

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM *Melipona  
quadrifasciata anthidioides*  
(APIDAE, MELIPONINAE)**

**Jossimara Neiva de Jesus**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2016**

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM *Melipona quadrifasciata anthidioides*, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE)**

**Jossimara Neiva de Jesus**

Zootecnia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Produção e Manejo de Não Ruminantes).

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

**Coorientador:** Dr. Emerson Dechechi Chambó

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

J58e	<p>Jesus, Jossimara Neiva de. Estudo do comportamento higiênico em <i>Melipona quadrifasciata</i> anthidioides (Apidae, Meliponinae) / Jossimara Neiva de Jesus. _ Cruz das Almas, BA, 2016. 58f.; il.</p> <p>Orientador: Carlos Alfredo Lopes de Carvalho. Coorientador: Emerson Dechechi Chambó.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Abelha sem ferrão – Higiene. 2.Abelha sem ferrão – Comportamento. 3.Entomologia – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 595.799</p>
------	---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM *Melipona  
quadrifasciata anthidioides* (APIDAE, MELIPONINAE)**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Jossimara Neiva de Jesus

Aprovada em: 19 de julho de 2016

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Orientador

Profª Drª Gení da Silva Sodré  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Examinador Externo

Profª Drª Patricia Faquinello  
Instituto Federal Goiano  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus Pais que  
abdicaram de seus sonhos para garantir  
com muita dignidade os meus.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a coordenação do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) pela oportunidade para minha formação.

À FAPESB pela concessão da bolsa de estudo que tornou possível a realização dessa Pós- graduação (TERMO DE OUTORGA BOL0253/2014).

Ao meu Orientador do Curso de Mestrado Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho agradeço pela confiança e oportunidade de aprendizado durante toda minha trajetória científica.

Agradeço ao meu Coorientador Dr. Emerson Dechechi Chambó por suas contribuições essenciais para o brilho deste trabalho.

Ao Professor Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela importante contribuição nas análises estatísticas.

Aos companheiros do Grupo de Pesquisa INSECTA pelos conhecimentos compartilhados.

Em nome do Amigo de todas as horas e Funcionário Elielson Lima Aquino agradeço a todos os servidores da Fazenda Experimental/UFRB pelo cuidado no fornecimento de material para a realização da pesquisa.

Agradeço aos meus pais José Xavier de Jesus e Maria das Graças Neiva de Jesus por todo amor, zelo, incentivo e apoio em mais essa conquista.

Agradeço a toda minha família, em especial a Adriana Neiva, Lucas Almeida e Nilva Xavier pelo apoio constante e preciosas orações que trouxeram confiança e serenidade.

Muito obrigada!

## ESTUDO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM *Melipona quadrifasciata anthidioides* (APIDAE, MELIPONINAE)

**RESUMO:** O comportamento higiênico (CH) executado pelas abelhas, com a capacidade de detecção e remoção das crias mortas, doentes ou parasitadas, aumenta os índices de sanidade das colônias. Esse estudo teve como objetivo avaliar o CH em 40 colônias não selecionadas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* por meio do método de congelamento de crias com nitrogênio líquido. Para aplicação do nitrogênio líquido, em cada colônia foi delimitada uma área de cria contendo sete células de pupa de olho negro e sete larvas de último instar. As observações foram realizadas após o congelamento das células em 14 tempos (3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 264 h). As variáveis analisadas foram a proporção média acumulada de remoção de larvas (RL) e pupas (RP) mortas, e a proporção média acumulada de células desoperculadas com larvas (DL) e pupas (DP) mortas ainda não removidas. Cada colônia foi avaliada em três períodos diferentes de observação e consideradas higiênicas àquelas com remoção acima de 95% em 48 horas em pelo menos dois ensaios. O tamanho da população de cada colônia foi estimado antes de cada teste a partir da mensuração do número de células de cria. Os efeitos de tempo e população sobre as variáveis foram avaliados por meio de modelos de regressão logística. Os resultados mostraram que a RL foi mais eficiente do que a RP, totalizando 30 (75%) das 40 colônias com remoção maior do que 95% dentro de 48 h em pelo menos duas observações e para RP apenas seis (15%) das 40 colônias. A média do número de dias para a remoção de todas as larvas mortas por congelamento foi de 2,90 dias e para pupas de 5,02 dias. Os percentuais de DL e DP encontrados foram de 4,81% e 1,44%, respectivamente dentro de 48 h. A variação na estimativa da população de abelhas entre as colônias influenciou apenas na remoção de pupas. Colônias com maior estimativa de população concluíram a RP em menor tempo quando comparada às colônias menores para remoção de crias de mesma idade. Estas descobertas relataram pela primeira vez o CH em *M. q. anthidioides* e confirmaram que as operárias têm mais dificuldade para a remoção de pupas em comparação as larvas.

**Palavras chave:** Abelhas sem ferrão; Colônias higiênicas; Meliponicultura; Sanidade das abelhas

## **HYGIENIC BEHAVIOR STUDY IN *Melipona quadrifasciata anthidioides*, 1836 (APIDAE, MELIPONINAE)**

**ABSTRACT:** The hygienic behavior (HB) performed by bees, as the detection and removal of dead broods, increases the health indices of the colonies. This study aimed to evaluate the HB in 40 colonies not selected of *Melipona quadrifasciata anthidioides* through the freezing brood method with liquid nitrogen. For the application of liquid nitrogen, in each colony was delimited a creating area with seven cells containing black eyed pupae and seven last instar larvae. Observations were made after freezing the cells at 14 times (3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 and 264 h). The variables analyzed were the cumulative average rate of removal of larvae (RL) and dead pupae (RP), and the average cumulative proportion of decapped cells with larvae (DL) and dead pupae (DP) not removed yet. Each colony was held in three different periods of observation and considered hygienic to that presented above 95% removal in 48 hours in at least two trials. All colonies evaluated for HB had the size of the estimated population before each test, from the measurement of the number of brood cells. The effects of time and population on the variables were assessed using logistic regression models. The results showed that the RL was more efficient than the RP total 30 (75%) of 40 colonies with higher removal than 95% within 48 hours in at least two points and RP only six (15%) of the 40 colonies. The average number of days to remove all larvae killed by freezing was 2.90 days and 5.02 days for pupae. The percentages of DL and DP were found 4.81% and 1.44% respectively within 48 hours. The change in the estimate of the population of bees between colonies only influenced the removal of pupae. Colonies with the highest estimate of the population have completed the RP in less time compared to smaller colonies for removal of the same age offspring. These findings first reported in CH *M. q. anthidioides* and confirmed that the workers have more difficulty to the removal pupae compared larvae.

**Keywords:** Beekeeping; Hygienic colonies; Stingless bees; The bees sanity



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> Lepeletier, 1836 .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Meliponicultura .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3</b>	<b>Comportamento Higiênico .....</b>	<b>5</b>
2.3.1	Métodos de estudo do comportamento higiênico.....	6
2.3.2	Bases genéticas para o comportamento higiênico.....	7
2.3.3	Fatores que influenciam o Comportamento Higiênico .....	8
2.3.1.1	<i>Fatores Internos às colônias</i> .....	9
2.3.1.2	<i>Fatores externos às colônias</i> .....	10
2.3.4	Comportamento Higiênico em Abelhas sem ferrão.....	11
<b>CAPÍTULO 1 – COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM <i>MELIPONA QUADRIFASCIATA ANTHIDIOIDES</i> (APIDAE, MELIPONINAE).....</b>		<b>13</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas são importantes polinizadoras, aumentando a produção de frutos e sementes. Além disso, os produtos da colônia, tais como o mel, cera, geleia real, própolis, geoprópolis, samburá são muito apreciados e comercializados.

Dentre as abelhas, as espécies dos gêneros *Apis* e *Melipona* são as de maior destaque, pois com manejo adequado possuem boa resposta produtiva. Entretanto, como em qualquer atividade de produção animal, as abelhas são suscetíveis a doenças, parasitas e contaminações diversas.

Ao longo da evolução as abelhas desenvolveram mecanismos de defesa como o comportamento higiênico para o controle de organismos patogênicos e contaminantes dentro da colônia. Esse comportamento é uma característica genética, executado pelas abelhas operárias para detectar crias mortas ou doentes e proceder com a sua remoção. Isso contribui para a sanidade da colônia, uma vez que retira a fonte patogênica antes de sua proliferação.

O comportamento higiênico é muito estudado em colônias do gênero *Apis* para as doenças de cria. Além disso, o comportamento higiênico tem sido utilizado como critério de seleção em programas de melhoramento genético, pois estudos evidenciam uma associação positiva significativa entre colônias higiênicas e produção de mel e pólen. Em abelhas sem ferrão estudos sobre o comportamento higiênico são escassos.

Em virtude da necessidade de estudos a respeito da sanidade de abelhas sem ferrão, este trabalho estuda o comportamento higiênico de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 através do congelamento de crias utilizando nitrogênio líquido.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As abelhas são insetos de reconhecida importância desde as civilizações mais antigas, as quais utilizavam as abelhas em suas artes, ciências, rituais religiosos e na utilização de seus produtos (BISHOP, 2005).

Atualmente as abelhas têm sido estudadas em várias partes do mundo sob diversas perspectivas, devido a sua importância social, econômica e ambiental, por realizar em praticamente todos os biomas um dos mais importantes serviços ao meio ambiente, à polinização (CHAMBÓ, 2016).

