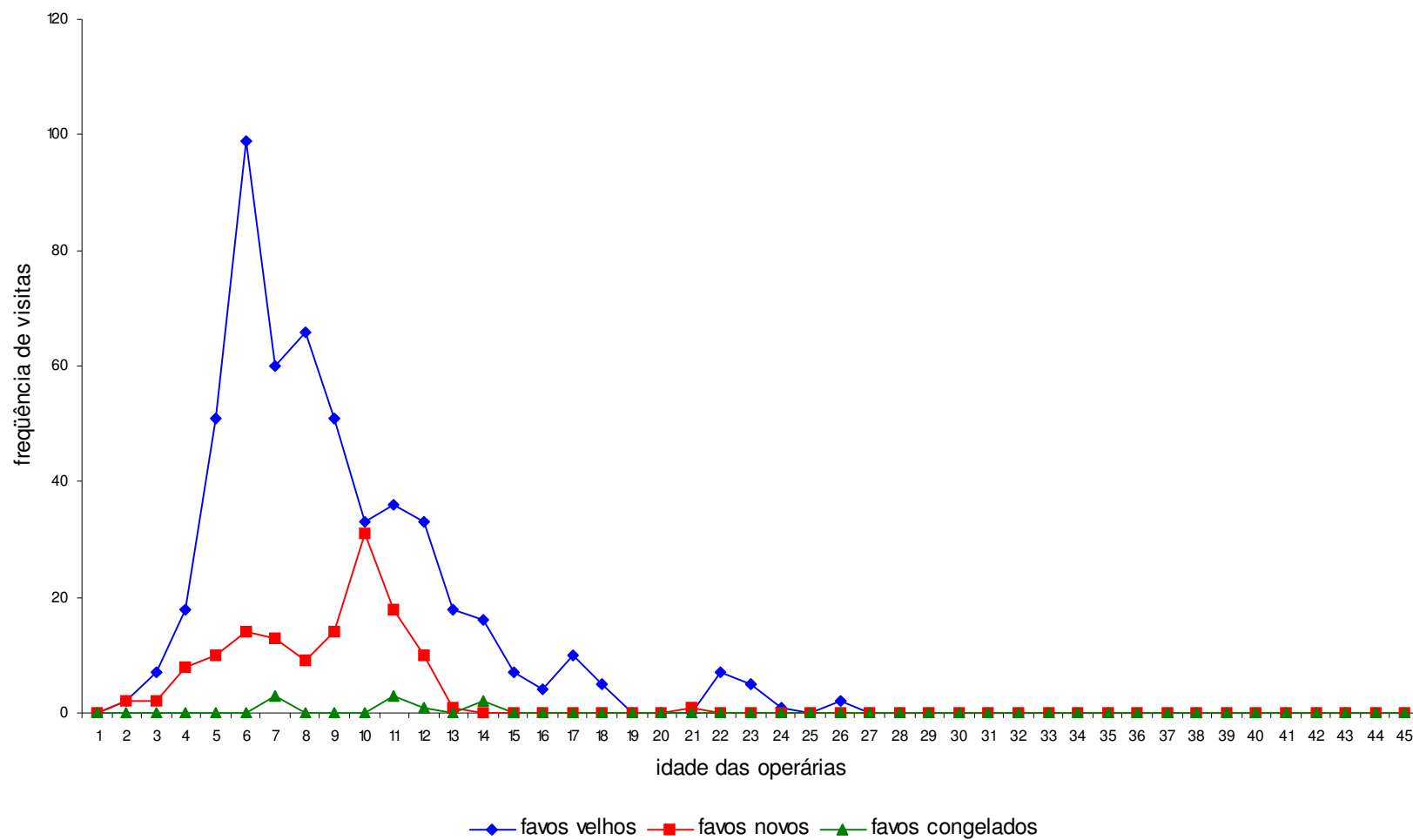


Figura 17 - Comparação da frequência de visitas de operárias que inspecionaram as células de cria na colmeia não higiênica

Ao analisarmos as maiores freqüências de abelhas que inspecionavam a cria morta nos três tratamentos juntos, verificou-se que estas se deram de forma semelhante às da colméia higiênica (abelhas com 3 e 14 dias) e com freqüências mais altas nos favos velhos (100%) comparado com os favos novos (30%) e freqüências inferiores a 5% nos favos congelados.

Foi constatado que as operárias visitaram os favos velhos 531 vezes para inspecionar as crias, enquanto nos favos novos elas fizeram um total de 133 visitas e nos favos congelados apenas 9 visitas.

d) Remoção da cria morta

O comportamento de remoção total ou parcial da cria morta, doente ou infestada, corresponde a última etapa do comportamento higiênico. No presente estudo, verificou-se que da mesma forma que os comportamentos anteriormente citados, as operárias iniciaram o comportamento de remoção também em idade bastante jovem e os resultados quanto às idades em que as operárias manifestaram o comportamento de remoção nas colméias higiênicas e não higiênicas estão representados nos gráficos das figuras 18 e 19.

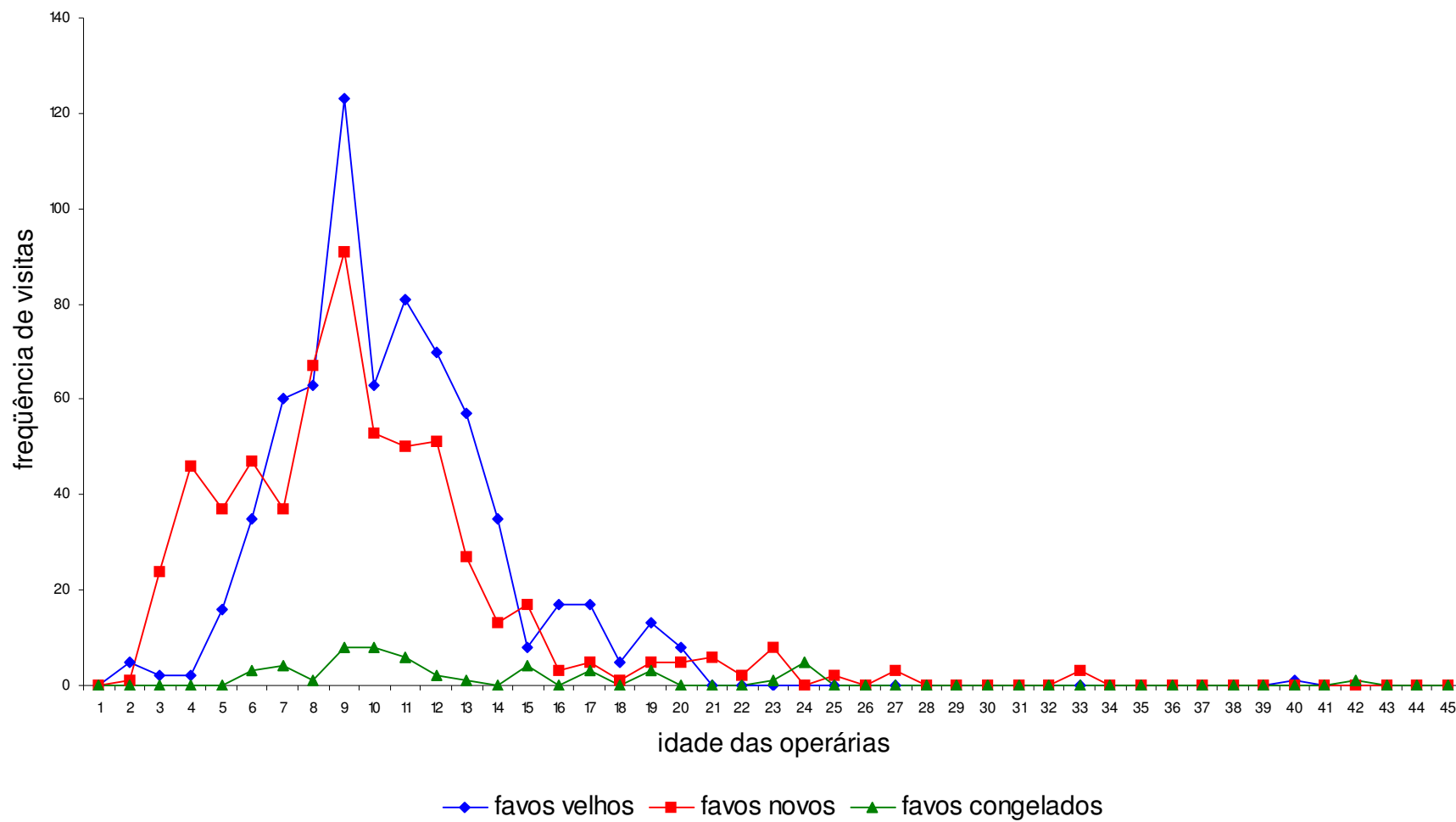


Figura 18 - Comparação da frequência de visitas de operárias que removeram crias na colméia higiênica

Ao analisar a colméia higiênica, constata-se que nos favos novos e favos velhos, as operárias mais jovens que foram vistas removendo as crias tinham 2 dias enquanto que nos favos congelados, as mais jovens já tinham atingido 6 dias de idade. Diferentemente do que foi encontrado nos comportamentos anteriores, a operária removedora mais velha foi registrada nos favos congelados (42 dias), já as mais velhas presentes nos favos novos e velhos encontravam-se com idades de 33 e 40 dias, respectivamente (Figura 18).

No que se refere à maior frequência de visitas por grupos de idades, foi observado que as operárias com idade entre 8 a 10 dias visitaram muito mais as células para removerem as crias mortas nos três tipos de favo, do que abelhas de outras idades, sendo que nos favos velhos tiveram sua frequência máxima de 123 visitas registradas, já nos favos novos ocorreram 90 visitas, e nos favos congelados somente 8 visitas. Uma maior concentração de abelhas observadas realizando o processo de remoção da cria nos três tratamentos juntos, foi registrada com idades de 3 a 14 dias e com oscilações entre as operárias com idades mais avançadas. Quanto ao total de visitas realizadas pelas operárias, verificou-se que este foi menor do que nos comportamentos anteriormente citados. Os favos velhos receberam um total de 681 visitas, os favos novos 604 e os favos congelados 50 visitas. O fato deste número de visitas ter sido bastante reduzido nos favos velhos e novos quando comparada à frequência de visitas para os comportamentos supra citados, pode ser entendido se levarmos em consideração o tempo gasto para cada atividade, uma vez que os comportamentos de inspeção pré desoperculação, inserção de antenas, desoperculação e inspeção da cria morta levam apenas poucos segundos, enquanto o comportamento de remoção da cria leva minutos. Desse modo, excetuando-se o comportamento de remoção que exige mais tempo das operárias, as células operculadas permanecem “disponíveis” por um maior espaço de tempo para que uma maior quantidade de abelhas a visitem para o desempenhar os comportamentos.

Do mesmo modo que na colméia higiênica, na colméia não higiênica as remoções foram realizadas por operárias de idades distintas (Figura 19).

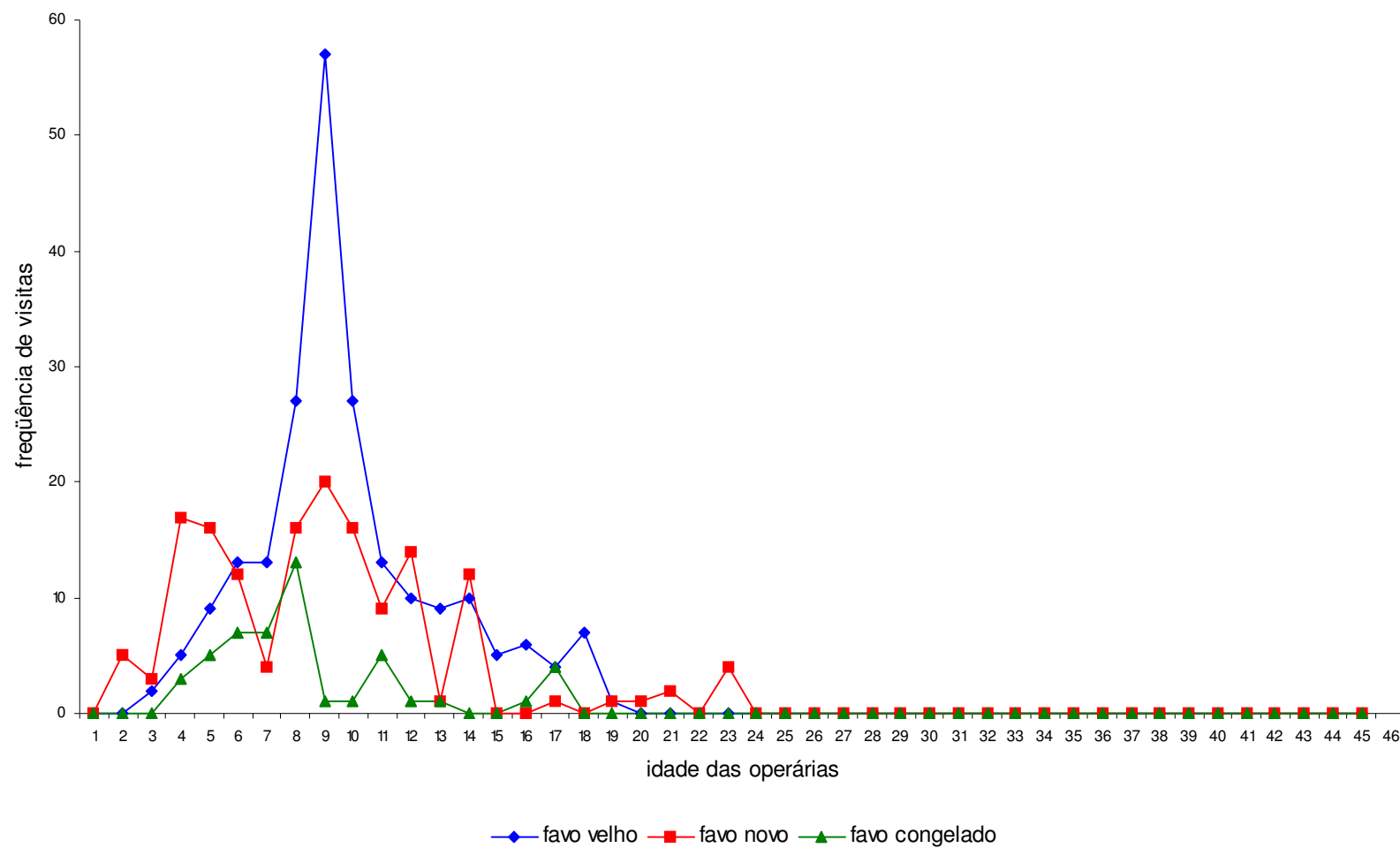


Figura 19 - Comparação da frequência de visitas de operárias que removeram crias na colméia não higiênica

Nota-se que nos favos velhos as maiores frequências foram observadas em abelhas de 8 a 10 dias, sendo que no favo novo houve uma oscilação de idade entre 2 e 14 dias e no favo congelado entre 4 e 17 dias de idade.