Ollerton *et al.* (2011) relataram que 87,5% das plantas com flores dependem da polinização, principalmente realizada por abelhas. Estima-se que as abelhas sejam responsáveis pela polinização de 75% dos alimentos cultivados pelo homem (KLEIN *et al.*, 2007).

São reconhecidas mais de 20 mil espécies de abelhas distribuídas nas diferentes regiões do mundo (MICHENER, 2000), sendo que no Brasil há mais de 3 (três) mil espécies (SILVEIRA *et al.*, 2002). Embora a maioria entre as espécies sociais seja de abelhas sem ferrão, a *Apis mellifera* tem sido mais estudada devido a sua ampla distribuição, numerosa população, alta produtividade e capacidade de polinizar uma gama de espécies vegetais.

As espécies de abelhas sem ferrão apresentam vantagens como a ausência de ferrão funcional, baixa defensividade, estabelecimento de colônias perenes, forrageamento estratégico e atividade de voo em ambientes fechados que atende as necessidades da polinização dirigida (CRUZ *et al.*, 2005; SLAA *et al.*, 2006).

Há uma ampla diversidade de espécies de abelhas sem ferrão, divididas em diferentes gêneros. Esses gêneros estão distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MICHENER, 2007). Dentre eles, o gênero *Melipona* tem ocorrência limitada às regiões neotropicais, abrangendo a América do Sul até a América Central e México (MICHENER, 1990; CAMARGO e PEDRO, 2007) e vem se destacando com espécies de interesse econômico (VENTURIERI *et al.*, 2012), dentre elas *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (AIDAR, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016).

## 2.1 *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836

A *Melipona quadrifasciata* Lepeletier possui ampla distribuição, podendo ser encontrada do Estado da Paraíba até o Rio Grande do Sul (MOURE e KERR, 1950). Essa espécie foi dividida em duas subespécies: *Melipona q. anthidioides* e *Melipona q. quadrifasciata* devido a presença de três a cinco listras metasomais amarelas contínuas do 3º ao 6º segmento em operárias e machos, que são interrompidas em *M. q. anthidioides* (SCHWARZ, 1948).

O padrão de distribuição dessas espécies ocorre em áreas geográficas bastante distintas, sendo a *M. q. quadrifasciata*, encontrada em regiões mais frias, que compreendem a porção sudeste do Estado do Rio Grande do Sul ao sul do Estado de São Paulo (BATALHA-FILHO *et al.*, 2009). A *M. q. anthidioides* é encontrada em regiões mais secas, desde o nordeste do Estado de São Paulo ao leste da Paraíba, com presença importante no Estado da Bahia, onde pode ser encontrada em quase todo o território, mas principalmente na região semiárida por motivos climáticos e florísticos (NUNES *et al.*, 2008).

A estrutura e localização dos ninhos em *M. q. anthidioides* é semelhante aos demais meliponíneos, que utilizam ocos preexistentes em árvores, cupinzeiros e cavidades no solo para nidificação. A entrada da colônia é construída com barro e possui raias convergentes e os potes de alimento e discos de cria são construídos com cera pura ou cerume (AIDAR, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A *M. q. anthidioides* é conhecida como “Mandaçaia” apresenta boa resposta produtiva quando manejada racionalmente e oferece produtos bastante apreciados pelos meliponicultores, sendo considerada de grande importância para economia e manutenção da biodiversidade das regiões semiáridas do Estado da Bahia.

Apesar de sua importância, as populações de abelhas sem ferrão tem diminuído drasticamente devido à degradação e fragmentação do habitat, uso indiscriminado de pesticidas (FREITAS *et al.*, 2009; SARTO *et al.*, 2014) e da prática predatória ainda realizada em muitas regiões do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

## 2.2 Meliponicultura

Meliponicultura é a atividade que se destina a criação racional das abelhas sem ferrão. No Brasil essa atividade começou a ser praticada pelos índios, que exploravam seus produtos para alimentação, combate de doenças e confecção de artefatos (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006).

A Meliponicultura, como toda atividade de produção animal, busca o aumento da produtividade, redução de custos de produção e melhoria da qualidade dos produtos. O sucesso da atividade está atrelado às interações entre a espécie, manejo, nutrição, genética, sanidade e ambiente. Devido ao crescimento da Meliponicultura, os riscos de transmissão de patógenos podem ocorrer (VENTURIERI *et al.*, 2012). Assim, medidas profiláticas tornam-se cada vez mais necessárias.

Desde 2006, em diversas partes do mundo, um fenômeno conhecido como CCD (*Colony Collapse Disorder*) tem sido relatado. O CCD acomete colônias de abelhas do Gênero *Apis*, sendo caracterizado pelo desaparecimento da maior parte da população de operárias, restando apenas alimento estocado e a rainha acompanhada por algumas operárias para cuidar das crias restantes (vanENGELSDORP *et al.*, 2009). A esse fenômeno tem sido atribuída uma associação de fatores, como alterações climáticas, fragmentação de habitat, agrotóxicos na agricultura, pragas e patógenos, bem como o uso de pesticidas na apicultura (RATNIEKS e CARRECK, 2010).

Os aspectos sanitários em abelhas sem ferrão ainda são pouco estudados, mas merecem atenção. Embora ainda não se tenha relatos de doenças nessas abelhas, muitas vezes é possível identificar discos de cria com muitas falhas, células deformadas, abelhas mortas na frente da caixa e aumento da microfauna na colônia. Aliado a isso, há ainda os efeitos da aplicação de pesticidas (MESSAGE *et al.*, 2012), que podem trazer consequências desastrosas para essas abelhas.

### 2.3 Comportamento Higiênico

Em razão das abelhas sociais viverem em colônias com sobreposição de gerações, há uma maior probabilidade de transmissão de doenças entre elas. A resistência da colônia pode ser comprometida por fatores climáticos, nutricionais, manejo, contaminação por pesticidas (CHAUZAT *et al.*, 2010; JOHNSON, 2015), fármacos (HARZ *et al.*, 2010) e baixa variabilidade genética (MEIXNER, 2010).

Para proteger suas colônias, as abelhas e demais insetos sociais desenvolveram mecanismos de defesa, tais como fisiológicos, anatômicos, imunológicos (EVANS *et al.*, 2006; SCHMID *et al.*, 2008; WILSON-RICH *et al.*, 2008), produção de antibióticos (própolis e geopropolis) (KAMEL *et al.*, 2013), e mecanismos comportamentais (comportamento higiênico e de “grooming”) (BOECKING e SPIVAK, 1999).

O comportamento higiênico é um mecanismo de defesa natural expressado pelas abelhas e que está sob forte controle genético (WILSON-RICH *et al.*, 2009). Caracterizado pela remoção de crias mortas, doentes ou parasitadas do interior da colônia (SPIVAK e REUTER, 2001). Dessa forma, o comportamento higiênico é indicado como o principal fator de resistência das abelhas à parasitas e organismos patogênicos que ameacem a sanidade das colônias (STANIMIROVIC *et al.*, 2008; WILSON-RICH *et al.* 2009; EVANS e SPIVAK, 2010).

A primeira observação de comportamento higiênico em abelhas foi relatada por Park e colaboradores em 1930, ao observar colônias de *Apis mellifera* resistentes a *Paenibacillus larvae*, bactéria causadora da Cria Pútrida Americana (ROTHENBUHLER, 1964). Desde então o comportamento higiênico tem sido estudado por diversos autores para outras doenças de cria em abelhas do gênero *Apis*, como a cria-giz (causada pelo fungo *Ascosphaera apis*) (SPIVAK e REUTER, 1998a), a varroatose (causada pelo ácaro *Varroa destructor*) (BOECKING e SPIVAK, 1999; RINDERER *et al.*, 2010).

### 2.3.1 Métodos de estudo do comportamento higiênico

Vários métodos têm sido empregados para mensurar o comportamento higiênico em abelhas, tais como o de perfuração de crias utilizando alfinete entomológico (NEWTON e OSTASIEWISKI, 1986) e o método de congelamento de crias que pode ser realizado em freezer (NEWTON *et al.*, 1975) ou usando nitrogênio líquido (SPIVAK e REUTER, 1998b).

O método de perfuração de cria é o mais usado, principalmente por ser econômico e de fácil realização. Esse método consiste em perfurar as abelhas na idade de pupa dentro dos alvéolos por meio de um alfinete entomológico (GRAMACHO e GONÇALVES, 2009). Como medida de avaliação, a colônia é considerada higiênica se a área de teste apresentar remoção superior a 80% dentro de 24 horas.

A avaliação de CH por meio da perfuração de crias tem sido questionada quanto a sua eficácia uma vez que traz à superfície da célula fluidos corporais das crias mortas, o que pode estimular a percepção dos danos às crias, antecipando a sua remoção pelas operárias (GRAMACHO *et al.*, 1999).

O método de congelamento é realizado colocando seções de favos de cria contendo aproximadamente 100 células em geladeira durante 24 horas e posteriormente devolvidas as respectivas colônias para avaliação do seu grau de higiene. São consideradas higiênicas as colônias com remoção superior a 80% em 48 horas. Este método é considerado pouco prático, pois aumenta a manipulação dos favos o que pode alterar o comportamento das abelhas.

O congelamento das áreas de cria também é realizado através nitrogênio líquido e consiste em verter o líquido na área de cria delimitada por um tubo, este método é considerado mais rápido (SPIVAK e GILLIAM, 1998; SPIVAK e REUTER, 1998b). Spivak e Downey (1998) relataram que o método mais eficaz é o de congelamento de crias usando nitrogênio líquido para avaliar o CH em abelhas. Esses autores descrevem que colônias higiênicas de *A. mellifera* devem ter uma remoção maior do que 95% dentro de 48 horas em pelo menos dois ensaios.

Apesar de existirem contestações a cerca de qual método é mais eficiente, o método de perfuração e congelamento são considerados

adequados para avaliação. Entretanto, devido aos avanços da ecologia química das abelhas o método de congelamento, especialmente com o Nitrogênio líquido vem sendo preferencialmente utilizado por causar menos perturbações à colônia e conferir maior confiabilidade nos resultados (GRAMACHO *et al.*, 1999; PIRES *et al.*, 2006; STANIMIROVIC *et al.*, 2008).

### 2.3.2 Bases genéticas para o comportamento higiênico

A composição genética do comportamento higiênico foi proposta inicialmente por Rothenbuhler (1964), sugerindo um modelo de dois *loci* para a expressão dessa característica, por meio da genética Mendeliana simples. Neste caso um *locus* está envolvido na desoperculação das células e outro na remoção das crias doentes, sendo ambos homozigotos recessivos.

Em uma reavaliação do modelo proposto, Moritz (1988) considerou um modelo de três *loci* mais adequado e ponderou que outros padrões de herança do comportamento higiênico em abelhas não podem ser excluídos. Estudos baseados em técnicas moleculares revelaram até sete *loci* que podem ser responsáveis pela expressão do CH (LAPIDGE *et al.*, 2002; OXLEY *et al.*, 2010). Assim, apesar de avanços importantes no conhecimento da composição genética do comportamento higiênico, o seu modo de expressão ainda é em grande parte desconhecido.

O comportamento higiênico está relacionado a genes capazes de aumentar a sensibilidade à identificação de compostos voláteis exalados pelas crias mortas ou doentes (MASTERMAN *et al.*, 2001; SWANSON *et al.*, 2009).

No estudo de Spivak *et al.* (2003), as abelhas do Gênero *Apis* que expressaram o comportamento higiênico possuíram maior quantidade de octopamina no cérebro que as abelhas não higiênicas de mesma idade e expostas ao mesmo estímulo de odor. Segundo os mesmos autores, a octopamina é um neuromodulador que desempenha um papel fundamental em comportamentos olfativos em abelhas, potencializando a detecção e resposta das abelhas operárias às crias doentes.



No estudo de Tsuruda *et al.* (2012) em colônias de Apis resistentes a varroatose identificaram genes associados com a visão, o olfato, a memória e a recepção de dopamina, que está associada ao processamento da informação sensorial, o que confirma os estudos referentes às trilhas olfativas associadas a remoção de crias mortas ou doentes.

Harpur *et al.* (2014) afirmam que o comportamento higiênico não compromete a imunidade individual das abelhas. E representa menor custo fisiológico para as operárias em comparação com o custo de manutenção de uma imunidade inata (EVANS e PETTIS, 2005; SCHMID-HEMPEL, 2005), demonstrando que a seleção de colônias por meio do CH é possível e vantajosa.

As estimativas de herdabilidade entre 0,15 e 0,61 foram encontradas e consideradas adequadas para a formação de linhagens de colônias higiênicas (HARBO e HARRIS, 1999; BOECKING *et al.*, 2000; ESPINOSA-MONTAÑO, 2008; COSTA-MAIA *et al.*, 2011).

Estudos indicam que colônias higiênicas são economicamente interessantes para apicultores por apresentarem maior produção de pólen e mel do que colônias não selecionadas para essa característica (SPIVAK e REUTER, 1998b; NICODEMO *et al.*, 2013). Esses resultados são ainda mais animadores por aliar sanidade das colônias com incrementos na produção.

### 2.3.3 Fatores que influenciam o Comportamento Higiênico

Apesar de ser uma característica de base genética o comportamento higiênico, diferenças no grau de higiene das colônias são atribuídas a fatores ambientais e também das condições da colônia como analisado por Bigio *et al.* (2013). Estes autores afirmaram que mesmo em colônias selecionadas o comportamento higiênico é uma característica muito rara e representa apenas 10% do total devido a influencia de fatores internos e externos às colônias.

Outros autores acreditam que comportamento higiênico raramente é manifestado com elevado grau de higiene (WAITE *et al.*, 2003; PÉREZ-SATO *et al.*, 2009). Para Wilson-Rich *et al.* (2009) a habilidade para o comportamento

higiênico pode ser encontrada em todas as populações de abelhas, embora em níveis mais baixos em colônias não selecionadas.

### 2.3.1.1 Fatores Internos às colônias

Por meio do teste de comportamento em crias de diversas idades, Bigio *et al.* (2014b) verificaram que o comportamento higiênico não influencia a remoção de crias saudáveis. A motivação para o comportamento higiênico tem sido relacionada a estímulos químicos, emanados pelas crias doentes ou mortas e possivelmente pelo agente invasor (BOECKING e SPIVAK, 1999; NAZZI *et al.*, 2004).

Aronstein e Murray (2010) sustentaram a hipótese de que as abelhas podem detectar diferenças entre o calor produzido por uma pupa saudável e uma doente ou parasitada. Os autores relataram que esporos de fungos causadores da cria-giz ingeridos pelas larvas germinam no intestino das mesmas provocando aumento da temperatura na área do favo.

Para Arathi e Spivak (2001) o comportamento higiênico está relacionado a fatores internos como à percentagem de abelhas na colônia capazes de executá-lo. O estudo de Pereira *et al.* (2013) mostra que existe diferenças na idade das operárias envolvidas na desoperculação e remoção. Em colônias higiênicas e não higiênicas, as operárias de 4 a 12 dias de idade eram responsáveis pelo CH em favos mais novos, enquanto operárias de 6 a 13 dias de idade em favos mais velhos.

Colônias mais fortes (populosas e com estoque de alimento) são indicadas por apresentar altos níveis de comportamento higiênico (STANIMIROVIC *et al.*, 2002).

Pereira *et al.* (2013) encontraram diferenças importantes na duração das etapas do comportamento higiênico no períodos diurno e noturno. Durante o dia o tempo total desde a perfuração até a remoção das crias foi menor do que a noite. Os autores afirmaram ainda que a remoção de crias mortas na idade de larva foi mais rápida do que para crias mais velhas. Conclui-se que a hora

do dia e a idade da cria devem ser consideradas na avaliação do comportamento de higiene em abelhas do Gênero *Apis*.

No estudo de Schöning *et al.* (2012) os resultados demonstraram que apenas a presença do acaro *Varroa destructor* na colônia não é estímulo para a remoção da cria. A remoção ocorreu a partir dos danos provocados às larvas e referente ao potencial de infecção dos ácaros. Os mesmos autores sugeriram que os compostos voláteis emanados das crias parasitadas por ácaros infectados são claramente distintos ao odor das crias parasitadas com ácaros não infectados. Zhao *et al.* (2015) também encontraram diferenças na quantidade e no tipo de compostos voláteis emanados de cria saudável e crias contaminadas com o fungo *Ascosphaera apis*.

### 2.3.1.2 Fatores externos às colônias

Fatores ligados à atividade externa das abelhas também estão relacionados à expressão do comportamento higiênico. Estes fatores podem ser climáticos e referentes aos recursos tróficos disponíveis no ambiente.

O fluxo de néctar é indicado por estimular a taxa de remoção de cria morta ou doente (SPIVAK e GILLIAM, 1993; GUERRA JR *et al.*, 2000). Resultados diferentes foram encontrados por Bigio *et al.* (2013) sobre o efeito de fornecimento de alimento artificial (xarope a base de sacarose) e tamanho da colônia, sugerindo que o teste em colônias pode ser feito a qualquer momento, sem especial atenção às condições de néctar ou níveis de cria. Fatores climáticos como a temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e precipitação devem ser estudados e correlacionados com o CH nas diferentes épocas do ano para avaliação de qual o melhor momento para avaliação das colônias.

Outro fator externo importante foi estudado por Bigio *et al.* (2014a). Os autores compararam a partir de colônias higiênicas os níveis de higiene de colônias com rainhas inseminadas instrumentalmente com machos também selecionados e colônias com rainhas acasaladas naturalmente e encontraram níveis de higiene superiores nas colônias das rainhas e machos selecionados

(99,8) comparados a colônias naturalmente acasaladas (95,5%). Desse modo, os apicultores devem selecionar as rainhas de suas colônias higiênicas e conseguirão aumentar a frequência de machos também com potencial higiênico.

#### 2.3.4 Comportamento Higiênico em Abelhas sem ferrão

Os estudos referentes a técnicas de avaliação e resposta do comportamento higiênico são baseados nas abelhas do gênero *Apis*. Os estudos sobre o CH em abelhas sem ferrão ainda são insuficientes, considerando a diversidade e particularidades da biologia de cada espécie.

Em abelhas sem ferrão foram realizados trabalhos com as seguintes espécies: *Plebeia remota* (NUNES-SILVA *et al.*, 2009), *Melipona scutellaris* (SAMPAIO, 2014), *Melipona beecheii* e *Scaptotrigona pectoralis* (MEDINA *et al.*, 2009).

Medina *et al.* (2009) verificaram diferenças na remoção total de crias mortas entre *M. beecheii* (2 a 9 dias) e *S. pectoralis* (1 a 3 dias). Em *P. remota*, as operárias demoraram até 5 dias para a completa remoção das crias mortas (Nunes-Silva *et al.*, 2009).