A maior frequência de visitas realizada pelas operárias de 9 dias nos favos velhos e novos foram, respectivamente, 57 e 20 visitas e a maior frequência registrada pelas operárias de 8 dias nos favos congelados foram de 13 visitas.

Diferentemente da colméia higiênica que registrou abelhas com até 42 dias de idade realizando remoção da cria, na colméia não higiênica não foram observadas abelhas com mais de 23 dias trabalhando no processo de remoção da cria.

Assim como ocorreu na colméia higiênica, com relação ao número total de visitas realizadas pelas operárias, verificou-se que este também foi menor do que nos comportamentos anteriormente citados e valores bem inferiores aos registrados na colméia higienica. Os favos velhos receberam um total de 218 visitas, os favos novos 154 e os favos congelados apenas 49 visitas.

Os resultados obtidos quanto à idade das abelhas que realizam o comportamento de remoção, são muito próximos aos obtidos por Invernizzi y Corbella (1999) que encontraram a media de 11,4 dias de idade para as operárias que removem as crias. Os dados obtidos no presente estudo, também estão igualmente dentro da faixa encontrada por Guerra Jr. e Gonçalves (2000) que verificaram que o intervalo de idade na qual se verifica uma maior atividade de remoção (e também desoperculação) das operárias foi entre 8 e 15 dias, já Arathi *et al.*, (2000) observaram abelhas um pouco mais velhas (entre 15-17 dias de vida) realizando este comportamento.

Gramacho & Spivak (2003), hipotetizaram que dentro de uma colônia devem existir diferenças na sensibilidade olfatória das abelhas higiênicas de mesma idade, e de acordo com as autoras abelhas que iniciam o comportamento pela perfuração e desoperculação da célula de cria, devem ter uma maior sensibilidade olfatória aos odores da cria, e devem discriminar melhor entre odores de cria saudável e doente, comparada com aquelas abelhas que completam o comportamento pela remoção da cria de dentro da célula desoperculada. Isso pode estar relacionado com o número de discos olfativos encontrados nas antenas.

Recentemente, esta hipótese foi confirmada pelas autoras em abelhas que apresentavam idades entre 15-21 dias, estando dessa forma, também dentro da faixa etária das abelhas analisadas no presente trabalho.

Anteriormente, através do uso do reflexo condicionado de extensão da proboscide, Masterman *et al.* (2001) já haviam demonstrado que abelhas *Apis mellifera*, consideradas higiênicas são capazes de discriminar entre os odores de cria saudáveis e crias doentes a um estímulo muito mais baixo do que as abelhas não higiênicas. Segundo os autores, as abelhas higiênicas quando completaram 3 semanas de vida (aproximadamente 21 dias) distinguiram entre os odores da cria mais rapidamente do que as abelhas não higiênicas que estiveram na mesma faixa etária.

Em estudos recentes, Palácio (2005) encontrou abelhas com idade entre 14 e 18 dias realizando ativamente o comportamento de remoção em colméias higiênicas e não higiênicas. No entanto, também encontrou em menor frequência (7 a 9 dias) e abelhas mais velhas (21 a 27 dias) em atividades de remoção.

O fato de sempre serem encontradas diferenças por diversos autores quanto às idades que as operárias realizaram os comportamentos supra citados, pode ser explicado pelas condições das colméias estudadas, onde pode ter havido uma certa plasticidade comportamental quando as operárias efetuam algum tipo de tarefa que ainda não é específica para sua idade. Além disso, o fator genótipo também pode atuar, pois de acordo com Arathi & Spivak (2001) a idade das abelhas na realização de tarefas em uma colméia pode variar significativamente dependendo da composição genotípica da mesma. Segundo as autoras, nas colônias que continham um maior número de abelhas higiênicas as tarefas foram realizadas por aquelas de idade média (17-19 dias), enquanto que na colônia de menor número de abelhas higiênicas este comportamento foi realizado por abelhas com idade superior à média sendo que a abelha mais velha vista realizando o comportamento de remoção tinha 56 dias de idade.

Ainda com relação à remoção da cria, no presente estudo, foi verificado que algumas vezes a remoção não era feita sob a forma de canibalismo e sim removida totalmente. Observou-se que este tipo de comportamento foi mais comum nas colméias higiênicas, que apresentou um total de 73 células tendo suas crias removidas totalmen-

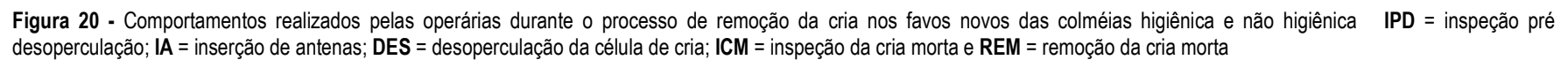
te, enquanto que nas colméias não higiênicas, este número foi 3 vezes menor, ou seja, apenas 19 células.

Segundo Visscher (1983) este tipo de comportamento (remoção total da cria) é conhecido como comportamento necrofórico e faz parte das atividades de limpeza da colônia em *Apis mellifera*, porém existem apenas 1 a 2 % das abelhas na colônia especializadas para exercer este tipo de comportamento. Em *Apis cerana*, Rath & Drescher (1990) nunca observaram este tipo de comportamento, e de acordo com os autores, nas células de cria de operárias infestadas artificialmente tanto com ácaros vivos quanto com ácaros mortos, mesmo as operárias tendo detectado tais células a um alto grau, elas desopercularam-nas e removeram a cria através da ingestão da larva ou pupa em forma de canibalismo.

4.2 - Monitoramento individual das operárias que realizaram o comportamento higiênico em períodos diurno e noturno

Através das filmagens realizadas, foi possível analisar de uma forma bastante detalhada todos os comportamentos realizados por cada operária marcada durante o processo de remoção da cria, tanto no período diurno quanto no período noturno.

Verificou-se que as operárias se comportam de uma maneira bastante variável, tanto nas colméias higiênicas quanto nas colméias não higiênicas. Foi constatado que algumas abelhas realizaram tarefas específicas (aquelas já citadas no item 4.1), ou seja, apenas realizaram inspeções pré desoperculação, ou apenas inseriram as antenas no interior da célula de cria, ou somente desopercularam as células, ou simplesmente só inspecionaram a célula contendo a cria morta ou apenas removeram as crias, no entanto, outras operárias realizaram duas, três ou mais destas tarefas em ambas colméias e nos três tratamentos. As figuras 20 a 21 ilustram todas estas tarefas que foram realizadas pelas operárias durante o comportamento higiênico.



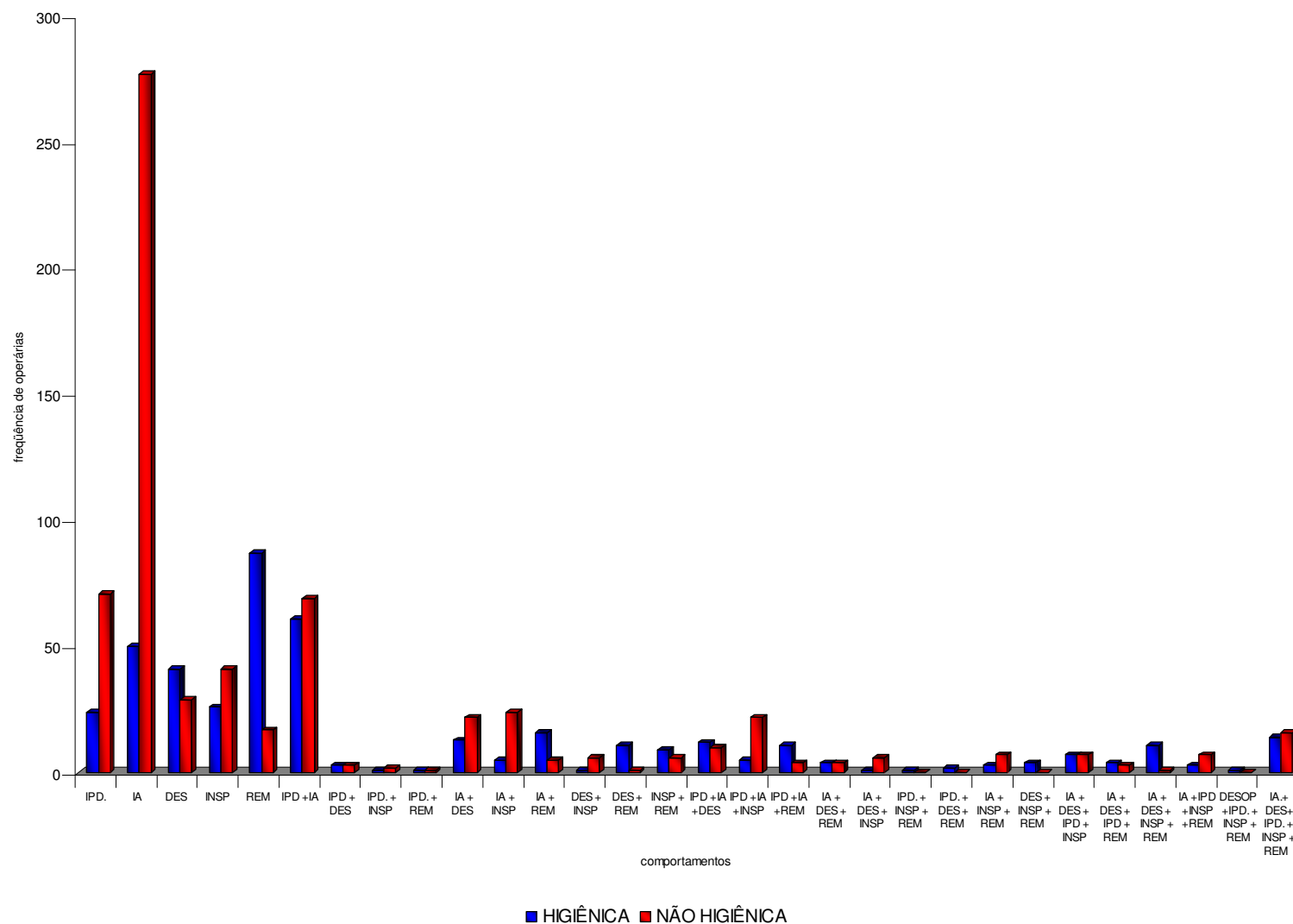
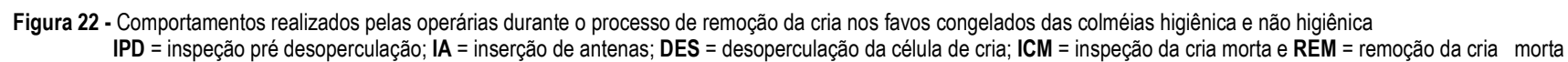


Figura 21 - Comportamentos realizados pelas operárias durante o processo de remoção da cria nos favos velhos das colméias higiênica e não higiênica

IPD = inspeção pré desoperulação; IA = inserção de antenas; DES = desoperulação da célula de cria; ICM = inspeção da cria morta e REM = remoção da cria morta



Conforme se verifica nas figuras acima, quando se compara os três tratamentos (favos novos, favos velhos e favos congelados) os cinco comportamentos específicos relacionados ao comportamento higiênico foram comuns nas duas colméias analisadas (higiênica e não higiênica), independente do tratamento utilizado (favo novo, favo velho ou favo congelado), embora a maior freqüência desses comportamentos tenha ocorrido nos favos novos. No entanto no que se refere àqueles realizados em conjunto (duas, três ou mais atividades) por uma mesma operária nos favos congelados houve a ausência de alguns. Verifica-se ainda que as freqüências de operárias que realizaram as tarefas foi variável nos três tipos de favos sendo que nos favos congelados, excetuando-se o comportamento de inspeção pré desoperculação, estas freqüências foram ainda mais reduzidas quando comparadas aos favos novos e favos congelados. Aqui, será tratado de uma forma mais aprofundada apenas os cinco primeiros comportamentos citados (Figura 23), uma vez que além deles terem sido realizados com maior freqüência na grande maioria dos casos, os demais são originários da junção de dois ou mais destes.

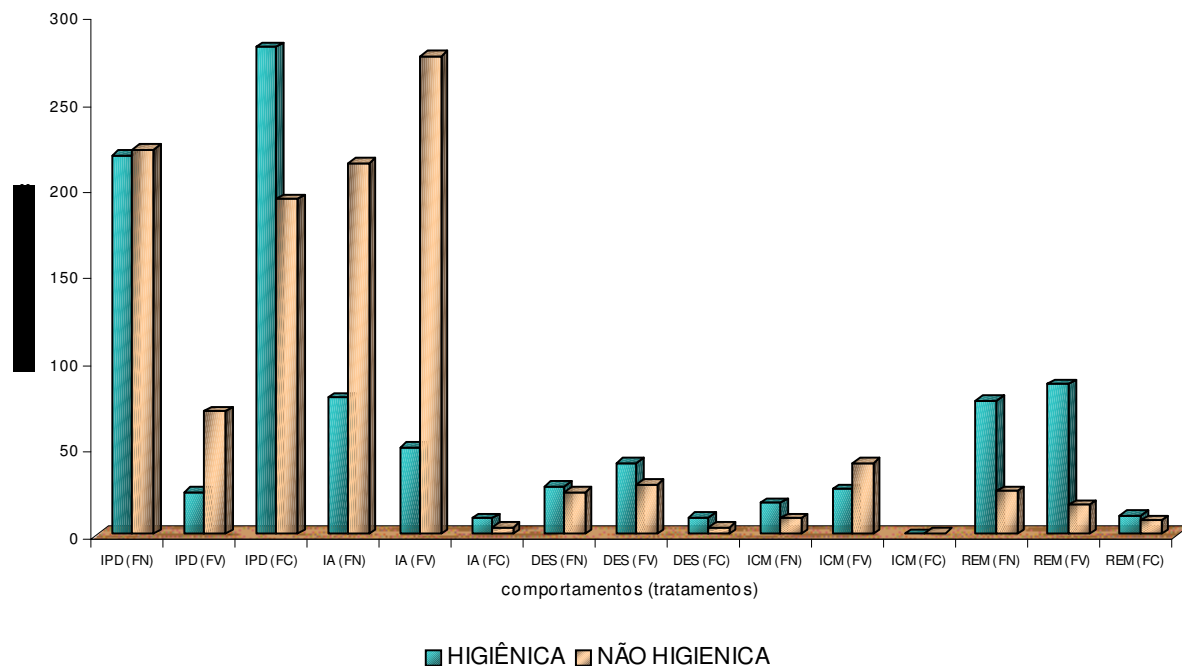


Figura 23 - Representação gráfica dos cinco comportamentos específicos realizados pelas operárias em colméias higiênicas e não higiênicas. **FN** = favo novo **FV** = favo velho **FC** = favo congelado **IPD** = inspeção pré desoperculação; **IA** = inserção de antenas; **DES** = desoperculação da célula de cria; **ICM** = inspeção da cria morta **REM** = remoção da cria morta

Nota-se que em ambas colméias a frequência de abelhas que visitaram as células de cria somente para pré inspecioná-las (IPD) antes da desoperculação (200 a 280 visitas), estiveram mais próximas entre os favos novos e os favos congelados. Nos favos velhos, as visitas foram visivelmente menos frequentes em ambas colméias (25 a 75 visitas). Já ao analisarmos o comportamento de inserção das antenas no interior das células de cria (IA), notou-se que ocorreu o contrário, ou seja, houve um elevado número de visitas (270) por parte das operárias nos favos velhos (principalmente na colméia não higiênica) e um baixíssimo número nos favos congelados (10 visitas), enquanto que nos favos novos o menor número de visitas foi na colméia higiênica (75 visitas) e de uma maneira mais significativa na colméia não higiênica (270 visitas). Este fato pode ser explicado se levarmos em conta que, em ambas colméias nos favos novos as operárias levaram um maior tempo para iniciar o processo de desoperculação da célula de cria. Assim, uma maior quantidade de abelhas tiveram mais tempo para

visitarem as células e realizar o comportamento de inspeção pré desoperculação, uma vez que este foi contado somente até o momento em que ocorria a pontuação do opérculo ou o início da desoperculação. Como nos favos velhos o tempo para iniciar a desoperculação das células de crias foi menor, as operárias tiveram menos tempo para as visitas de pré inspeção e ao invés disso, elas visitaram as células para a realização de um outro comportamento, o comportamento de inserção de antenas.