Gramacho e Gonçalves (2009) relatam que o CH em abelhas do gênero *Apis* é realizado em quatro etapas: identificação da célula contendo cria morta, perfuração da célula, desoperculação e remoção, podendo ainda haver uma remoção parcial da cria. Em espécies de abelhas sem ferrão não foi identificada a etapa de perfuração, e a remoção parcial das crias não parece ser comum, sendo relatada apenas por Sampaio (2014).

Medina *et al.* (2009) destacaram que em espécies de abelhas sem ferrão, as operárias destroem as células após o nascimento das abelhas bem como durante o CH após a remoção das crias mortas. Observação semelhante foi encontrada por Sampaio (2014) estudando o CH em *M. scutellaris*. Essa característica pode ser importante para essas espécies, pois reduz a transmissão dos agentes patogênicos, em *Apis* após a remoção das crias mortas as células são reutilizadas.

Medina *et al.* (2009) relataram que a alimentação das larvas em *Apis* difere das abelhas sem ferrão. Em abelhas sem ferrão, o fornecimento é massal, sendo o alimento colocado nas células antes mesmo da postura dos ovos pela rainha. Isso reduz as visitas de operárias às células, favorecendo a sanidade das colônias. Em *A. mellifera*, as crias são alimentadas progressivamente e a célula permanece aberta durante a fase larval, o que aumenta a chance para a infecção.

Nunes-Silva *et al.* (2009) não encontraram correlação significativa entre o número de células removidas, o tamanho do favos de cria e a condição da colônia (fraca, média ou forte) sobre o comportamento de higiene em *P. remota*. Os mesmos autores afirmaram que danos no opérculo das células não estimulam a remoção das crias e as operárias selam novamente a célula dentro de 24 horas.

Devido a importância ambiental, econômica e social de *M. q. anthidioides*, especialmente na região semiárida, estudos que busquem informações sobre a sua sanidade são cada vez mais necessários.

## CAPÍTULO 1 – COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM *Melipona quadrifasciata anthidioides* (APIDAE, MELIPONINAE)

Artigo a ser submetido ao Periódico Apidologie, Qualis A2 na Área Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

**ABSTRACT.** Hygienic behavior (HB) in stingless bees is a trait of workers that confers colony-level resistance against some brood diseases. Workers of hygienic colonies detect, uncap and remove dead or diseased brood from the nest cells. We examined the hygienic behavior in stingless bees (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) from freeze-killed brood assay with liquid nitrogen. Responses were measured in 14 times (3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 264 h after freeze-killed brood). Workers were estimated remove in average 65% of larvae and 34% of dead pupae by freezing within 48 h. Workers removed dead brood rapidly after uncapping the cells. Strong colonies have greater removal of dead pupae, while the size of the population did not influence the removal of dead larvae. These findings report for the first time the hygienic behavior in *M. q. anthidioides* and confirm that workers have more difficulty for the pupae removal compared the larvae from the combs.

**Key-words:** generalized linear models, stingless bees, hygienic colonies, behavior of bees, dead brood removal, freeze-killed brood.

### 1. INTRODUÇÃO

*Melipona quadrifasciata* Lepeletier (“mandaçaia”) é uma espécie de abelha sem ferrão presente em grande parte do território brasileiro, desde os estados da Paraíba até o Rio Grande do Sul (Moure e Kerr 1950). A maior prevalência da subespécie *M. quadrifasciata anthidioides* é em regiões quentes e secas, especialmente na região semiárida do Estado da Bahia (Nunes et al.

2008). O mel de *M. q. anthidioides* é muito apreciado e suas colônias apresentam boa produção quando manejadas racionalmente, sendo de grande importância socioeconômica e ambiental.

Nas últimas décadas tem ocorrido uma diminuição drástica de colônias manejadas de abelhas *Apis mellifera* (vanEngelsdorp et al. 2007; Neumann e Carreck 2010) e um declínio das populações de abelhas sem ferrão (Steffan-Dewenter et al. 2005; Slaa et al. 2006; Freitas et al. 2009). Inúmeras são as razões, tais como a destruição ou alteração de habitats, o uso excessivo de pesticidas em culturas agrícolas e a outra, que afeta apenas as abelhas, são as pragas e doenças (vanEngelsdorp et al. 2010; Reyes-González et al. 2016; Sanchez-Bayo e Goka, 2016 e suas referências). No caso de pragas e doenças, uma estratégia prática e desejável é que a espécie de abelha expresse altos níveis de resistência natural, tais como o comportamento higiênico (CH) (Evans et al. 2006; Bigio et al. 2013).

Em *A. mellifera*, o CH foi descrito como um processo em que ocorre a detecção e desoperculação das células contendo as crias mortas, parasitadas ou doentes (quinto-instar, larvas e pupas) e em seguida, suas remoções (Rothenbuhler 1964; Rosenkranz et al. 2010). Esse comportamento permite que as abelhas removam as crias infectadas antes da doença alcançar o estágio infeccioso, evitando a infecção da cria saudável (Rothenbuhler 1964). É um mecanismo geral de resistência significativo a um número de agentes patogênicos importantes, incluindo *Ascosphaera apis* (agente causador da cria de giz) (Gilliam et al. 1988), *Paenibacillus larvae* (cria pútrida americana) (Spivak e Reuter 2001) e o ácaro *Varroa destructor* (Rinderer et al. 2010; Rasolofoarivao et al. 2015).

Colônias higiênicas possuem grandes interesses econômicos dentro da apicultura, pois elas têm sido relatadas para produzir mais mel e pólen do que as colônias não higiênicas (Nicodemo et al. 2013). Embora o CH seja uma característica muito importante, raramente ela é manifestada com intensidade nas populações (Pérez-Sato et al. 2009). Assim, a seleção de rainhas para essa característica tem se intensificado nos programas de melhoramento genético (Espinosa-Montaño 2008; Costa-Maia et al. 2011).

A maioria dos estudos sobre o CH tratam das abelhas *A. mellifera* (Gramacho e Gonçalves 2009; Pérez-Sato et al. 2009, Morais et al. 2010;

Stevanovic et al. 2011; Pinto et al. 2012; Bigio et al. 2013; Nicodemo et al. 2013; Pereira et al. 2013; Rasolofoarivao et al. 2015). Poucas espécies de abelhas sem ferrão foram investigadas para o CH, dentre elas temos a *Melipona beecheii* e *Scaptotrigona pectoralis* (Medina et al. 2009) e *Plebeia remota* (Nunes-Silva et al. 2009). Embora esses estudos sejam importantes, não são suficientes, considerando as diversidades e particularidades de cada espécie de abelha sem ferrão, os riscos de extinção que sofrem os Meliponini.

Ainda, o crescimento da atividade meliponícola pode aumentar os riscos de transmissão de patógenos, conforme relatado por Venturieri et al. (2012), especialmente para àquelas espécies de maior interesse econômico. Além disso, tanto quanto sabemos nenhum estudo sobre o CH em *M. q. anthidioides* foi realizado.

Nossa hipótese é que ocorra o CH em *M. q. anthidioides* de modo similar às abelhas do gênero *Apis* e que há diferença no tempo de remoção entre larvas e pupas mortas pelas operárias. Assim, *M. q. anthidioides* foi usada como modelo para investigar o CH em pequenos intervalos de tempo, até a completa remoção de todas as crias (larvas e pupas) mortas por congelamento nas colônias.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido de maio a agosto de 2015 com 40 colônias de *M. q. anthidioides* alojadas em caixas padronizadas, modelo INPA, constituídas por ninho e sobreninho (13 x 13 x 6 cm), melgueira (13 x 13 x 3,5 cm), tampa e fundo (18 x 18 x 2 cm) e espaço interno para acesso entre os compartimentos (6 x 6 cm). As colônias utilizadas neste estudo foram oriundas de um conjunto de sessenta colônias provenientes de diferentes municípios do estado da Bahia, introduzidas em 2010 no meliponário do Grupo de Pesquisa Insecta (Brito et al., 2013; Oliveira et al., 2015).

O CH foi quantificado na colônia usando o método de congelamento com nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) (Spivak e Reuter 1998), adaptado para as dimensões do ninho da espécie em estudo. Para isso, em cada colônia foi delimitada e



marcada uma área com sete células de pupa de olho negro e sete de larvas de último instar, uma área controle também foi delimitada e marcada para descontar a taxa de remoção natural de pupas e larvas doentes, mortas ou parasitadas (Figura 1a). As marcações da área de teste foram feitas utilizando corretivo tipo Liquid Paper® a base d'água e atóxico, corado com anilina comestível vermelha, e a área do controle permaneceu com a cor branca. Um cilindro de PVC (2 cm de diâmetro x 3 cm de altura) foi posicionado sobre as áreas a serem testadas (Figura 1b), onde foram vertidos 12 ml de nitrogênio líquido para matar as crias (Figura 1c). Cada colônia foi monitorada até que as operárias realizassem a desoperculação e remoção total das crias.

Um total de 1.680 registros foi utilizado para o CH de *M. q. anthidioides* em delineamento de blocos completos ao acaso, com 14 tratamentos repetidos 40 vezes (colônias) em cada bloco. Os blocos foram constituídos por três períodos diferentes de observação para cada colônia. Os tratamentos ou tempos de mensuração ocorreram em 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 e 264 horas após a aplicação do nitrogênio líquido.