Quanto aos favos congelados, da mesma forma que nos favos novos, as operárias demoraram mais tempo para iniciar a desoperculação de algumas células permitindo que muito mais abelhas visitassem a célula somente para pré inspecionalas. Além disso, este método de congelamento utilizado para a morte das crias, pode ter contribuído no aumento do tempo para desoperculação, uma vez que os favos ficaram fora do freezer por apenas 1 hora antes de serem introduzidos na colméia de observação. Este tempo talvez não tenha sido suficiente para que as crias se descongelassem por completo o que pode ter atraído uma maior quantidade de abelhas para pré inspecionarem as células, pois de acordo com Dietz & Humphreys (1971) as abelhas possuem células sensoriais (sensila campaniformia) nas antenas que são especializadas em identificar diferentes temperaturas (*in* Gramacho, 1999).

Ao analisar individualmente cada operária que realizou o comportamento de inspeção pré desoperculação (IPD) nas duas colméias (Figura 23), constatou-se que mesmo dentro do processo de realização deste comportamento, existe uma variação. Existem operárias que realizaram este comportamento específico apenas uma vez, ou seja, realizaram a inspeção pré desoperculação de uma única célula de cria e não mais retornaram para a pré inspeção desta mesma célula ou outras que ainda se encontravam operculadas nos favos. No entanto, existiram operárias que pré inspecionaram as células uma vez e retornaram para pré inspecionar duas ou mais vezes a mesma célula ou outras células que ainda estavam operculadas em qualquer local do favo.

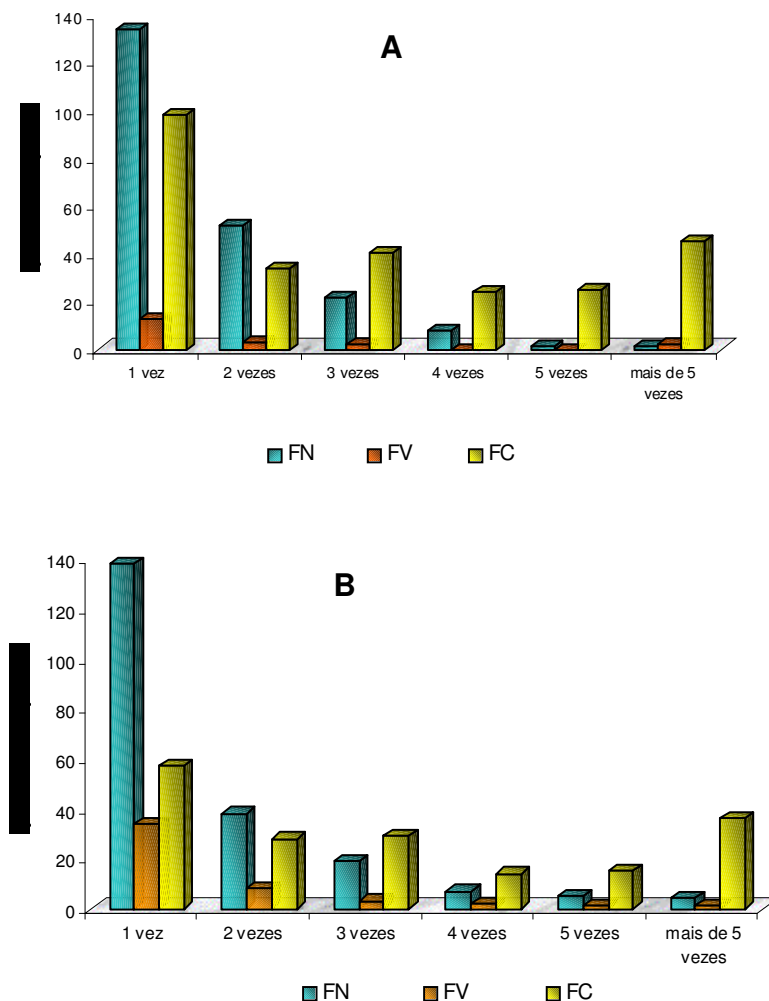


Figura 24 - Número de visitas que uma única abelha realizou às células para o comportamento de inspeção pré desoperculação (IPD) das células de cria.
(A) colméia higiênica **(B)** colméia não higiênica

Nota-se que a frequência de operárias que realizaram apenas 1 visita foi maior em ambas colméias e nos três tipos de favos. As visitas estiveram bem próximas nos favos novos, com valores de 134 abelhas para a colméia higiênica e 138 para a colméia não higiênica, nos favos congelados as frequência de visitas compreenderam 98 e 57 visitas para as colméias higiênica e não higiênica, respectivamente. Nota-se ainda, que somente nos favos congelados ocorreu uma oscilação quanto ao número de vezes que uma única abelha visitou as células para realizar apenas o comportamento de inspeção pré desoperculação, nos quais muitas abelhas visitaram as célula mais de 5 vezes em

ambas colméias. Nos outros dois tipos de favos, pareceu haver uma diminuição destas frequências em relação à quantidade de vezes que uma única abelha realiza o comportamento, ou seja, o número de abelhas que visitaram as células para realizarem apenas 1 inspeção foi maior do que aquele para realizar 2 inspeções, o de 2 inspeções, foi maior do que o de 3 inspeções e assim por diante, embora os números tenham sido parecidos entre as operárias que visitaram 5 ou mais vezes em ambos tipos de favos.

Verificou-se que dentre operárias que visitaram as células de cria mais de uma vez, algumas destas visitas ocorreram na mesma célula, e outras em células distintas no mesmo dia ou em dias subsequentes. Quando as operárias não retornavam no mesmo dia para novas pré inspeções, a maioria retornou logo no dia seguinte à primeira visita, entretanto, em alguns casos as operárias retornavam para realizar este mesmo comportamento após 2 a 8 dias. Em dois casos mais extremos, uma operária retornou somente para pré inspecionar uma outra célula de cria após 14 dias de sua primeira visita no favo congelado e outra após 15 dias no favo novo.

Com relação ao comportamento de inserção das antenas (IA) no interior das células contendo as crias mortas, pela figura 24, verifica-se que tanto os favos velhos quanto os favos novos das colméias não higiênicas receberam muito mais visitas de abelhas do que nas colméias higiênicas. Este fato é compreensível se considerarmos o tempo que as operárias levaram para iniciar o processo de remoção da cria, pois nas colméias higiênicas as operárias demoraram um tempo menor para iniciarem este processo. Como este tempo foi maior na colméia não higiênica, uma maior quantidade de células permaneceram mais tempo desoperculadas, permitindo dessa maneira que muito mais abelhas visitassem as células para a inserção de suas antenas. Já nos favos congelados, embora em frequência muito baixa, uma maior frequência de operárias inserindo as antenas esteve presente nas colméias higiênicas devido ao fato de que uma maior quantidade de células encontrou-se desoperculadas quando comparada à colméia não higiênica.

Analisando-se individualmente cada operária que realizou o comportamento específico de inserção das antenas (IA), foi verificado que da mesma forma que o comportamento de inspeção pré desoperculação algumas operárias trabalharam apenas 1 vez em uma única célula de cria enquanto outras trabalharam duas ou mais

vezes também no mesmo dia ou em dias subsequentes (Figura 25).

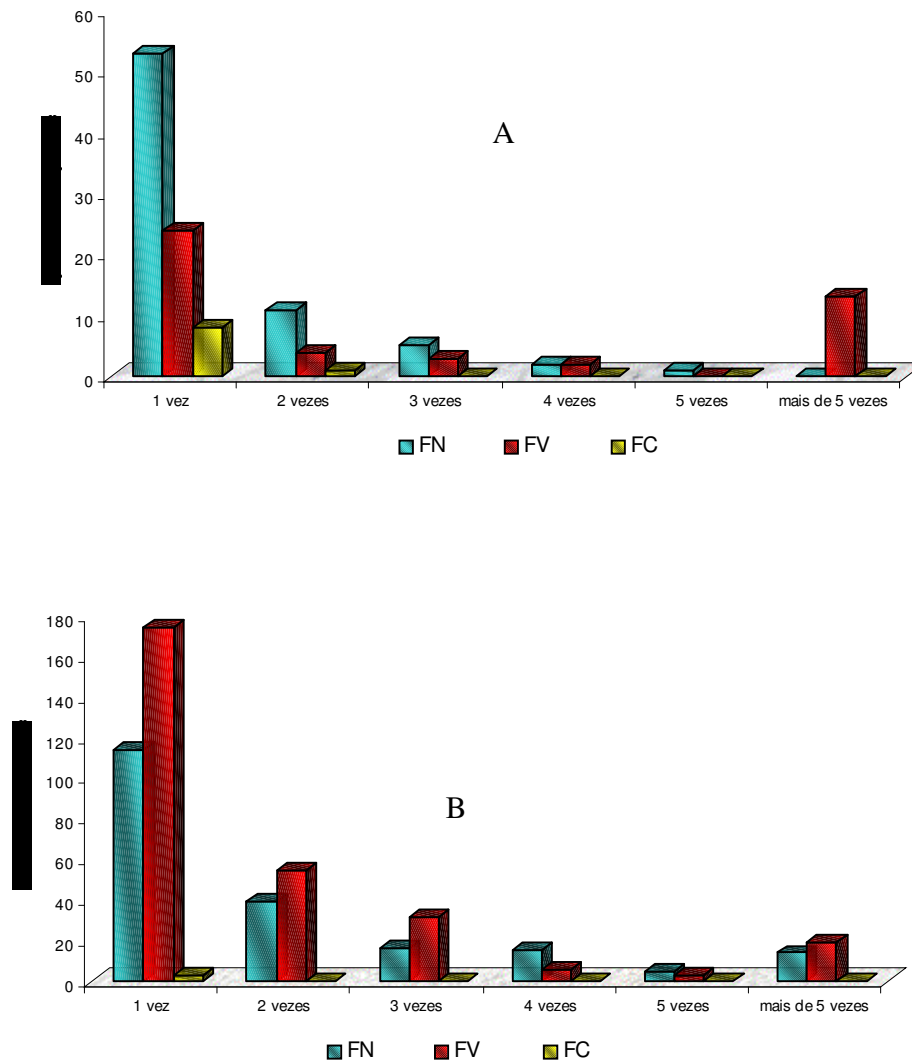


Figura 25 - Número de visitas que uma única abelha realizou às células para o comportamento de inserção das antenas (IA). **(A)** colméia higiênica **(B)** colméia não higiênica

Constata-se que do mesmo modo que no comportamento anterior, a quantidade de abelhas que visitaram as células de cria apenas 1 vez foi bem maior que para as demais vezes em ambas colméias e nos três tratamentos.

Constatamos que na colméia higiênica a maior frequência de visitas no favo congelado era de uma única vez (10 visitas) e raramente 2 vezes (2 visitas). Já na colméia não higiênica praticamente não se registrou visitas nos favos congelados (raras visitas uma única vez). Não foram observadas abelhas retornando mais vezes para realizar este comportamento. Certamente isto é devido ao fato de poucas células terem sido desoperculadas e conseqüentemente não “atrair” abelhas para o comportamento de inserção das antenas. Em ambas colméias tanto nos favos novos quanto nos favos velhos foram observadas operárias que retornaram mais de cinco vezes para inserirem as antenas nas células pontuadas ou desoperculadas, principalmente na colméia não higiênica.

Assim como ocorreu com o comportamento de inspeção pré desoperculação, no comportamento de inserção de antenas, ou o retorno se deu na mesma célula em um mesmo dia, ou se deu em dias subseqüentes em intervalos de 2 e 4 dias nas colméias higiênicas, e 3 a 7 dias na colméia não higiênica.

No presente estudo, foi verificado que muitas vezes as operárias inseriam primeiro a antena direita dentro das células de cria e posteriormente a antena esquerda. Recentemente Letzkus *et al.* (2006) mostraram que as abelhas melíferas apresentam uma clara lateralidade nas respostas ao aprendizado no reconhecimento de odores. Treinando as abelhas em duas diferentes versões do método do reflexo condicionado da probóscide eles demonstraram que as abelhas respondem melhor aos odores quando elas são treinadas através de suas antenas direitas.

Quanto ao comportamento específico de desoperculação das células de cria (DES) através da figura 23, verifica-se que contrariamente ao que ocorreu com o comportamento de inserção de antenas, principalmente nos favos novos e nos favos velhos, as colméias higiênicas apresentaram uma maior quantidade de operárias desempenhando este comportamento, embora nos favos novos este número tenha sido bem próximo. Este fato também deve estar ligado ao menor tempo de detecção por parte das operárias e início da desoperculação, pois como nas colméias higiênicas este tempo foi menor, mais abelhas foram observadas desoperculando das células de cria durante o período de 24 horas (tempo total observado para cada célula de cria).