As variáveis analisadas foram: proporção média acumulada de remoção de larvas (RL) e pupas (RP) mortas, proporção média acumulada de células desoperculadas com larvas (DL) e pupas (DP) mortas ainda não removidas. Todas as colônias avaliadas para o CH tiveram o tamanho da população estimado antes de cada repetição de acordo com Ihering (1932), após a mensuração do número de células de cria (Aidar, 2010).

Foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM) com estrutura binomial de erros e função de ligação *logit*, expressa por  $g(\mu) = \ln(\mu/1-\mu)$ , para testar o efeito do tempo e de população das colônias no CH. Os parâmetros dos modelos foram estimados usando o método da máxima verossimilhança, por maximização da função de log-verossimilhança. Análise de *deviance* (ANODE) foi usada para o ajuste dos MLG, a partir de um modelo maximal, representado por porção sistemática  $\eta = g(\mu) = \mu + T_i + B_j + P + \varepsilon_{ij}$ , em que  $\mu$  é o efeito da média geral,  $T_i$  é o efeito dos níveis de tempo em horas ( $i = 1, 2, \dots, 14$ ),  $B_j$  é o efeito dos blocos ( $j = 1, 2$  e  $3$ ),  $P$  é o efeito da covariável 'população das colônias' e  $\varepsilon_{ij}$  é o erro aleatório associado à cada observação  $Y_{ij}$ .

A qualidade de ajuste dos modelos aos dados observados e a seleção do melhor modelo foi baseada no maior valor do logaritmo da função de máxima

verossimilhança (*LogLik*). Foi ajustado os parâmetros de dispersão quando constatada superdispersão, corrigindo os erros padrões usando um modelo *quasibinomial*, para posterior comparação entre valores de *LogLik* ajustados por modelos distintos. Após a definição do modelo mais adequado, as significâncias porventura existentes de tempo (T), bloco (B) e população (P) sobre as variáveis foram verificadas na ANODE, por meio do teste da diferença de *deviances* entre dois modelos, que segue aproximadamente a distribuição de  $\chi^2_{n-p(\alpha)}$  (Lindsey, 1997). Os efeitos de tempo e população sobre as variáveis foram avaliados por meio de modelos de regressão logística.

Após substituição dos valores de tempo (horas após a morte das crias por congelamento) nos modelos, a verificação da identidade de interceptos e coeficientes entre os modelos de regressão logística de RL e RP e entre os modelos preditivos de DL e DP, foi avaliada inicialmente por meio do ajuste de modelo de regressão linear de 1º grau ( $y_i = b_0 + b_1x_i + \varepsilon_i$ ) dos valores médios de remoção e desoperulação de larvas ( $y$ ), estimados em cada tempo ( $n=14$ ), em função dos respectivos valores médios estimados de remoção e desoperulação de pupas ( $x$ ), utilizando-se do método dos mínimos quadrados ordinários.

A existência da relação linear entre valores médios estimados de RL e RP, e de DL e DP, foi avaliada pela detecção da significância da estimativa do parâmetro  $\beta_1$  (coeficiente angular), verificada pela aplicação do teste “t” parcial, para teste da hipótese de nulidade  $H_0: \beta_1 = 0$ . A não aceitação da hipótese de nulidade para o coeficiente angular sugeriu a influência dos valores médios estimados de RP e DP para explicar a variação nos respectivos valores médios estimados de RL e DL. Concomitantemente, foi aplicado o teste F (Montgomery et al., 2006) para testar a hipótese de nulidade conjunta para os parâmetros da regressão linear ( $H_0: \beta_0 = 0$  e  $\beta_1 = 1$ ). A rejeição da  $H_0$  indica ausência de semelhança entre estimativas de proporções médias acumuladas de RL ( $y$ ) e RP ( $x$ ), e de DL ( $y$ ) e DP ( $x$ ), ou seja, ocorre elevada magnitude nos valores de resíduo ( $\varepsilon_i = y - \hat{y}$ ).

O nível de significância de 0,05 foi adotado em todas as análises. Todas as análises estatísticas foram efetuadas usando o programa R versão 3.0.2 (R Core Team 2015).

### 3. RESULTADOS

As sequências do CH observadas em colônias não selecionadas de *M. q. anthidioides* foram desoperculação das células e remoção das crias mortas.

Nós usamos as recomendações de Spivak e Downey (1998) em *A. mellifera* como parâmetro para avaliar se as colônias de *M. q. anthidioides* eram higiênicas. Esses autores recomendaram para colônias higiênicas de *A. mellifera* uma remoção maior do que 95% dentro de 48 h em pelos menos dois ensaios usando o método de crias mortas por congelamento.

Os percentuais de crias mortas por congelamento a partir de 40 colônias de *M. q. anthidioides*, entre maio a agosto de 2015, dentro de 48 h, são mostrados na Figura 2. Para RL, das 120 mensurações 78 (62%) estavam acima de 95% e 30 (75%) das 40 colônias tinham pelo menos duas observações com remoção maior do que 95% dentro de 48 h. Para RP, das 120 mensurações 40 (33%) estavam acima de 95% e seis (15%) das 40 colônias tinham pelo menos duas observações com remoção maior do que 95% dentro de 48 h. A média do número de dias para a remoção de todas as larvas mortas por congelamento foi de 2,90 dias e para pupas de 5,02 dias.

A amplitude do percentual de RL e RP mortas por congelamento até 48 h por colônias foi de 0 a 100% nos períodos de observações 1 e 2 e de 14 a 100% no período 3, com coeficiente de variação de 42% para RL e 89% para RP. Ao considerar a variação do percentual de colônias que removeram mais do que 95% das crias mortas por congelamento até 48 h em cada período, verificamos que RL variou de 25% no período 1 para 85% das colônias no 3 e para RP de 4% no período 1 para 26% das colônias no período 3.

A qualidade do ajuste dos MLG para os dados das variáveis respostas foi avaliada usando a estatística “Pearson  $\chi^2$ ” (Tabela 1).

Houve efeito positivo de tempo e bloco para RL (tempo:  $\chi^2 = 957,35$ ,  $P < 0,0001$ ; bloco:  $\chi^2 = 239,96$ ,  $P < 0,0001$ ). Houve efeito positivo de tempo, população e bloco para RP (tempo:  $\chi^2 = 1871,81$ ,  $P < 0,0001$ ; população:  $\chi^2 = 44,73$ ,  $P < 0,0001$ ; bloco:  $\chi^2 = 431,74$ ,  $P < 0,0001$ ). Houve efeito positivo de tempo para DL ( $\chi^2 = 15,61$ ,  $P < 0,0001$ ). Houve efeito positivo de tempo e

população para DP (tempo:  $\chi^2 = 13,73$ ,  $P = 0,0002$ ; população:  $\chi^2 = 26,43$ ,  $P < 0,0001$ ).

Na Figura 3 são mostrados os modelos de regressão para RL e RP em função de horas após a morte das crias por congelamento. A estimativa média de RL variou de 39.97 a 99.64% dentro dos tempos avaliados (3 a 264 h). As estimativas médias de RL dentro de 24 e 48 h foram de 51,97 e 65,32%, respectivamente. Considerando uma população média de 806 indivíduos, a estimativa média de RP variou de 14.98 a 98.88% dentro dos tempos mensurados (3 a 264 h). As estimativas médias de RP dentro de 24 e 48 h foram de 22,52 e 33,98%, respectivamente.

Na Figura 4 são mostrados os modelos de regressão para DL e DP em função de horas após a morte das crias por congelamento. Foram observados baixos percentuais de DL e DP com crias mortas por congelamento ainda não removidas pelas operárias. Apenas 4,81% de DL foram estimadas dentro de 48 h. O maior valor médio estimado para DL ocorreu dentro de 264 h (8.82%). Quando a estimativa média de 806 indivíduos foi considerada na colônia, a porcentagem estimada de DP dentro de 48 h foi de 1,44%. O maior valor médio estimado para DP ocorreu dentro de 264 h (3.21%).

As diferenças entre as estimativas médias de RL e RP e de DL e DP mortas por congelamento no decorrer do tempo puderam ser constatadas estatisticamente, pois foi observada rejeição da hipótese de nulidade conjunta para os parâmetros das regressões lineares ( $H_0: \beta_0 = 0$  e  $\beta_1 = 1$ ) quando se regrediu os valores médios estimados de RL em função de RP e de DL em função de DP. Em ambos os testes o valor de probabilidade de significância ( $P$ ) foi menor que 0,0001 ( $P < 0,0001$ ). As equações de 1º grau estimadas foram  $RL = 0,360 + 0,682RP$  ( $R^2 = 0,9602$ ) e  $DL = 0,015 + 2,317DP$  ( $R^2 = 0,9987$ ). Pode-se notar que os ângulos de inclinação (inversa da tangente do coeficiente angular) das retas de remoção e desoperulação foram de 34,29 e 66,66°, valores diferentes ( $P < 0,0001$ ) de 45°, ângulo da reta de condição ideal, situação que caracteriza a ausência de similaridade entre pares de valores  $x$  e  $y$ .

Quando se mantém fixo um determinado tempo após as mortes das crias por congelamento, as estimativas de RP e DP aumentam conforme a população nas colônias também aumenta (Figuras 5 e 6, respectivamente).

#### 4. DISCUSSÃO

As sequências do CH observadas em colônias não selecionadas de *M. q. anthidioides* confirma nossa hipótese de que esse comportamento é similar a *A. mellifera*. A principal diferença é que as operárias de *M. q. anthidioides* destroem as células de cria após as suas remoções. Além disso, embora não tenhamos verificado o comportamento de remoção parcial de crias mortas nas áreas de testes, como ocorre em *A. mellifera*, foi possível identificar dentro da colônia crias dilaceradas, o que evidencia que tal comportamento também possa ocorrer em *M. q. anthidioides*.