Do mesmo modo que os comportamentos anteriores, foi verificado que algumas operárias desoperculam apenas 1 célula de cria e não mais retornam para desopercular outras células, no entanto, outras abelhas retornam em dias subseqüentes em outras células e realizam mais uma vez somente o comportamento de desoperculação (Figura 26).

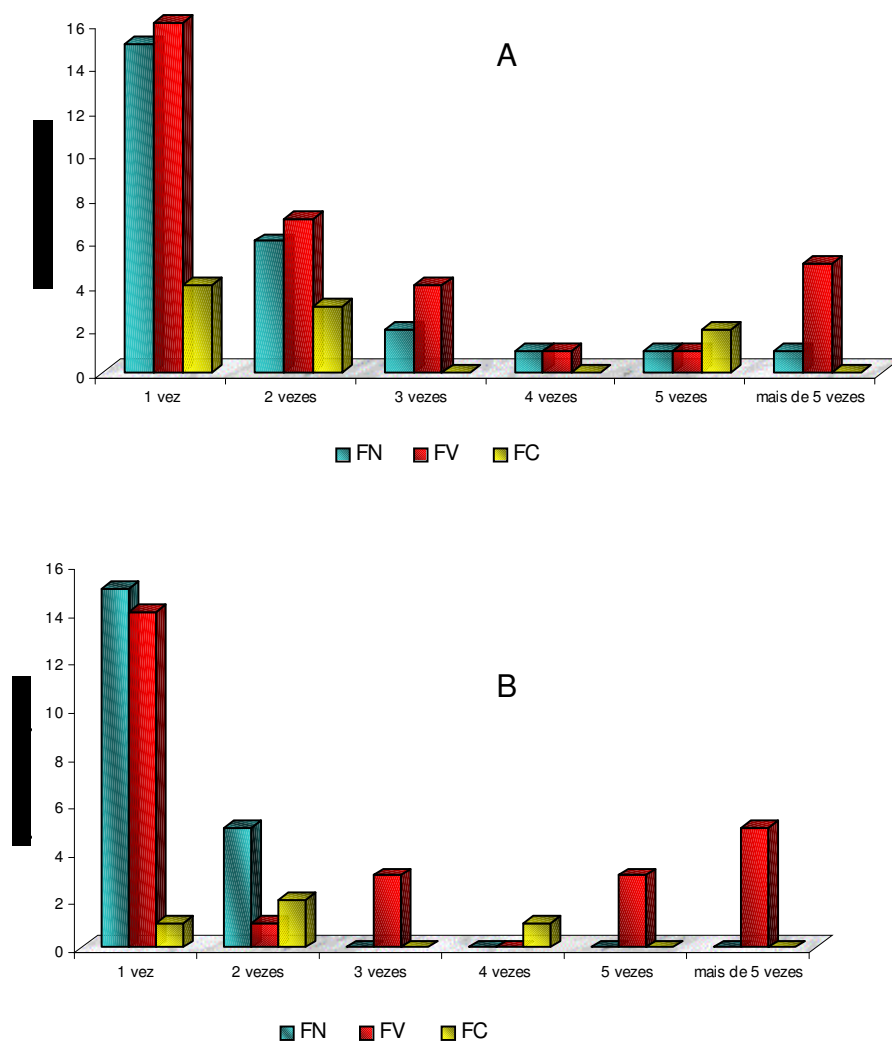


Figura 26 – Número de visitas que uma única abelha realizou às células para o comportamento de Desoperculação (DES). **(A)** colônia higiênica **(B)** colônia não higiênica

Verifica-se que tanto nos favos novos quanto nos favos velhos, nas duas colméias, a quantidade de vezes que uma única abelha visitou uma única célula para desoperculá-la foi maior quando se compara com os demais números de vezes demonstrando mais uma vez que é muito comum este tipo de comportamento por parte das operárias. Nos favos velhos, ocorreu uma oscilação quanto à quantidade de vezes

destas visitas em ambas colméias, e assim como no comportamento anterior, foram observadas abelhas desoperculadoras retornando mais de 5 vezes para desopercular as células de cria, em um caso extremo foram observadas duas operárias que realizaram 23 visitas, uma em 4 dias consecutivos na colméia não higiênica e outra em 3 dias consecutivos na colméia higiênica. Nos favos novos, na colméia não higiênica, não foram observados mais que dois retornos por parte das operárias.

Em estudos descritivos das atividades envolvidas no comportamento higiênico, Palácio (2005) também determinou a frequência de abelhas nas colméias higiênicas e não higiênicas que realizavam 1, 2, 3 ou mais de quatro visitas para atividades de desoperculação e observou uma maior frequência de abelhas que realizam apenas 1 atividade no grupo de abelhas higiênicas. A autora observou abelhas do grupo não higiênico realizando atividades em três ou quatro dias diferentes e não registrou abelhas da colméia higiênica trabalhando mais que dois dias.

Como as operárias retornavam às células para a realização de uma nova desoperculação em dias diferentes, foi verificado se a idade das mesmas exercia alguma influência no tempo de desoperculação. Os valores obtidos quanto às médias e respectivos desvios padrões para cada tratamento estão representados nas tabelas 1 a 6.

Tabela 1 – Tempo médio de desoperculação das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos novos das colméias higiênicas

Favos novos (desoperculação)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão
3	5	22	11	19	25	14
4	9	19	09	7	24	11
5	11	35	26	5	37	29
6	8	22	17	17	15	08
7	8	27	18	12	23	12
8	3	19	06	16	21	16
9	11	40	25	15	29	22
10	15	18	11	10	18	11
11	36	21	15	13	24	14
12	7	33	42	7	56	62
13	1	19	---	10	20	16
14	---	---	---	6	18	10
15	---	---	---	5	11	06
16	1	67	---	---	---	---
20	20	18	10	---	---	---
(p = 0,226)				(p = 0,095)		

Tabela 2 – Tempo médio de desoperculação das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos velhos das colméias higiênicas

Favos velhos (desoperculação)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão
4	1	0,22	---	8	0,14	0,07
5	4	0,38	0,35	27	0,36	0,29
6	1	0,09	---	57	0,32	0,38
7	46	0,33	0,23	19	0,45	0,43
8	28	0,48	0,34	12	0,32	0,27
9	9	0,51	0,19	51	0,34	0,25
10	6	0,47	0,26	29	0,31	0,30
11	43	0,36	0,28	27	0,25	0,23
12	19	0,57	0,33	55	0,32	0,34
13	15	0,39	0,25	33	0,24	0,20
14	23	0,47	0,24	10	0,35	0,29
15	14	0,27	0,21	4	0,36	0,29
16	5	0,30	0,23	1	0,08	---
17	---	---	---	4	0,12	0,06
18	2	0,31	0,25	5	0,50	0,34
19	---	---	---	25	0,32	0,37
20	---	---	---	1	0,88	---
23	2	0,31	0,24	---	---	---
(P = 0,106)				(P = 0,140)		

Tabela 3 – Tempo médio de desoperculação das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos congelados das colméias higiênicas

Favos congelados (desoperculação)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão
4	---	---	---	1	0,15	---
5	7	0,42	0,20	---	---	---
6	4	0,43	0,27	1	0,58	---
7	1	0,19	---	1	0,66	---
8	5	0,30	0,25	1	0,68	---
9	1	0,38	---	2	0,10	0,05
11	8	0,32	0,22	1	0,22	---
12	8	0,25	0,16	1	0,19	---
13	---	---	---	6	0,39	0,31
14	2	0,11	0,03	---	---	---
19	1	0,33	---	---	---	---
20	7	0,24	0,17	---	---	---
21	2	0,21	0,08	---	---	---
(P = 0,482)				(P = 0,712)		

Como pode ser verificado, o tempo gasto pelas operárias para a desoperculação das células de cria não sofreu influência da idade que as mesmas apresentaram. Não foram encontrados valores significativos com relação a este parâmetro tanto no período diurno quanto no período noturno em nenhum dos três tratamentos, mostrando que independente do período do dia, as operárias trabalham praticamente dentro de uma mesma faixa de tempo para realizar a atividade de desoperculação.

Ao compararmos as tabelas 1 a 3, que se referem à colméia higiênica, podemos verificar que nos favos novos a maior concentração de abelhas encontrada desoperculando as células foi encontrada principalmente entre as operárias que apresentavam idades entre 3 e 11 dias principalmente no favo que foi introduzido no

período diurno, já nos favos velhos a maior concentração foi encontrada principalmente por abelhas com idades entre 5 a 11 dias enquanto que nos favos congelados estas freqüências estiveram bem mais distribuídas entre as operárias, a qual foi realizada por abelhas cujas idades variam de 5 a 20 dias.

Tabela 4 – Tempo médio de desoperculação das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos novos das colméias não higiênicas

Favos novos (desoperculação)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão
3	4	0,37	0,41	---	---	---
4	2	0,53	0,06	8	0,30	0,32
5	4	0,41	0,15	---	---	---
6	9	0,31	0,18	6	0,24	0,09
7	2	0,12	0,01	1	0,28	---
8	8	0,37	0,23	7	0,28	0,28
9	2	0,37	0,36	11	0,26	0,24
10	15	0,30	0,25	6	0,21	0,15
11	13	0,26	0,19	6	0,22	0,07
12	3	0,30	0,24	7	0,25	0,16
13	---	---	---	16	0,15	0,07
14	2	0,21	0,06	13	0,24	0,17
15	1	0,18	---	3	0,10	0,01
16	---	---	---	2	0,35	0,30
17	4	0,19	0,09	3	0,36	0,06
18	2	0,18	0,13	---	---	---
19	2	0,15	0,11	---	---	---
20	1	0,08	---	---	---	---
21	1	0,56	---	---	---	---
22	3	0,20	0,15	---	---	---
23	1	0,58	---	---	---	---
24	1	0,12	---	---	---	---
28	---	---	---	1	0,13	---
29	1	0,32	---	---	---	---
(P = 0,502)				(P = 0.239)		

Tabela 5 – Tempo médio de desoperculação das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos velhos das não colméias higiênicas

Favos velhos (desoperculação)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão
3	1	0,55	---	2	0,08	0,07
4	7	0,27	0,15	8	0,18	0,17
5	3	0,22	0,11	52	0,28	0,36
6	23	0,22	0,21	103	0,32	0,34
7	23	0,37	0,30	49	0,36	0,31
8	10	0,34	0,31	31	0,29	0,19
9	21	0,46	0,49	25	0,28	0,20
10	21	0,53	0,51	11	0,25	0,11
11	7	0,47	0,40	41	0,33	0,26
12	6	0,64	0,54	24	0,34	0,34
13	41	0,37	0,26	11	0,30	0,09
14	15	0,49	0,51	3	0,53	0,25 **
15	7	0,56	0,30	4	0,16	0,06
16	3	0,26	0,17	1	0,13	---
17	1	0,14	---	2	0,27	0,03
23	2	0,73	0,43	---	---	---
24	1	0,14	---	---	---	---
(P = 0,218)				(P = 0,043) **		

** significativo a um $p < 0,050$

Tabela 6 – Tempo médio de desoperculação das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos congelados das colméias não higiênicas

Favos congelados (desoperculação)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (segundos)	Desvio padrão
5	3	0,31	0.03	---	---	---
6	3	0.37	0.24	5	0.33	0.28
7	1	0.36	---	1	0.08	---
8	6	0.29	0.15	---	---	---
10	1	0.15	---	---	---	---
11	1	0.16	---	2	0.33	0.22
12	2	0.52	0.04	2	0.15	0.01
13	2	0.43	0.16	4	0.23	0.08
17	1	0.125	---	---	---	---
(P = 0.114)				(P = 0.149)		

Quando se compara as tabelas 4 a 6 que se referem à colméia não higiênica, verifica-se que, de um modo geral, assim como na colméia higiênica, o tempo gasto pelas operárias para a desoperculação das células de cria não sofreu influência da idade que as mesmas apresentaram. Ressalta-se que, de todos os tratamentos analisados, uma diferença estatística significativa foi encontrada somente nos favos velhos (Tabela 5), no entanto, isto pode ser explicado se levarmos em conta que 3 operárias com idades de 14 dias que desopercularam as células no período noturno, apresentaram uma media alta em relação às demais que trabalharam no mesmo período, etretanto, de um modo geral as médias encontradas estiveram bem próximas umas das outras, de modo que, pode-se dizer que com relação a este parâmetro tanto no período diurno quanto no período noturno, nas colméias não higiênicas as operárias também trabalham praticamente dentro de uma mesma faixa de tempo para realizar a atividade de desoperculação.

Verifica-se que a desoperculação dos favos novos é feita principalmente por abelhas com idades entre 4 a 14 dias, havendo uma maior concentração naquelas com idades de 10 e 11 dias no período diurno e 13 e 14 dias no período noturno. Nos favos velhos por abelhas com idade entre 5 a 13 dias em ambos períodos e a desoperculação

das células nos favos congelados é feita por abelhas cujas idades oscilam entre 5 a 17 dias.

Quanto ao comportamento de inspeção da cria que estava sendo removida, verifica-se através da figura 23, que na colméia higiênica (ICMFN) uma maior quantidade de operárias especializadas apenas neste tipo de comportamento esteve presente nos favos novos, pois o número de visitas das abelhas higiênicas no fvo novo era o dobro das não higiênicas. Estes dados, corroboram aos encontrados por Palacio (2005) que também encontrou uma maior quantidade de abelhas realizando o comportamento de inspeção nas colméias higiênicas. Nos favos velhos verificou-se que o contrário ocorreu, uma vez que a maior frequência de visitas era das abelhas não higiênicas. É possível que este aumento nas colméias não higiênicas tenha ocorrido pelo fato de que nestas colméias o processo de remoção da cria foi mais lento. Assim, as crias permaneceram mortas dentro das células por um período maior, e isto deve ter estimulado as abelhas a executar o comportamento de inspeção da cria morta (ICM).

Analisando-se individualmente cada operária que realizou o comportamento específico de inspeção das crias mortas (ICM), verificou-se que, do mesmo modo que nos comportamentos anteriormente citados, algumas operárias também visitaram as células de cria e as inspecionaram uma única vez enquanto outras voltaram a inspecionar novas crias (Figura 27).

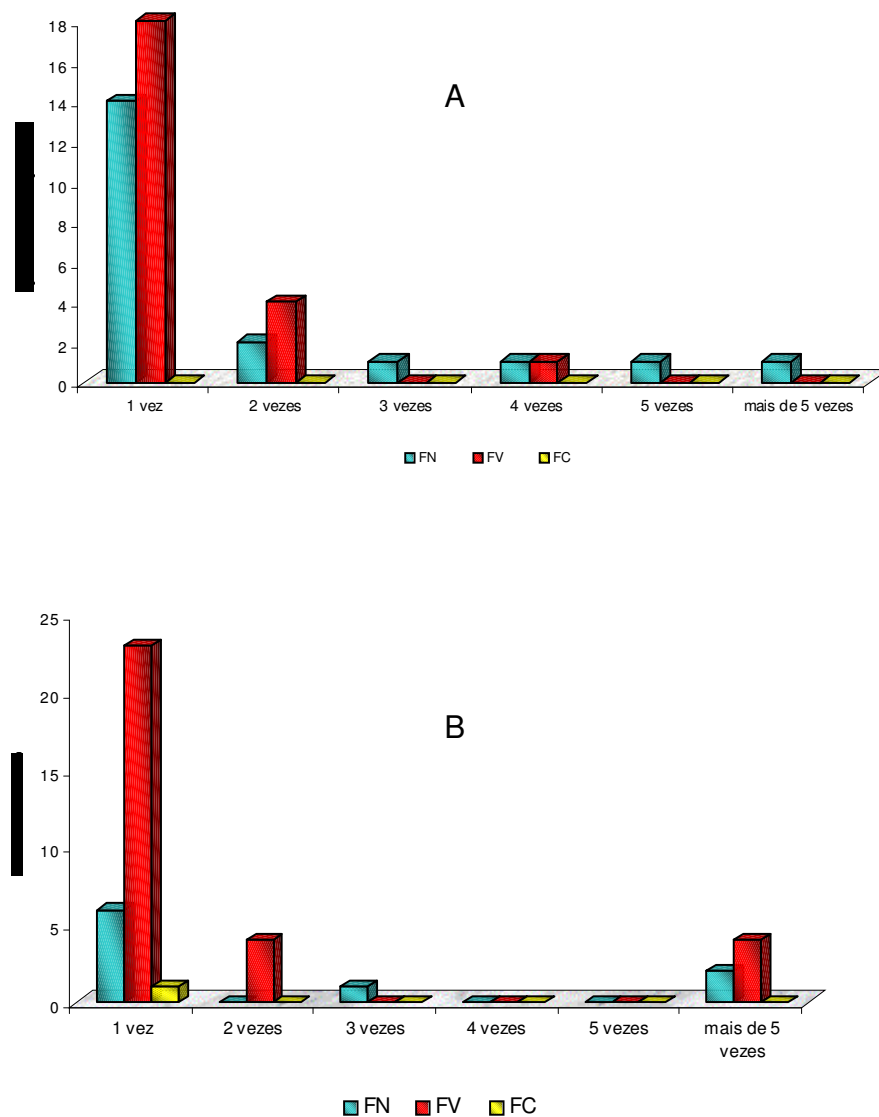


Figura 27 – Número de visitas que uma única abelha realizou às células para o comportamento de inspeção da célula contendo a cria morta (ICM). **(A)** colméia higiênica **(B)** colméia não higiênica

Como pode ser verificado, a maior tendência de visitas de inspeção é de visita uma única vez tanto na colméia higiênica quanto na colméia não higiênica, ocorrendo raramente mais vezes. Nos favos novos foram observadas visitas de inspeção de mais de 5 vezes, embora em baixas frequências, já nos favos velhos foram observadas abelhas realizando este comportamento por mais de cinco vezes apenas na colméia não higiênica, a qual também foi a única a receber apenas 1 visita de uma única operária nos favos congelados. As operárias que realizaram mais de 1 inspeção, retornaram aos favos entre 1 e 2 dias na colméia higiênica, enquanto que na colméia não higiênica, todas as operárias que realizaram mais de 1 inspeção em apenas 1 ou mais células de cria, as fizeram em um mesmo dia. Palacio (2005) também identificou abelhas realizando atividades de inspeção em ambos grupos (higiênico e não higiênico) e observou que 25,57% das abelhas que realizaram o comportamento de inspeção nas colônias higiênicas o fizeram em mais de um dia e nas colônias não higiênicas a porcentagem foi de 13,16%.

Quanto ao monitoramento individual das operárias que realizaram o comportamento específico de remoção (REM), verifica-se, através da figura 23 que da mesma forma que ocorreu no comportamento de desoperculação, a maior frequência de operárias executando o comportamento de remoção foi registrado na colméia higiênica, tanto nos favos novos como nos velhos e nos congelados. Nossos resultados são contrários àqueles encontrados por Palacio (2005) que registrou porcentagens semelhantes de abelhas realizando atividades de desoperculação e atividades de remoção (3,3% e 2 % respectivamente) nas colméias higiênicas e não higiênicas (0,7% e 0,8% respectivamente).

Do mesmo modo que nos outros quatro comportamentos já citados, para o comportamento de remoção também foi encontrada uma diferença na quantidade de vezes que uma única abelha visita a célula para o desenvolvimento da atividade específica de remoção (Figura 28).

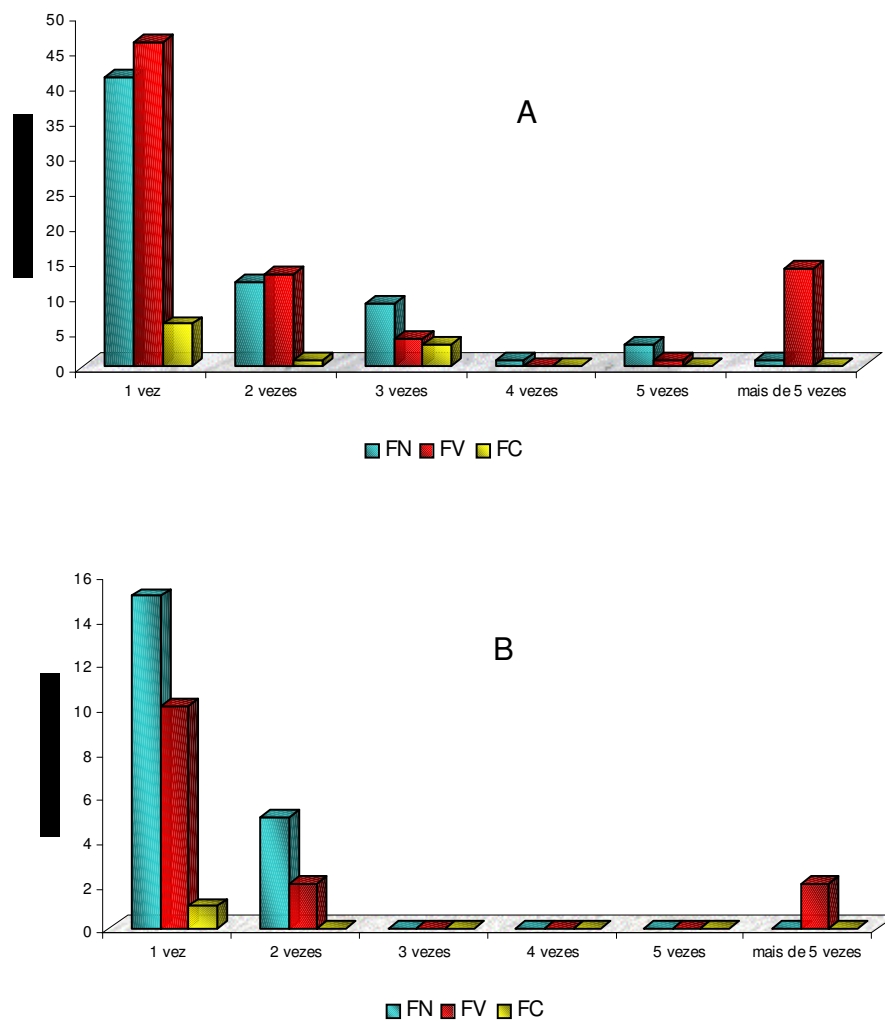


Figura 28 – Número de visitas que uma única abelha realizou às células para o comportamento de remoção da cria morta (REM). **(A)** colméia higiênica **(B)** colméia não higiênica

Como pode ser observado, a frequência de operárias que visitam as células apenas 1 vez para a atividade de remoção da cria morta, foi superior às demais nos três tratamentos e em ambas colméias, porém, ocorrendo visitas repetidas em maior frequência nas colméias higiênicas. Na colméia não higiênica, no entanto, as maiores frequências de visitas distribuíram-se em geral entre uma e duas vezes e apenas raramente nos favos velhos até mais de 5 vezes.

A remoção de crias nos favos congelados foi observada com visitas de 1 a 3 vezes nas colméias higiênicas e não higiênicas e apenas uma vez nas colméias não higiênicas. As operárias que realizaram mais de 1 remoção, retornaram aos favos entre 1 e 7 dias.

Em seus experimentos, Palacio (2005) também verificou que tanto nas colônias higiênicas quanto nas colônias não higiênicas as abelhas realizaram a atividade de remoção em dias distintos.

Do mesmo modo que no comportamento de desoperculação, foi verificado se a idade das abelhas interferem no comportamento de remoção e os valores das médias com seus respectivos desvios padrões encontram-se nas tabelas 7 a 12.

Tabela 7 – Tempo médio de remoção das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos novos das colméias higiênicas

Favos novos (remoção)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão
2	1	2	---	---	---	---
3	8	9	3	16	9	4
4	18	8	5	28	8	7
5	25	9	4	11	8	5
6	34	7	4	13	7	4
7	11	5	3	26	7	4
8	20	10	6	47	8	13
9	30	7	4	59	7	5
10	15	8	5	38	6	5
11	25	6	4	25	6	4
12	15	11	5	35	7	5
13	1	3	---	25	7	4
14	---	---	---	14	8	5
15	---	---	---	17	9	5
16	1	3	---	2	16	4
17	---	---	---	6	5	2
18	---	---	---	1	4	---
19	---	---	---	5	7	5
20	4	11	4	1	1	---
21	6	7	2	---	---	---
22	2	3	2	---	---	---
23	1	15	---			
25	---	---	---			
27	3	11	2	---	---	---
33	3	7	4	---	---	---
(P = 0.005) **				(P = 0.172)		

**** significativo a um valor de $p < 0,050$**

Tabela 8 – Tempo médio de remoção das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos velhos das colméias higiênicas

Favos velhos (remoção)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão
2	5	9	6	---	---	---
3	2	5	2	---	---	---
4	1	6	---	1	7	---
5	2	8	3	14	6	4
6	1	10	---	33	5	3
7	22	8	3	38	6	6
8	37	7	4	27	5	4
9	64	6	4	59	4	3
10	19	7	4	44	6	4
11	43	6	4	39	6	6
12	25	7	4	44	5	3
13	25	7	3	32	4	3
14	17	8	3	18	7	7
15	6	5	2	2	2	1
16	7	7	6	11	4	4
17	13	7	3	3	4	1
18	5	7	2	---	---	---
19	5	9	6	8	5	2
20	1	18	---	7	3	2
40	---	---	---	1	6	---
(P = 0.490)				(P = 0.341)		

Tabela 9 – Tempo médio de remoção das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos congelados das colméias higiênicas

Favos congelados (remoção)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão
6	6	4	2	---	---	---
7	4	4	0,05	2	9	2
8	2	2	0,01	---	---	---
9	16	3	2	---	---	---
10	6	5	2	4	3	3
11	10	5	3	1	4	---
12	4	5	2	---	---	---
13	---	---	---	1	2	---
15	8	3	2	---	---	---
17	---	---	---	3	6	3
19	6	4	4	---	---	---
23	---	---	---	1	2	---
24	10	7	4	---	---	---
42	---	---	---	1	6	---
(P = 0.078)				(P = 0.259)		

Conforme constam nas tabelas 7 a 9, observa-se que a frequência de idades nos favos velhos e congelados estiveram bem distribuídos, não apresentando diferenças, no entanto, observa-se um valor significativo nos favos novos o qual se deve ao fato de uma menor concentração de visitas das operárias mais velhas. Verifica-se que houve uma maior frequência de visitas para a remoção das crias nas abelhas com idades entre 8 a 10 dias.

Tabela 10 – Tempo médio de remoção das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos novos das colméias não higiênicas

Favos novos (remoção)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão
2	4	8	4	2	10	---
3	9	8	4	6	14	4
4	10	8	5	8	10	4
5	15	9	5	2	16	---
6	5	9	4	8	7	2
7	2	9	4	3	7	7
8	3	3	2	13	7	6
9	13	7	5	8	7	3
10	5	6	6	12	9	4
11	4	6	3	6	12	7
12	6	5	5	9	11	7
13	---	---	---	2	10	---
14	---	---	---	6	9	7
15				2	10	---
16	5	5	2	---	---	---
17				2	5	---
19	1	9	---	---	---	---
20	---	---	---	2	9	---
21	2	7	4	---	---	---
23	4	5	2	---	---	---
(P = 0.706)				(P = 0.312)		

Tabela 11 – Tempo médio de remoção das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos velhos das colméias não higiênicas

Favos velhos (remoção)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão
3	1	15	---	---	---	---
4	2	5	1	3	5	2
5	1	5	---	8	6	3
6	7	9	8	6	6	3
7	4	8	6	9	7	5
8	13	7	4	14	9	5
9	34	7	4	23	9	4
10	20	7	3	7	7	3
11	11	6	4	2	8	6
12	4	6	5	6	5	4
13	9	5	2	---	---	---
14	10	5	3	---	---	---
15	1	30	---	4	4	2
16	5	6	3	1	2	--
17	2	4	2	2	3	0
18	6	5	2	1	14	--
19	1	2	---	---	---	---
(P = 0.338)				(P = 0.052)		

Tabela 12 – Tempo médio de remoção das células de cria de acordo com a idade das operárias nos favos congelados das colméias não higiênicas

Favos congelados (remoção)						
Idade das operárias	Período diurno			Período noturno		
	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão	Qtde,	Média (minutos)	Desvio padrão
2	2	3	---	---	---	---
3	2	3	---	---	---	---
4	2	2	---	---	---	---
5	3	6	3	---	---	---
6	8	4	3	---	---	---
7	5	6	1	2	2	1
8	3	6	0,07	---	---	---
9	3	3	1	1	6	--
11	5	5	3	4	3	2
12	3	7	0,07	---	---	---
13	---	---	---	2	4	1
14	2	5	---	---	---	---
15	4	5	2	---	---	---
17	3	4	0,07	1	3	--
(P = 0.465)				(P = 0.444)		

Através das tabelas 10 a 12, que correspondem ao tempo médio de remoção de cria na colméia não higiênica, é possível verificar que não houve diferenças estatísticas significativas quanto a este parâmetro. Nos favos velhos, uma maior concentração de visitas de operárias removendo as crias, foi verificada naquelas com idades entre 8 a 10 dias, nos favos novos houve uma oscilação de idades entre 2 e 14 dias e nos favos congelados, estas freqüências estiveram mais distribuídas entre 4 e 17 dias.