Foram observadas poucas células desoperculadas com larvas (DL) e com pupas (DP) mortas por congelamento que não foram imediatamente removidas pelas operárias, o que é importante para evitar possíveis disseminações de agentes patogênicos nas colônias, caso as crias estivessem infectadas.

Em média, foi verificado um aumento gradual de RL e RP ao longo do tempo, com 75% e 6%, respectivamente, das colônias de *M. q. anthidioides* não selecionadas com remoção maior do que 95% dentro de 48 h em pelo menos dois períodos. Em *A. mellifera*, Pérez-Sato et al. (2009) e Bigio et al. (2013) encontraram 3% e 0% de colônias com percentual de remoção maior que 95% dentro de 48 h, respectivamente. Em comparação com outras espécies de abelhas sem ferrão, as colônias de *M. q. anthidioides* foram mais eficazes em remover todas as larvas mortas do que *M. beecheii* [4,4 (2,0 dias)] e similar a *Scaptotrigona pectoralis* [2,3 (0,6)] (Medina et al. 2009).

Houve variação no CH entre as colônias de *M. q. anthidioides* dentro de cada período e entre os períodos de observação. A porcentagem de remoção dentro de 6 h, usando o método de perfuração de crias, variou de 0 a 82% em *A. mellifera unicolor* (Rasolofoarivao et al. 2015), de 1 a 31% em *A. mellifera carnica* (Gramacho 1998) e de 0 a 100% em *A. mellifera* africanizada usando protocolo semelhante (Fries e Raina 2003). O CH é fortemente influenciado pela época em que são realizados os testes (Uzunov et al. 2014). Colônias de *A. cerana* diferiram para o CH em vários habitats ecológicos (Athreya e Reddy 2013). No entanto, acredita-se que parte da variação no CH observado para as

colônias entre os períodos de observação seja em decorrência das condições climáticas, embora essas não tenham sido investigadas.

Foi verificado que as operárias removeram mais larvas do que pupas mortas a partir de células de cria dentro de 48 h (ver Fig 2) e que a RP é mais demorada do que a RL (ver Fig 3) em *M. q. anthidioides*.

Em *A. mellifera*, o comportamento usado para detectar e remover pupas mortas por congelamento não é necessariamente o mesmo utilizado para detectar e remover pupas infestadas de ácaros (Spivak 1996). Diferenças na sensibilidade olfativa entre abelhas higiênicas podem levar a uma partição do comportamento de desoperculação e remoção (Gramacho e Spivak, 2003) e poros nos opérculos foram relatados para afetar a eficácia da detecção olfativa das abelhas (Morais et al. 2010).

A princípio era esperado que as operárias removessem mais rapidamente as pupas do que as larvas mortas devido a maior quantidade de cera e resina nos discos de cria para larvas, o que não ocorre nas células de pupa devido à remoção pelas operárias para facilitar a emergência do adulto. A maior quantidade de cera e resinas nas células com larvas poderia dificultar as operárias na detecção das larvas mortas. Entretanto, em *M. q. anthidioides*, o menor tempo para RL do que para RP sugere ser em decorrência da constituição do tegumento das crias. Landim (2009) verificou que o tegumento das pupas é muito mais complexo e esclerotizado do que das larvas. Observações empíricas evidenciaram que as larvas mortas eram facilmente removidas por uma única operária de *M. q. anthidioides*, enquanto que para pupas mortas, as abelhas só conseguiam a remoção após dilaceração do corpo da pupa.

Foi verificado que a variação na estimativa da população de abelhas entre as colônias não influenciou as operárias na RL e colônias populosas tiveram mais RP (ver Fig 5). Quando a população da colônia aumenta, mais abelhas auxiliam na atividade de RP de uma única célula, o que diminui o tempo de remoção.

Tanto quanto sabemos, este é o primeiro estudo que investigou o CH em *M. q. anthidioides*. Estas descobertas confirmaram o CH em *M. q. anthidioides* e que suas etapas são similares àqueles relatados anteriormente para *A. mellifera*. No entanto, foi verificado um comportamento diferente na RL e RP

pelas operárias e que colônias fortes podem diminuir o tempo para a remoção de pupas mortas. Essas informações podem ser úteis para programas de melhoramento genético de colônias de *M. q. anthidioides* voltadas para a resistência a pragas e doenças.

## REFERÊNCIAS

Aidar, D.S. (2010) A mandaçaia: biologia e manejo de abelhas com ênfase à *Melipona quadrifasciata* Lep. FUNPEC, Ribeirão Preto.

Athreya, S.V.R., Reddy, M.S. (2013) Variation of hygienic behaviour (nest cleaning behaviour) in honey bee, *Apis cerana indica* F. in different eco habitats of South India. **Curr. Biot.** **7**, 101-104.

Bigio, G., Schürch, R., Ratnieks, F.L.W. (2013) Hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae): effects of brood, food, and time of the year. **J. Econ. Entomol.** **106**, 2280-2285.

Brito, B.B.P., Faquinello, P., Paula-Leite, M.C.de, Carvalho, C.A.L. de. (2013) Parâmetros biométricos e produtivos de colônias em gerações de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Arch. de Zootecnia.** **62**, 265-273.

Chambó, E.D. (2016) Beekeeping and bee conservation: advances in research. InTech, Rijeka, Croatia. 242 p.

Costa-Maia, F.M., Toledo, V.A.A., Martins, E.N., Lino-Lourenço, D.A., Sereia, M.J., Oliveira, C.A.L., Faquinello, P., Halak, A.L. (2011) Estimates of covariance components for hygienic behaviour in Africanized honeybees (*Apis mellifera*). **R. Bras. Zootec.** **40**, 1909-1916.

Espinosa-Montaño, L.G., Guzmán-Novoa, E., Sánchez-Albarrán, A., Montaldo, H., Correa-Benítez, A. (2008) Estudio comparativo de tres pruebas para evaluar el comportamiento higiénico en colonias de abejas (*Apis mellifera* L.). **Vet. Méx.** **39**, 39-54.

Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.L. (2006) Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. **Insect Mol. Biol.** **15**, 645-656.

Fries, I., Raina, S. (2003) American foulbrood and African honey bees (Hymenoptera: Apidae). **J. Econ. Entomol.** **96**, 1641-1646.

Freitas, B.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Medina, L.M., Kleinert, A.M.P., Galetto, L., Nates-Parra, G., Queza-Eúan, J.J.G. (2009) Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie** **40**, 332-346.

Gilliam, M., Taber, S. III, Lorenz, B.J., Prest, D.B. (1988) Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminate *Ascosphaera apis*. **J. Invertebr. Pathol.** **52**, 314-325.

Gramacho, K.P., Gonçalves, L.S., Rosenkranz, P. (1998) Study of temperature of brood killed by the pin-killing method in worker bees of *Apis mellifera carnica*. **Apiacta** **2**, 35– 41.

Gramacho, K.P., Spivak, M. (2003). Differences in olfactory sensitivity and behavior responses among honey bees for hygienic behavior. **Behav. Ecol. Sociobiol.** **54**, 472-479.

Gramacho, K.P., Gonçalves, L.S. (2009) Comparative study of the hygienic behavior of Carniolan and Africanized honey bees directed towards grouped versus isolated dead brood cells **Genet. Mol. Res.** **8**, 744-750.



Ihering, H. (1932) A uruçu na apicultura nordestina. **Chác Quintais** **46**, 292-296.

Landim, C.C. (2009) Abelhas: morfologia e função de sistemas. Editora UNESP, São Paulo.

Lindsey, J.K. (1997). Applying Generalized Linear Models. Springer-Verlag, New York.

Medina, L.M., Hart, A.G., Ratnieks, F.L.W. (2009) Hygienic behavior in the stingless bees *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini). **Genet. Mol. Res.** **2**, 571-576.

Montgomery, D.C., Peck, E.A., Vining, G.G. (2006) Introduction to Linear Regression Analysis. 4<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons, New Jersey.

Morais, M.M., Franco, T.M., Borissevitch, I.E., Gonçalves, L.S. (2010) A scientific note about spectroscopic analysis of honey bee brood comb cappings in hygienic and non-hygienic honey bee colonies. **Apidologie** **41**, 531-533.

Moure, J.S., Kerr, W.E. (1950) Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen.- Apoidea). **Dusenía** **1**, 105-129.

Neumann, P., Carreck, N.L. (2010). Honey bee colony losses. **J. Apic Res.** **49**, 1-6.

Nicodemo, D., de Jong, D., Couto, R.H., Malheiros, E.B. (2013) Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. **Genet. Mol. Res.** **12**, 6931-6938.

Nunes, L.A., Araujo, E.D., Carvalho, C.A.L., Waldschmidt, A.M. (2008) Population divergence of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera:

Apidae) endemic to the Semi-arid Region of the State of Bahia, Brazil. **Sociobiology** **52**, 81-93.

Nunes-Silva, P., Imperatriz-Fonseca, V.L.P, Gonçalves, L.S. (2009) Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). **Genet. Mol. Res.** **2**, 649-654.

Oliveira, K.N.de, Paula-Leite, M.C.de, Faquinello, P., Carvalho, C.A.L., Lourenco, D.A.L., Sampaio, R.B., Santos, E.B. (2015). Parâmetros genéticos para características produtivas e biométricas em abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepelletier. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** **67**, 819-826.