Quanto às atividades realizadas em conjunto, não houve uma seqüência a ser seguida com relação à idade, isto é, as operárias efetuaram as várias atividades com idades distintas variando nos vários comportamentos já citados anteriormente,

entretanto, do mesmo modo que nos comportamentos específicos, algumas operárias efetuaram duas, três ou mais tarefas em um único dia e não mais retornaram à outras células nos dias subseqüentes.

Ainda com relação ao conjunto de tarefas realizados por uma única operária, foi verificado que não existiu preferência pelo trabalho dependendo do tipo dos favos utilizados, uma vez que algumas operárias realizaram algumas tarefas em um determinado tipo de favo e voltaram em dias subseqüentes para realizarem as mesmas ou outras tarefas em outro tipo de favo.

4.3 – Comparação do comportamento higiênico nos três tipos de tratamentos PARÂMETROS TEMPORAIS

Além de verificar se existiam diferenças comportamentais por parte das operárias nos três tipos de favos, alguns parâmetros temporais também foram alvo de estudos, e dentre estes se encontra o tempo que cada abelha trabalha na desoperculação das células e o tempo que cada uma gasta na remoção das crias mortas.

Os resultados obtidos da análise de variância com relação ao tempo de desoperculação mostraram haver uma diferença estatisticamente significativa ($p = <0.001$) quando se compara os três tratamentos (favos novos, favos velhos e favos congelados). As médias e respectivos desvios padrões encontram-se na Tabela 13 e as comparações entre os tratamentos na tabela 14.

Tabela 13 – Médios e respectivos desvios padrões para o tempo de desoperculação das células de cria em três diferentes tratamentos nas colméias higiênicas e não higiênicas

DESOPERCULAÇÃO							
HIGIÊNICA				NÃO HIGIENICA			
Tipo de favo (período da introdução)	Tam. da amostra	Média (segundos)	Desvio Padrão	Tipo de favo (período da introdução)	Tam. da amostra	Média (segundos)	Desvio Padrão
novo (noturno)	454	24	23	novo (noturno)	166	26	21
novo (diurno)	200	26	21	novo (diurno)	131	26	20
velho (noturno)	921	41	44	velho (noturno)	441	35	32
velho (diurno)	536	45	32	velho (diurno)	233	40	38
congelado (noturno)	35	32	31	congelado (noturno)	20	32	22
congelado (diurno)	101	33	27	congelado (diurno)	47	42	21

Quando se compara os três tipos de favos verifica-se que em ambos grupos (higiênica e não higiênica) as operárias gastaram um menor tempo na desoperculação das células de cria dos favos novos. É possível verificar que existiu uma proximidade entre os valores em ambas colméias no período noturno (24 e 26 segundos para as colméias higiênicas e não higiênicas, respectivamente) e a semelhança no tempo de desoperculação nos dois grupos no período diurno. Verifica-se ainda que nos favos velhos e favos congelados, embora tenham se apresentado com valores um pouco maiores entre os períodos (principalmente na colméia não higiênica e nos favos congelados da mesma), ainda assim estes também estiveram próximos quando comparados dentro do mesmo grupo, mostrando que não existe variação significativa quanto ao tempo de atividade de desoperculação das operárias entre os dois períodos. Isto nos leva a crer que tanto no período diurno quanto no período noturno, o tempo gasto para a desoperculação das células está praticamente dentro de uma mesma faixa de tempo. Desse modo, a significância encontrada entre as comparações pode estar mais relacionada ao tipo de favo onde foram realizadas as desoperculações do que ao período em que foi desenvolvida a atividade, uma vez que ao compararmos o mesmo tipo de favo entre os próprios grupos nos dois períodos do dia não foram encontradas diferenças significativas, ao passo que quando se compara os diferentes tratamentos, em alguns casos foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. Na tabela 14 constam somente os valores das comparações par a par entre os mesmos grupos e mesmo tipos de favos (mostrando não haver diferenças entre os períodos), bem como entre os diferentes tipos de favos nos dois grupos porém em um mesmo período, visto que este não exerceu influência no tempo de desoperculação. Nesta mesma tabela podem ser visualizados também os tratamentos onde foram encontradas significâncias.

Tabela 14 – Comparação entre os três tipos de favos analisados quanto à atividade de desoperculação das células de cria nas colméias higiênicas e não higiênicas**FVD:** favo velho inserido no período diurno **FVN:** favo velho inserido no período noturno**FND:** favo novo inserido no período diurno **FNN:** favo novo inserido no período noturno**FCD:** favo congelado inserido no período diurno **FCN:** favo congelado inserido no período noturno **H:** higiênica **NH:** não higiênica

DESOPERCULAÇÃO					
Comparações entre os tratamentos	Q	Significação	Comparações entre os tratamentos	Q	Significação
FND H vs FNN H	2.055	ns	FVN H vs FCN H	0.667	ns
FNN NH vs FND NH	0.0686	ns	FVN NH vs FCN NH	0.106	ns
FVD H vs FVN H	5.888	ns	FVD H vs FCD H	2.711	ns
FVD NH vs FVN NH	0.726	ns	FCD NH vs FVD NH	1.531	ns
FCD H vs FCN H	0.718	ns	FCD NH vs FNN H	4.900	**
FCD NH vs FCN NH	1.228	ns	FCD NH vs FND H	3.555	**
FVN H vs FNN H	6.533	ns	FCD NH vs FNN NH	3.476	**
FVN NH vs FNN NH	2.973	ns	FVD H vs FNN H	10.889	**
FVD H vs FND H	6.277	**	FVD H vs FND NH	5.399	**
FVD NH vs FND NH	3.091	ns	FVD H vs FNN NH	5.833	**
FCD H vs FND H	1.852	ns	FVD NH vs FNN H	6.278	**
FCD NH vs FND NH	3.425	**	FVN NH vs FNN H	6.687	**
FCN NH vs FNN NH	1.041	ns	FCN H vs FNN H	1.480	ns

Q= valor obtido no teste de comparação de Dunn's

ns – não significativo

** significativo a um $p < 0.05$

Conforme exposto na tabela 14, o tempo de desoperculação por parte das operárias parece ter sofrido mais uma influência do tipo de favo do que do período em que foi introduzido. Verifica-se que de todos os tratamentos comparados onde houveram diferenças significativas encontramos sempre os favos novos diferindo em dez comparações com os outros tipos de favos nos dois períodos e nas colméias higiênicas e não higiênicas de tal forma que podemos inferir que os favos novos

exercem alguma influência no tempo de desoperculação por parte das operárias em ambos grupos.

De um modo geral constata-se que a desoperculação dos favos novos é sempre mais rápida do que a desoperculação dos favos velhos e congelados independente do período e tanto nas colméias higiênicas como nas colméias não higiênicas.

De acordo com Townsend (1974), os favos velhos existentes em uma colônia apresentam um acúmulo de substâncias depositadas sobre a cera tais como própolis e outras substâncias solúveis em água e meios básicos. Estas substâncias então contribuem para o aumento da espessura e densidade das células, tornando o favo mais consistente, enquanto que em favos novos a cera é pura, fina e de pouca consistência, o que poderia facilitar na desoperculação (*in* Message, 1979). Este fato foi verificado no presente estudo onde observou-se que em alguns casos algumas operárias foram bastante “agressivas” na desoperculação das células de cria nos favos novos, nos quais em uma única visita, a célula que estava operculada passava a ter 75% ou mais de desoperculação, enquanto que nos favos velhos, raramente este fato foi observado.

Em se tratando da remoção das crias, do mesmo modo que no tempo de desoperculação, para este parâmetro também foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p = <0.001$). Na tabela 15 encontram-se os valores das médias e respectivos desvios padrões encontrados para os três diferentes tratamentos, e a tabela 16 registra as comparações par a par (as mesmas registradas para o tempo de desoperculação) entre os tratamentos.

Tabela 15 – Valores médios e respectivos desvios padrões para o tempo de remoção encontrados nos três diferentes tratamentos nas colméias higiênicas e não higiênicas

REMOÇÃO							
HIGIÊNICA				NÃO HIGIENICA			
Tipo de favo (período da introdução)	Tam. da amostra	Média (segundos)	Desvio Padrão	Tipo de favo (período da introdução)	Tam. da amostra	Média (segundos)	Desvio Padrão
novo (noturno)	532	7,1	5,0	novo (noturno)	119	7,7	4,8
novo (diurno)	404	8,3	5,4	novo (diurno)	162	8,3	5,7
velho (noturno)	733	5,4	4,1	velho (noturno)	192	10,7	6,8
velho (diurno)	675	7,2	4,1	velho (diurno)	187	6,9	4,5
congelado (noturno)	24	4,6	2,6	congelado (noturno)	17	3,8	2,8
congelado (diurno)	90	4,6	3,0	congelado (diurno)	73	5,1	3,0

Conforme se verifica na tabela 15 quanto à remoção das crias, constata-se que nos favos novos, os valores estiveram muito próximos em ambos os grupos (higiênica e não higiênica) e nos dois períodos, apresentando o tempo médio noturno levemente inferior ao período diurno. Entretanto, ao contrário do que ocorreu com o tempo da atividade de desoperculação, os favos novos da colméia higiênica apresentaram valores superiores quando comparados aos favos velhos, indicando que nesta colméia, as operárias levaram um maior tempo para a remover as crias dos favos novos do que dos favos velhos e congelados. No entanto, este fato pode ter explicação se consideramos que nos favos velhos ocorreu uma maior quantidade de crias sendo removidas inteiras ou totalmente quando comparada aos favos novos (45,6 % e 39,2 % das células tratadas nos favos velhos e novos respectivamente). Assim, uma maior quantidade de crias mortas permaneceram dentro das células nos favos novos sendo

removidas aos poucos e sob a forma de canibalismo, e isso fez com que houvesse um aumento no tempo médio de remoção. Os favos congelados não apresentaram diferenças quanto ao tempo de remoção, tendo apresentado as mesmas medias tanto no período noturno quanto no período diurno.

No que concerne à colméia não higiênica, a remoção das crias nos favos novos e velhos não diferiram tão claramente como na colméia higiênica. A única diferença mais visível foi a comparação entre os favos novos e velhos com favos congelados, sendo que a remoção nos favos congelados foi aproximadamente a metade do tempo gasto nos outros dois tipos de favos.

Ao compararmos par a par os tratamentos, quando se compara os três tipos de favos entre os próprios grupos, apenas os favos novos apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 16), porém do mesmo modo que no comportamento de desoperculação, o período em que o favo foi introduzido parece não ter tido influencia no comportamento de remoção da cria, uma vez que para os outros dois tratamentos (favos velhos e favos congelados) não foram encontradas diferenças significativas, assim, da mesma maneira esta diferença esteve mais relacionada ao tipo de favo do que ao período do dia em que foi introduzido.

Tabela 16 - Comparação entre os três tipos de favos analisados quanto à atividade de remoção das células de cria nas colméias higiênicas e não higiênicas**FVD:** favo velho inserido no período diurno **FVN:** favo velho inserido no período noturno**FND:** favo novo inserido no período diurno **FNN:** favo novo inserido no período noturno**FCD:** favo congelado inserido no período diurno **FCN:** favo congelado inserido no período noturno **H:** higiênica **NH:** não higiênica

REMOÇÃO					
Comparações entre os tratamentos	Q	Significação	Comparações entre os tratamentos	Q	Significação
FND H vs FNN H	3.377	**	FVN H vs FCN H	0.619	ns
FND NH vs FNN NH	3.692	**	FVN NH vs FCN NH	3.815	**
FVD H vs FVN H	8.887	ns	FVD H vs FCD H	5.689	**
FVD NH vs FVN NH	1.401	ns	FVD NH vs FCD NH	2.865	ns
FCD H vs FCN H	0.182	ns	FNN NH vs FCD H	8.769	**
FCD NH vs FCN NH	1.594	ns	FNN NH vs FCN H	4.981	**
FNN H vs FVN H	6.530	ns	FNN NH vs FVN H	11.782	**
FNN NH vs FVN NH	3.337	ns	FNN NH vs FCD NH	6.901	**
FND H vs FVD H	1.948	ns	FNN NH vs FNN H	6.915	**
FND NH vs FVD NH	1.488	ns	FNN NH vs FVD NH	5.387	**
FND H vs FCD H	6.528	**	FNN NH vs FVD H	5.892	**
FND NH vs FCD NH	3.938	ns	FND H vs FCN NH	4.116	**
FNN NH vs FCN NH	5.447	**	FND H vs FCN H	3.423	**
FNN H vs FCN H	2.378	ns	FND H vs FVN H	9.622	**
FND H vs FCD NH	4.636	**	FND NH vs FCD H	5.525	**
FVN NH vs FCD H	5.233	**	FVD H vs FCN NH	3.650	**
FND NH vs FCN NH	3.862	**			

Q= valor obtido no teste de comparação de Dunn's

ns – não significativo

** significativo a um $p < 0.05$

Conforme se verifica na tabela 16, igualmente ao comportamento anterior, de todos os valores onde houveram diferenças significativas mais da metade correspondem à comparações feitas com os favos novos, nos levando a crer que assim como na desoperculação das células de cria, os favos novos também devem exercer

alguma influência no tempo de remoção das crias morta.

Em estudos conduzidos utilizando-se de favos testes novos e velhos, embora não tenha sido encontrada diferença estatística, Message (1979) já havia constatado haver uma tendência do comportamento higiênico ser mais eficiente em favos novos.

Através da análise individual as abelhas em cada célula de cria, foi possível calcular a frequência média de visitas que cada célula recebeu das abelhas para efetuar os comportamentos de desoperculação e remoção e as tabelas 17 a 22 registram estas frequências.