Pérez-Sato, J.A., Châline, N., Martin, S.J., Hughes, W.O.H., Ratnieks, F.L. (2009) Multi-level selection for hygienic behaviour in honeybees. **Heredity** **102**, 609-615.

Pereira, R.A., Morais, M.M., Franco, T.M., Gonçalves, L.S. (2013) Hygienic behavior of Africanized honey bees *Apis mellifera* directed towards brood in old and new combs during diurnal and nocturnal periods. **Insects** **4**, 521-532.

Pinto, F.A., Puker, A., Barreto, L.M.R.C., Message, D. (2012) The ectoparasite mite *Varroa destructor* Anderson and Trueman in southeastern Brazil apiaries: effects of the hygienic behavior of Africanized honey bees on infestation rates. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** **64**, 1194-1199.

R Core Team. (2015) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Rasolofoarivao, H., Delatte, H., Ravaomanarivo, L.H.R., Reynaud, B., Clémencet, J. (2015) Assessing hygienic behavior of *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae), the endemic honey bee from Madagascar. **Genet. Mol. Res.** **14**, 5879-5889.

Reyes-González, A., Camou-Guerrero, A., Gómez-Arreola, S. (2016) From extraction to meliponiculture: a case study of the management of stingless bees in the West-central region of Mexico, in: Chambó, E.D. (Ed.), Beekeeping and bee conservation: advances in research. InTech, Rijeka, Croatia, pp 201-223.

Rinderer, T.E., Harris, J.W., Hunt, G.J. e de Guzman, L.I. (2010) Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. **Apidologie** **41**, 409–424.

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. **J. Invertebr. Pathol.** **103**, 96-119.

Rothenbuhler W.C. (1964) Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to diseased-killed brood. **Anim. Behav.** **5**, 578-583.

Sanchez-Bayo, F., Goka, K. Impacts of pesticides on honey bees. (2016) Impacts of pesticides on honey bees, in: Chambó, E.D. (Ed.), Beekeeping and bee conservation: advances in research. InTech, Rijeka, Croatia, pp 77-97.

Slaa, E.J., Chaves, L.A.S., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E. (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie** **37**, 293-315.

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

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

Spivak, M., Downey, D.L. (1998) Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **J. Econ. Entomol.** **91**, 64-70.

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

Steffan-Dewenter, I., Potts, S.G., Packer, L. (2005) Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. **Trends Ecol. Evol.** **20**, 651-652.

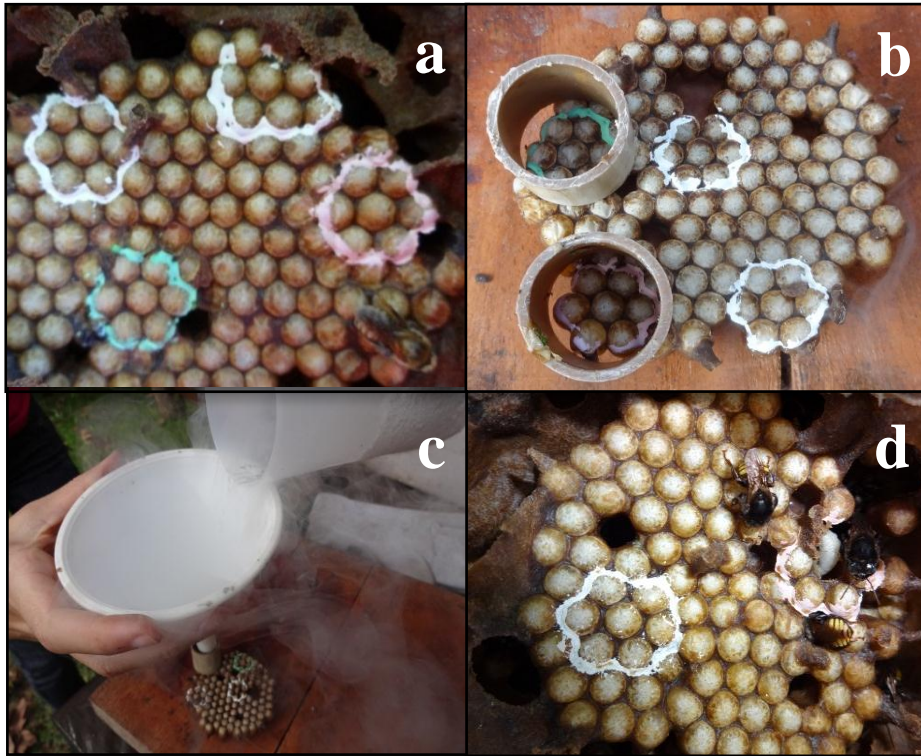
Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Lakic, N., Aleksic, N., Simeunovic, P., Kulisic, Z. (2011) Safety assessment of sugar dusting treatments by analysis of hygienic behavior in honey bee colonies. **Arch. Biol. Sci.** **63**, 1199-1207.

Uzunov, A., Costa, C., Panasiuk, B., Meixner, M. et al. (2014) Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in a pan-European experiment. **J. Apic. Res.** **53**, 248-260.

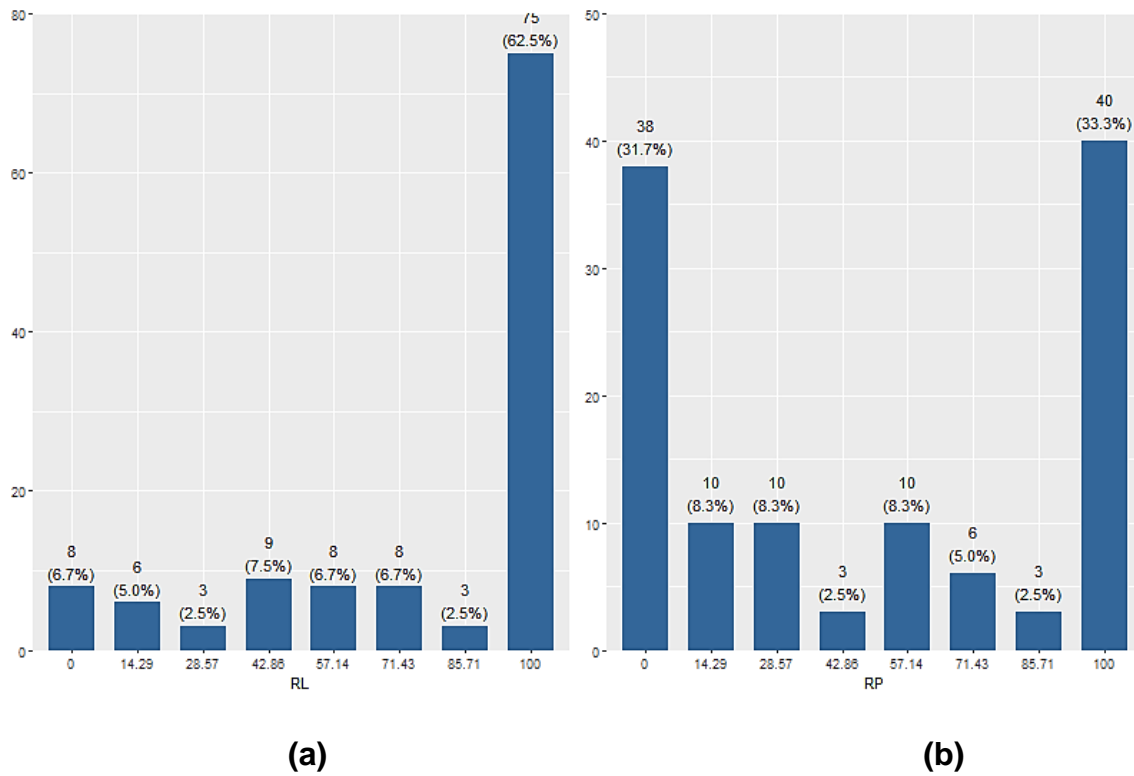
vanEngelsdorp, D., Underwood, R., Caron, D., Hayes, J. Jr. (2007) An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. **Am. Bee J.** **147**, 599-603.

vanEngelsdorp D., Meixner, M.D. (2010) A historical review of managed bee populations in Europe and United States and the factors that may affect them. **J. Invertebr. Pathol.** **103**, 80-95.