Tabela 17 – Frequência média de visitas e tempos dedicados às células de cria para as atividades de desoperculação e remoção nos favos novos nas colméias higiênicas e não higiênicas

FAVO NOVO – PERIODO NOTURNO									
DESOPERCULAÇÃO						REMOÇÃO			
Grupo	Qtde de células	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (segundos)	Tempo total gasto em todas as células (segundos)	% de células em qualquer estagio de desoperculação após 24 horas	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (minutos)	Tempo total gasto em todas as células (minutos)	% de células com crias removidas após 24 horas
H	38	11,95	23,639	282	16	14	7,147	100	84
NH	40	4,15	26,043	108	78	4,8	10,745	51,576	22

Tabela 18 - Frequência média de visitas e tempos dedicados às células de cria para as atividades de desoperculação e remoção nos favos novos nas colméias higiênicas e não higiênicas

FAVO NOVO – PERIODO DIURNO									
DESOPERCULAÇÃO						REMOÇÃO			
Grupo	Qtde de células	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (segundos)	Tempo total gasto em todas as células (segundos)	% de células em qualquer estagio de desoperculação após 24 horas	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (minutos)	Tempo total gasto em todas as células (minutos)	% de células com crias removidas após 24 horas
H	35	5,71	25,790	147	28	11,54	8,262	95,4	72
NH	33	3,97	26,351	106	65	4,9	8,296	40,7	35

Ao compararmos o desempenho das abelhas na desoperculação dos favos novos no período noturno e diurno (Tabelas 17 e 18), podemos verificar que, em relação à desoperculação das células de cria, em ambos grupos houve uma maior frequência de visitas no período noturno (embora a colméia não higiênica tenha apresentado os valores muito próximos). É possível verificar ainda que, aparentemente, conforme houve um aumento da média de visitas por células, o tempo gasto por cada operária em cada visita para a desoperculação foi reduzido em ambos grupos, no entanto, ao compararmos o tempo total que as operárias trabalharam para realizar a desoperculação em todas as células de cria verifica-se que este é maior nas colméias higiênicas tanto no período diurno quanto no período noturno, ou seja, as operárias trabalham muito mais tempo desoperando as células de cria nas colméias higiênicas do que nas colméias não higiênica, o que conseqüentemente levou a uma menor porcentagem de células em qualquer estágio de desoperculação e, conseqüentemente, uma maior porcentagem de células com crias removidas após 24 horas nestas colméias.

Com relação à remoção das crias é possível verificar que a média de visitas por célula foi maior nas colméias higiênicas tanto no período diurno como noturno, não havendo diferenças quanto ao período nas colméias não higienica.

Analisando-se as tabelas 17 e 18 constata-se que, independente do tempo médio gasto em cada visita tanto no período noturno quanto no período diurno, o fato das abelhas higiênicas apresentarem uma média de visitas por célula muito superior à média das não higiênicas foi o fator responsável pela superior remoção de crias nos favos novos.

Tabela 19 - Frequência média de visitas e tempos dedicados às células de cria para as atividades de desoperculação e remoção nos favos velhos nas colméias higiênicas e não higiênicas

FAVO VELHO – PERIODO NOTURNO									
DESOPERCULAÇÃO						REMOÇÃO			
Grupo	Qtde de células	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (segundos)	Tempo total gasto em todas as células (segundos)	% de células em qualquer estágio de desoperculação	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (minutos)	Tempo total gasto em todas as células (minutos)	% de células com crias removidas
H	38	24,23	41,548	1007	5	20,34	5,427	110,4	95
NH	40	11,025	34,673	382	68	3,0	7,723	23,0	32

Tabela 20 - Frequência média de visitas e tempos dedicados às células de cria para as atividades de desoperculação e remoção nos favos velhos nas colméias higiênicas e não higiênicas

FAVO VELHO – PERIODO DIURNO									
DESOPERCULAÇÃO						REMOÇÃO			
Grupo	Qtde de células	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (segundos)	Tempo total gasto em todas as células (segundos)	% de células em qualquer estágio de desoperculação	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (minutos)	Tempo total gasto em todas as células (minutos)	% de células com crias removidas
H	39	13,74	45,034	619	11	17,31	7,191	124,46	89
NH	36	6,47	40,146	259,8	54	5,2	6,909	35,89	46

De maneira semelhante ao que ocorreu com os favos novos, ao se comparar os dados referente a atividade de desoperculação nos favos velhos verifica-se que em ambos grupos a relação existente entre a frequência de visitas / tempo médio gasto se manteve na mesma proporção. Verifica-se ainda que assim como nos favos novos, nos favos velhos uma maior frequência de visitas para a desoperculação das células ocorreu naqueles que foram introduzidos no período noturno. Quanto à remoção das crias, verificase que na colméia higiênica uma maior frequência de visitas das operárias

removedoras também foi encontrada no período noturno (20,34 visitas/célula), e a relação mais visita por célula / tempo médio gasto em cada visita, foi mantida. No entanto, o tempo total que as abelhas trabalharam em todas as células neste período foi menor quando comparado ao período diurno. Cabe aqui também ressaltar que as remoções totais podem ter afetado estes valores, uma vez que diferente da colméia não higiênica, uma maior porcentagem de remoções totais na colméia higiênica foram encontradas nos favos velhos e no período noturno. Na colméia não higiênica, a maior frequência de visitas das operárias removedoras ocorreu no período diurno (5,2 visitas/célula), onde as operárias trabalharam um maior tempo em todas as células de cria (35,89), resultando em uma maior porcentagem de crias removidas neste período diurno (4,6%) comparada com o noturno (32%).

Como pode ser visto, o comportamento higiênico pode apresentar-se de forma bastante variável dentro de uma colméia com relação aos comportamentos realizados pelas operárias, as quais podem variar em tempos gastos para o desempenho de uma determinada atividade, frequências de visitas, tempos totais trabalhados nos diferentes períodos do dia, etc, e talvez esta alta variabilidade de comportamentos e de tempos gastos nos diferentes períodos do dia, tenha sido o motivo de não termos encontrado diferenças estatisticamente significativas entre alguns parâmetros.

Dos três tipos de favos analisados, os favos congelados apresentaram dados bem diferentes aos outros dois tipos em relação aos períodos diurno e noturno. Os dados constam nas tabelas 21 e 22.

Tabela 21 - Frequência média de visitas e tempos dedicados às células de cria para as atividades de desoperculação e remoção nos favos congelados nas colméias higiênicas e não higiênicas

FAVO CONGELADO – PERIODO NOTURNO									
DESOPERCULAÇÃO						REMOÇÃO			
Grupo	Qtde de células	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (segundos)	Tempo total gasto em todas as células (segundos)	% de células em qualquer estágio de desoperculação	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (minutos)	Tempo total gasto em todas as células (minutos)	% de células com crias removidas
H	40	0,875	32,057	28	92	0,6	4,583	2,7	8
NH	40	0,5	32	16	94	0,4	3,765	1,6	6

Tabela 22 - Frequência média de visitas e tempos dedicados às células de cria para as atividades de desoperculação e remoção nos favos congelados nas colméias higiênicas e não higiênicas

FAVO CONGELADO – PERIODO DIURNO									
DESOPERCULAÇÃO						REMOÇÃO			
Grupo	Qtde de células	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (segundos)	Tempo total gasto em todas as células (segundos)	% de células em qualquer estágio de desoperculação	Média de visitas por célula	Tempo médio gasto em cada visita (minutos)	Tempo total gasto em todas as células (minutos)	% de células com crias removidas
H	40	2,5	32,871	83	87	2,25	4,622	10,4	13
NH	40	1,2	42,404	49,8	88	1,80	5,123	9,3	12

Verifica-se que contrariamente ao que ocorreu nos favos novos e velhos, nos favos congelados em todos os parâmetros analisados, obteve-se uma maior média no período diurno em ambos grupos, mostrando claramente que apenas nesta situação o comportamento higiênico mostrou-se mais eficaz neste período.

Além de ter sido calculado os tempos totais gastos pelas operárias no trabalho de desoperculação e remoção da cria e de verificar a frequência média de cada visita, outro parâmetro temporal de extrema importância foi analisado. Trata-se do tempo em

que uma célula onde já havia sido iniciado o processo de remoção e que ainda continha a cria a ser removida permaneceu sem a visita de operárias removedoras. A este parâmetro, demos o nome de tempo ocioso do comportamento higiênico das abelhas.

Os resultados obtidos mostraram haver diferenças significativas entre as duas colméias ($P = <0.001$) cujas medias estão representadas na tabela 23 e as comparações par a par na tabela 24.

Tabela 23 – Média dos tempos ociosos encontrados nas colméias higiênica e não higiênica nos três tipos de favos

FVN = favos velhos inseridos no período noturno; **FVD** = favos velhos inseridos no período Diurno; **FND** = favos novos inseridos no período noturno; **FNN** = favos novos inseridos no período noturno; **FCD** = favos congelados inseridos no período diurno; **FCN** = favos congelados inseridos no período noturno

TEMPO OCIOSO									
HIGIÊNICA					NÃO HIGIÊNICA				
Tipo de favo	Qtde de visitas	Média (minutos)	Tempo ocioso total (minutos)	Desvio Padrão	Tipo de favo	Qtde de visitas	Média (minutos)	Tempo ocioso total (minutos)	Desvio Padrão
FVN	1104	16	17,664	24	FVN	575	65	37,375	114
FVD	716	19	13,604	31	FVD	350	51	17,850	96
FND	381	11	4,191	20	FND	201	11	2,211	19
FNN	773	8	6,181	16	FNN	282	26	7,332	55
FCD	120	23	2,760	48	FCD	74	30	2,220	98
FCN	33	59	1,947	120	FCN	27	48	1,296	69

Ao compararmos a tabela 23 verifica-se que excetuando os favos congelados que foram introduzidos no período noturno e favo novo diurno, o tempo ocioso, o tempo ocioso nas células de crias na colméia higiênica apresentou-se menor na maioria dos casos quando comparados à colméia não higiênica.

Tabela 24 – Comparações entre os três tipos de favos relacionados aos tempos ociosos nas colméias higiênica e não higiênica

TEMPO OCIOSO					
Comparações entre os tratamentos	Q	Significação	Comparações entre os tratamentos	Q	Significação
NH - FVN vs H - FVN	9.261	ns	NH - CN vs H - FNN	4.895	**
NH - FVD vs H - FVD	8.378	**	NH - CN vs H - FND	4.183	**
NH - FND vs H - FND	0.367	ns	NH - CN vs NH - FND	3.914	**
NH - FNN vs H - FNN	6.306	**	NH - CN vs H - FVD	3.369	**
H - CD vs NH - CD	1.971	ns	NH - FVD vs H - FNN	13.186	**
NH - CN vs H - CN	1.178	ns	NH - FVD vs H - FND	9.745	**
NH - FVN vs H - FNN	14.400	**	NH - FVD vs NH - FND	7.786	**
NH - FVN vs H - FND	10.065	**	H - CN vs H - FNN	3.686	**
NH - FVN vs NH - FND	7.716	**	H - CD vs H - FNN	6.571	**
NH - FVN vs H - FVD	8.747	**			

Q= valor obtido no teste de comparação de Dunn's

ns – não significativo

** significativo a um $p < 0.05$

As maiores diferenças encontradas estiveram relacionadas aos favos velhos e embora não tenha sido encontrada diferença significativa (tabela 24) devido ao grande desvio padrão existente, nota-se claramente que este apresentou-se com uma maior diferença nos favos que foram introduzidos em período noturno. Em todas as outras comparações realizadas, os favos novos mostraram uma diferença estatisticamente significativa (tabela 24).

Com relação aos favos novos, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos apenas naqueles introduzidos em período diurno, uma vez que as médias encontradas para os tempos ociosos foram semelhantes (tabela 23). Para os favos congelados, quando comparados entre os grupos, não houve diferenças em nenhum dos dois períodos, no entanto, ao se comparar com os demais tipos de favos, as diferenças mostraram um resultado significativo.

Pelas tabelas 23 e 24 constata-se que o maior tempo ocioso das abelhas ocorreu nos favos velhos, tanto na colméia higiênica (17,664 minutos) como na colméia não higiênica (37,375 minutos). No entanto, embora apenas quatro comparações de médias não tenham sido estatisticamente diferentes, as demais mostraram diferenças ($p < 0.001$). A grosso modo, constatou-se também que, em relação ao total de visitas nos três tipos de favos inseridos em ambos períodos do dia, o maior número de visitas ocorreu na colméia higiênica (3.127 visitas) contra menos da metade na colméia não higiênica (1.509 visitas). No total do tempo ocioso das abelhas no comportamento higiênico obteve-se uma menor estimativa de tempo ocioso das abelhas higiênicas (772 horas) comparada com as não higiênicas (1.138 horas). Esses resultados embora representem uma estimativa de atividades ociosas, justificam claramente a superior atividade de remoção das abelhas na colméia higiênica nos três tipos de favos testados. Portanto, comprova-se que o tempo ocioso do comportamento higiênico das abelhas em uma célula de cria pode contribuir de forma significativa no tempo total de um processo de remoção da cria, e desse modo, aliado ao fator genético, ele pode ser considerado um fator determinante na classificação de uma colméia em higiênica ou não higiênica nos testes de avaliação do comportamento higiênico em colônias de abelhas africanizadas.

5 – Conclusões e considerações finais

O monitoramento das atividades das abelhas africanizadas no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- ✓ Nos três tipos de favos, além dos comportamentos de desoperculação e remoção da cria, etapas ou características do comportamento higiênico, as operárias ainda desempenham outros três comportamentos: inspeção pré desoperculação na célula de cria que ainda se encontra operculada, introdução das antenas nos orifícios do opérculo após a perfuração ou pontuação da célula (evidenciando a percepção sensorial da cria morta pelas sensillas das antenas) e inspeção da cria que está sendo removida;
- ✓ Existem operárias que são especializadas em desempenhar comportamentos específicos dentro da colméia durante as etapas do comportamento higiênico, ou seja, algumas apenas pré inspecionam as células, algumas somente introduzem as antenas no interior das células de crias, outras apenas inspecionam as células contendo as crias mortas, doentes, danificadas ou com parasitas, outras somente desoperculam e outras somente removem as crias. Entretanto, existem também operárias que realizam duas ou mais tarefas diferentes relacionadas ao comportamento higiênico;
- ✓ As operárias realizam as atividades do comportamento higiênico em idades distintas, em qualquer tipo de favo e iniciam tais atividades com idades bastante jovens (2 dias);
- ✓ As operárias são mais ativas na desoperculação das células de cria quando apresentam idades entre 3 a 14 dias;

- ✓ As operárias são mais ativas na remoção das crias mortas, doentes ou danificadas ou parasitadas quando apresentam idades entre 2 a 14 dias;
- ✓ A idade das operárias não influencia no tempo de desoperculação das células ou remoção das crias;
- ✓ Existem operárias que visitam as células de cria apenas uma vez para a realização de uma determinada atividade relacionada ao comportamento higiênico. No entanto, existem outras que retornam para o desempenho destas atividades duas ou mais vezes, sendo que estes retornos podem ser no mesmo dia ou em dias subsequentes;
- ✓ A quantidade de operárias que visitam as células apenas uma vez para o desempenho de uma determinada é superior à quantidade de operárias que visitam as células duas ou mais vezes (principalmente nos favos novos e velhos) tanto na colméia higiênica quanto na colméia não higiênica;
- ✓ O tipo de favo exerce influência no tempo de desoperculação pelas operárias, sendo que gastam um menor tempo para desopercular as células existentes nos favos novos comparados aos favos velhos e congelados;
- ✓ O período do dia (diurno ou noturno) não exerce influência no tempo de desoperculação das células de cria nos três tipos de favos, mostrando que tanto em período diurno quanto em período noturno, as operárias desoperculam as células de cria dentro de uma mesma faixa de tempo;
- ✓ A quantidade de operárias que reoperculam as células de cria é maior nas colméias não higiênicas;
- ✓ O tipo de favo exerce influência no tempo de remoção das crias mortas, as quais são removidas mais rapidamente dos favos novos;

- ✓ Não existe influencia do período do dia (diurno ou noturno) no tempo de remoção das crias pelas operárias;
- ✓ Nas colméias higiênicas as operárias removem com maior frequência as crias inteiras do que em pedaços comparadas às colméias não higiênicas que apresentam maior frequência de remoção parcial, comendo as crias (canibalismo).
- ✓ Durante o comportamento higiênico as operárias das colméias higiênicas apresentam uma média de visitas por célula bem superior a média das operárias das colméias não higiênicas, tanto nas etapas de desoperculação como de remoção;
- ✓ O tempo ocioso do comportamento higiênico das abelhas nas colméias não higiênicas é bem superior ao tempo ocioso das colméias higiênicas;

Embora sejam encontrados muitos trabalhos a respeito do comportamento higiênico na literatura, a grande maioria os relaciona sempre com as doenças da cria de uma maneira prática, uma vez que o mesmo é considerado um mecanismo natural contra doenças das crias em abelhas..Outros trabalhos, porém em menor quantidades se baseiam apenas na consequência desse comportamento para a colônia, onde o resultado final vai levar à desoperculação das células e remoção das crias mortas, doentes ou infestadas. Desse modo, pouquíssimos trabalhos foram feitos a respeito de como se processa o comportamento higiênico dentro de uma colônia. Assim, a presente tese foi realizada para responder algumas questões que ainda permaneciam obscuras acerca deste comportamento. Para tal, duas questões principais tornaram-se alvos desta pesquisa:

“O que realmente ocorre e como as operárias se comportam dentro de uma colônia quando se realiza um teste de comportamento higiênico?”

“Além do fator genético, existem outros fatores que também contribuem para uma menor ou maior porcentagem de crias removidas no período de 24 horas, o que conseqüentemente a classificaria em higiênica ou não higiênica?”

Assim, na tentativa de responder as questões acima constatamos que , de um modo geral, o comportamento higiênico tem um padrão semelhante tanto em colméias higiênicas quanto em colméias não higiênicas quanto às várias tarefas desenvolvidas. Verificou-se também que algumas operárias são mais ativas ao desopercular as células do que outras. Algumas fazem apenas minúsculos orifícios (pontuação) no opérculo das células de crias e, a partir daí, aumentam-no em visitas subseqüentes, outras logo na primeira visita que realizam à célula já executam o processo de desoperculação de uma só vez.

Constatamos que , após a desoperculação das células, dá-se início ao processo de remoção da cria morta, danificada ou infestada, atividade que pode apresentar-se também de forma variada, podendo ocorrer parcialmente (remoção aos poucos comendo partes da cria, canibalismo) ou totalmente, removendo a cria inteira. Algumas vezes a cria é puxada para fora da célula por duas ou mais operárias, ficando todas elas executando o mesmo processo de remoção. Em outras, durante a retirada da cria, vem uma ou outra operária e arranca parte desta cria (como por exemplo a cabeça inteira) e isso faz com que ocorra uma diferença no tempo de remoção. Em certos casos constatamos que a operária que remove a cria parcialmente sai bruscamente da célula, levando consigo os pedaços da cria. É provável que estas variações de comportamento durante a remoção, possam explicar o fato de alguns processos serem mais demorados do que outros, mesmo dentro de uma mesma colônia. Um outro fator que contribui para um menor tempo nos processos de remoção relaciona-se à remoção total, isto é, remoção da cria inteira e não em pedaços , o que ocorre com maior freqüências nas colméias higiênicas do que nas colméias não higiênicas. .

No presente estudo, comprovou-se também que realmente existe uma divisão de tarefas por parte das operárias com relação aos diferentes tipos de comportamento. específicos. Verificou-se, por exemplo, que operárias que somente desempenham o

comportamento de inserção das antenas no interior das células de cria, toda vez que visitavam a célula realizavam este comportamento. Quando o processo de desoperculação já tinha se iniciado e a abelha retornava, ela apenas inseria as antenas e nem tocava no opérculo, porém quando nesta mesma célula já tinha se iniciado o processo de remoção, esta operária passava por cima da célula, ignorando-a e a seguir desempenhava a mesma atividade porém em células que se encontrava em outra região do favo.

Finalmente constatamos que o monitoramento individual das abelhas marcadas, graças à técnica especial de filmagens contínuas em colméias de observação, além de comprovar a importância de se trabalhar com favos novos, que mostram os melhores resultado nos testes de comportamento higiênico, evidenciam novas funções ou atividades das abelhas nesse importante comportamento.

Finalmente constatamos que, como resultado do detalhamento do comportamento higiênico, foram identificadas as seguintes novas funções: inspeção pré desoperculação, inserção das antenas nos orifícios dos opérculos das células de crias, revelando um novo tipo de inspeção sensorial das abelhas dentro das células de cria pelas sensillas sensoriais das antenas (*sensilla placodea*, *sensilla coeloconica* etc), inspeção da cria morta e tempo ocioso do comportamento higiênico das abelhas, atividades essas que serviram inclusive para demonstrar experimentalmente e pela primeira vez o superior comportamento de remoção das crias mortas pelas operárias das colméias higiênicas em relação as não higiênicas. Tais resultados representam um importante subsídio para as pesquisas apícolas, justificando a importância de se usar essa característica comportamental das abelhas (comportamento higiênico ou de limpeza) nos programas de seleção e melhoramento das abelhas africanizadas.

6. BIBLIOGRAFIA

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

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

Arathi, H.; Ho, G. and Spivak, M. 2006. Inefficient task partitioning among nonhygienic honeybees, *Apis mellifera* L., and implications for disease transmission. *Animal behaviour*, **72**, 431-438

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

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

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

Correa-Marques, M. H., 1996. Aspectos da resistência da abelha *Apis mellifera* ao acaro *Varroa jacobsoni* no Brasil. Dissertação de Mestrado. FFCLRP-USP, 113p

Cosenza, G. W.; Silva, T. 1972. Comparação entre a capacidade de limpeza de favos da abelha africana, da abelha caucasiana e de suas híbridas. *Ciência e Cultura*, 24 (12), 1153-1158

De Jong, D. and Gonçalves, L. S. 1981. The Varroa problem in Brazil.

American Bee Journal. **121**: 186-198

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

De Jong, D. & Gonçalves, L. S. 1998. The africanized bees of Brasil have become tolerant to *Varroa*. *Apiacta* (**33**), p65-70.

Flores, J. M., Ruiz, J. A., Ruz, J. M., Puerta, F. y Campano, F. 1998. El comportamiento higiénico en la selección de abejas (*Apis mellifera* L.) tolerantes al parasito *Varroa jacobsoni* Oud. Actas del III Congresso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica SEAE. 499-504

Flores Serrano, J. M., Afonso Pires, S. M. y Puerta Puerta, F. 2001. Comportamento higiénico de *Apis mellifera iberica* em células de criação de obreiras artificialmente infestadas com o parasita varroa. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **96** (538), 71-74

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

Gonçalves, L. S. 1974 The introduction of the African bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America. *American Bee Journal*, **114** (11): 414, 415, 419p;

Gonçalves, L. S.; Stort, A. C. 1994. Africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas . II. Capítulo 4 do livro Venenos Animais. Uma visão integrada. Editora de Publicações Científica Ltda.EPUC. São Paulo, p. 49-63.

- Gonçalves, L. S. 2004. The big challenge: Development of beekeeping with Africanized honey bees in Northeast Brazil. Proceeding of the 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto, SP, Brasil, p 241-246;
- Gonçalves, L. S. 2004. Expansão da apicultura brasileira e suas perspectivas em relação ao mercado apícola internacional. Anais do XV Congresso Brasileiro de Apicultura e 1º Congresso Brasileiro de Meliponicultura, Natal – RN, Brasil
- Gonçalves, L. S. 2006. 50 anos de abelhas africanizadas no Brasil. Anais do 16º Congresso Brasileiro de Apicultura e 2º Congresso Brasileiro de Meliponicultura, Aracaju – SE, Brasil, p 1-3;
- Gramacho, K. P. 1995. “Estudo do comportamento higiênico em *Apis mellifera* como subsidio a programas de seleção e melhoramento genético em abelhas”. Dissertação de Mestrado. FFCLRP – USP, 108p.
- Gramacho, K. P. 1999. “Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas *Apis mellifera*”. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, 220p
- Gramacho, K. P. e Gonçalves, L. S. 1997. Comportamento higiênico em *Apis mellifera* e novas perspectivas sobre o controle da Varroatose. *Mensagem doce*. n. **41**, p. 4-9.
- Gramacho, K. P.; Spivak, M. 2003. Differences in olfactory sensitivity and behavioural responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behav Ecol Sociobiol.* **54**, 472-479

- Guerra Jr., J. C. V., Gonçalves, L. S. and De Jong, D. 2000. Africanized honey bees (*Apis mellifera*) are more efficient at removing worker brood artificially infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans than are Italian bees or Italian/Africanized hybrids. *Genetics and Molecular Biology*. **23**,1, 89-92
- Invernizzi, C. 2001. Resistencia a la enfermedad de cria yesificada por colonias de *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higienico (Hymenoptera: Apidae). *Iheringia*, Sér. Zool., Porto Alegre, **(91)**: 109-114
- Invernizzi, C. y Corbella, E. 1999. Edad de las obreras que realizan comportamiento higienico y otros comportamientos en las abejas *Apis mellifera*. *Revista de Etologia*, Vol.1, Nº 2, 79-87
- Kamel, S. M.; Strange, J. P.; Sheppard, W. S. 2003. A scientific note on hygienic behavior in *Apis mellifera lamarckii* and *A. m. carnica* in Egypt. *Apidologie*, **34**, 189-190
- Kefuss, J.; Taber, S. III; Vanpoucke, J.; Rey, F. 1996. A practical method to test for disease resistance in honey bees. *American Bee Journal* 136, 31-32
- Kraus, B.; Velthuis, H. H. W. 1997. High humidity in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood nest limits reproduction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Naturwissenschaften* **84**, 217-218
- Janmaat, A. F.; Winston, M. L. 2000. The influence of pollen storage area and *Varroa jacobsoni* Oudemans parasitism on temporal caste structure in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*, **47**, 177-182
- Lambin, M.; Déglise, P. and Gauthier, M. 2005. Antennal movements as indicators of odor detection by worker honey bees. *Apidologie*, **36**, 119-126

- Lapidge, K. L., Oldroyd, B. P. and Spivak, M. 2002. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften* **89**, 565-568
- Masterman, R., Ross, R., Mesce, K. and Spivak, M. 2001. Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A*, **187**: 441-452
- Message, D. 1979. Efeito das condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas *Apis mellifera*. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, 136p
- Milne, C. P. Jr. 1983. Honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behaviour and resistance to chalkbrood . *Annals of the Entomological Society of America* **78**, 841-844.
- Moretto, G. 1988. Efeito de diferentes regiões climáticas brasileiras e de tipos raciais de abelhas *Apis mellifera* na dinâmica de populações do ácaro *Varroa jacobsoni*. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, 105p
- Moretto, G., Gonçalves, L. S. and De Jong, D. 1991. Africanized bees are more efficient at removing *Varroa jacobsoni* – Preliminary Data. *American Bee Journal*. V.**131**, n.7, p.434
- Moretto, G.; Gonçalves, L.S. and De Jong, D. 1993. Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. *Revista Brasileira de Genética*, v.**16**, n.1, 71-77
- Moretto, G.; Gonçalves, L. S.; De Jong, D. 1996. Relación entre la disponibilidad de alimento y la habilidad reproductiva del ácaro. *Vida Apícola*, nº **78**, 45-47

- Moretto, G.; Gonçalves, L. S.; De Jong, D. 1997. Relationship between food availability and the reproductive ability of the mite *Varroa jacobsoni* in africanized bee colonies. *American Bee Journal*, 67-69
- Moretto, G.; Mello Jr, L. J. 1999. *Varroa jacobsoni* infestation of adult africanized and italian honey bees (*Apis mellifera*) in mixed colonies in brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **22**, 3, 321-323
- Moritz, R. F. A. 1988. A reevaluation of the two locus model for hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera*) *J.Hered.*, v.**79**, 257-262
- Moretto, G. 1993. Estudo de algumas variáveis relacionadas a um mecanismo de defesa de operárias de *Apis mellifera* à varroatose e à taxa de reprodução do acaro *Varroa jacobsoni*. Tese de Doutorado. FMRP-USP, 115p
- Palacio, M. A., Figini, E. E., Ruffinengo, S. R., Rodriguez, E. M., Del Hoyo, M. L. and Bedascarrasbure, E. L. 2000. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. *Apidologie* **31**, 471-478
- Palacio, M. A. 2005. Relación *Apis mellifera* – *Aschospaera apis* estudio del comportamiento higiénico. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Agrárias – Universidad Nacional de Mar del Plata, 216p
- Pires, S. M. A.; Josa, A.; Martins, A.; Costa, A. 2006. Estudo de alguns métodos usados para avaliar o comportamento higiênico de ecotipos locais de abelhas Portuguesas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **101** (557-558) 45-49
- Rath, W. and Drescher, W. 1990. Response of *Apis cerana* Fabr towards brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie* **21**, 311-321

- Spivak, M. and Reuter, G. S. 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **32**, 555-565
- Stort, A. C. e Gonçalves, L. S. 1994. A africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas – I. In: BARRAVIERA, B. (ed.) Venenos Animais: Uma visão integrada, Rio de Janeiro, Publicações Científicas, Cap. 3 p 33-47
- Taber, S. 1986. Breeding bees resistant to chalkbrood disease. *American Bee Journal* **126**:823-825
- Tofilski, A. 2002. Influence of age polyethism on longevity of workers in social insects. *Behav Ecol Sociobiol.* **51**:234-237
- Visscher, P. K. 1983. The honey bee way of death: necrophoric behavior in *Apis mellifera* colonies. *Anim. Behav.* **v.3**, 1070-1076
- Winston, M. L. 2003. A biologia da abelha. Livraria e Editora Magister. Porto Alegre, RS – Brasil, 276p