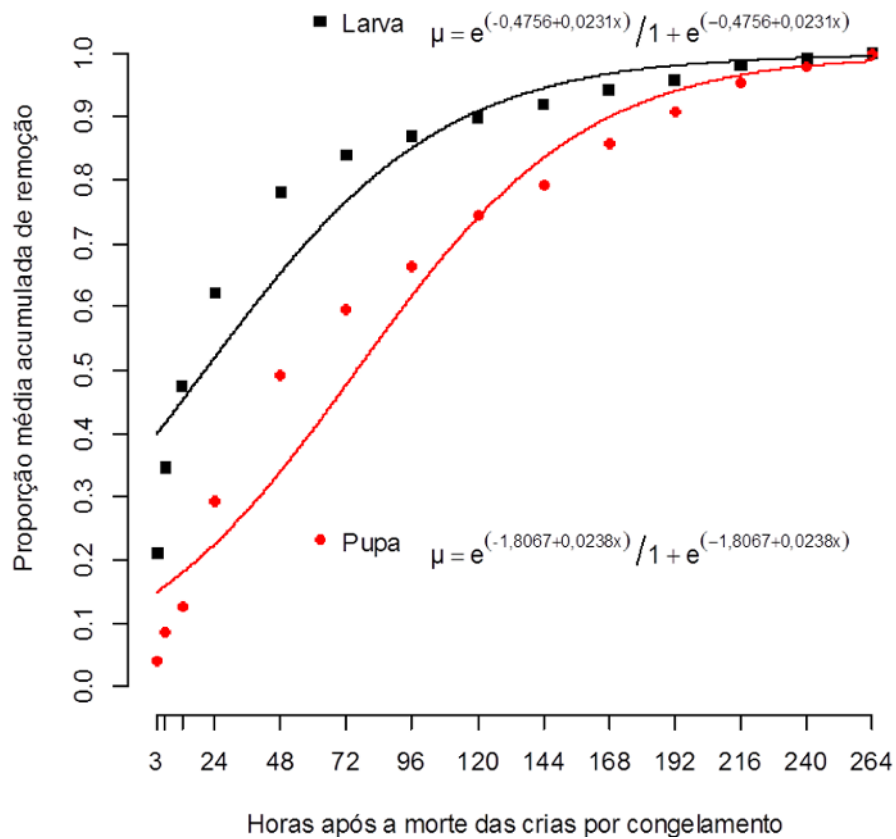
Venturieri, G.C., Alves, D.A., Villas-Bôas, J.K., Carvalho, C.A.L. de, Menezes, C., Vollet-Neto, A., Contrera, F.A.L., Cortopassi-Laurino, M., Nogueira-Neto, P., Imperatriz-Fonseca, V.L. (2012) Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola, in: Imperatriz-Fonseca, V.L., Canhos, D.A.L., Alves, D.A. and Saraiva, A.M. (Eds.), Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. EDUSP, São Paulo, pp. 349-360.



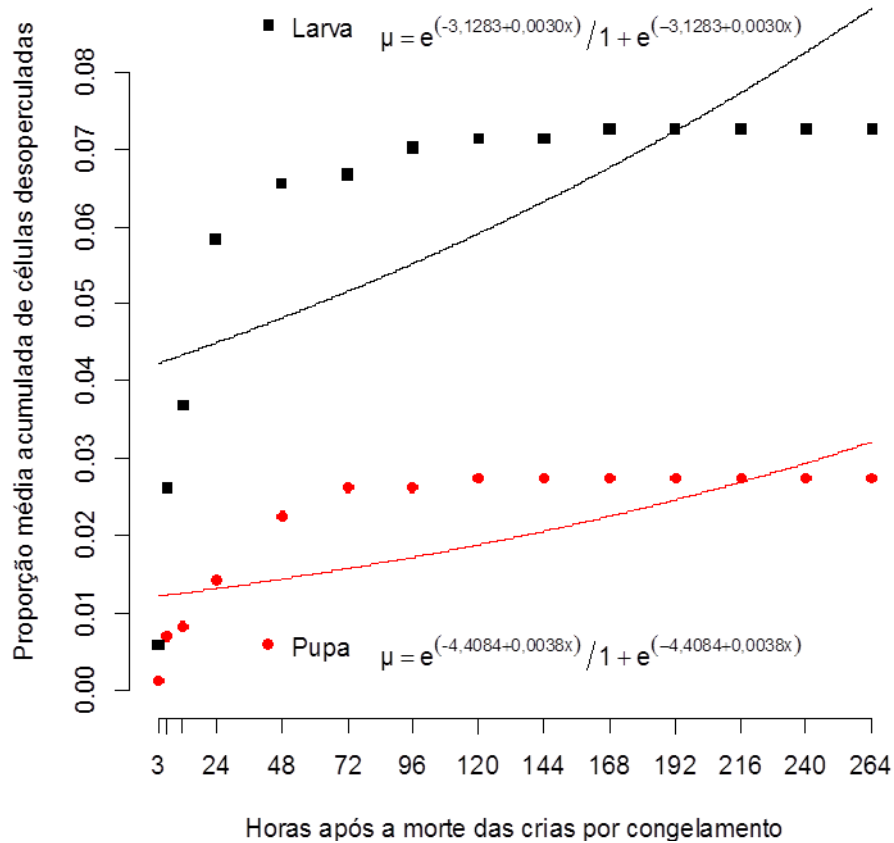
**Fig 1.** (a) Área verde - Pupa, Área Rosa - Larva, Área Branca - Controle; (b) Tubo para delimitação da área; (c) Aplicação de nitrogênio líquido; (d) Área de teste com larvas mostrando células desoperculadas e removidas.



**Fig 2.** Porcentagem de remoção acumulada de crias mortas por congelamento dentro de 48 h com seus respectivos número e percentagem de observações em cada uma das sete categorias; a) remoção de larvas (RL) e b) remoção de pupas (RP); n = 120 observações.

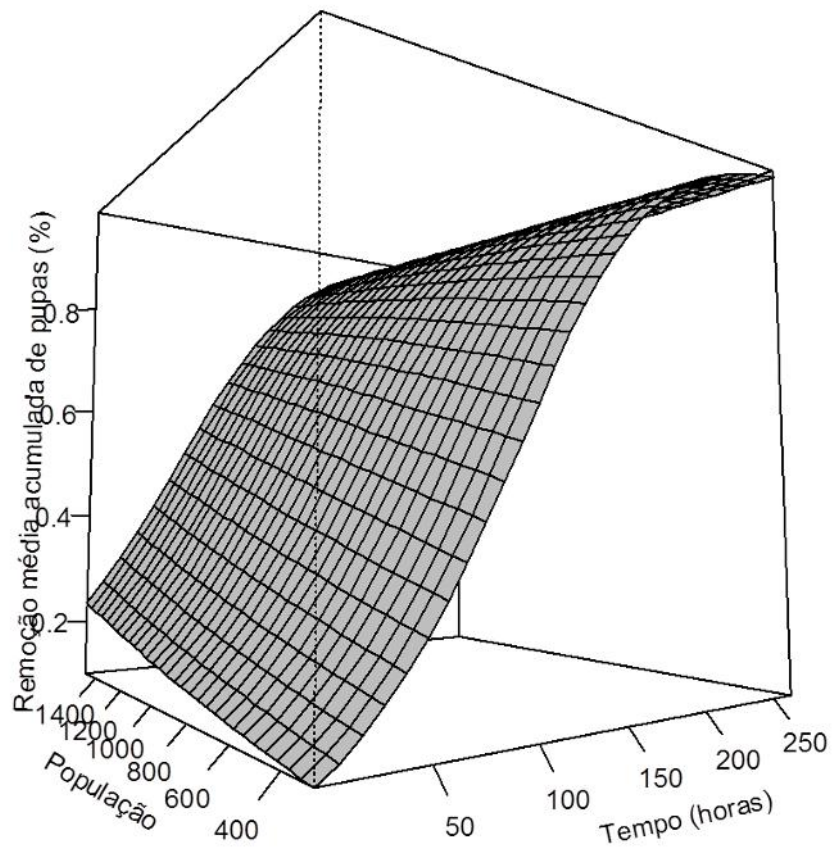


**Fig 3.** Modelos de regressão da proporção média acumulada de remoção de larvas (RL) e pupas (RP) (população média de 806 indivíduos) de *M. q. anthidioides* em função de valores de tempo, expresso em horas após a morte das crias por congelamento.

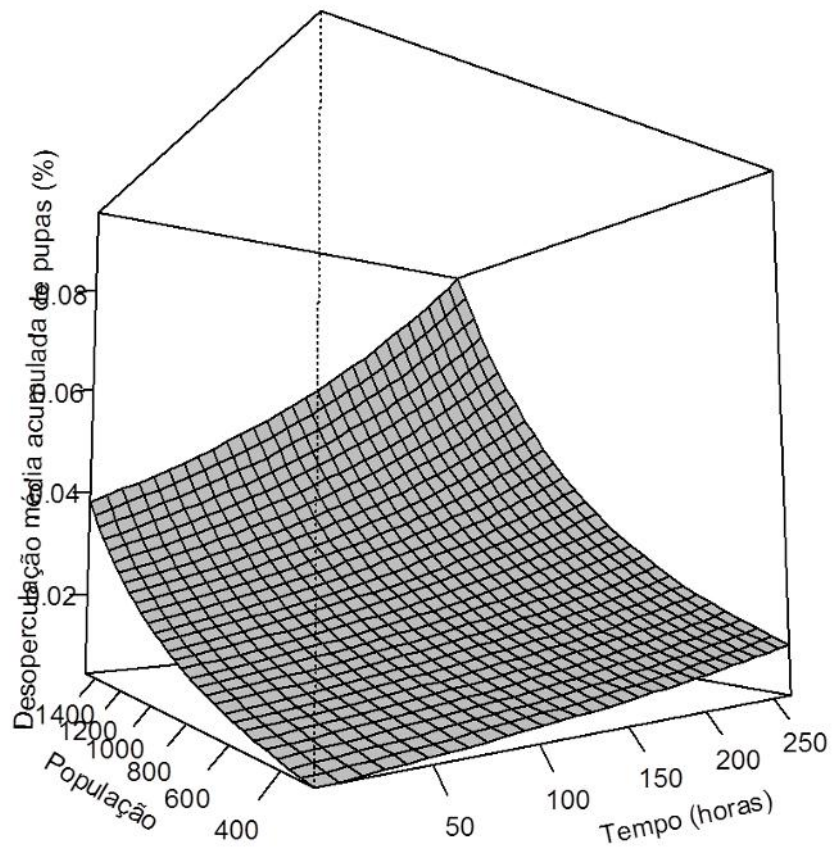


**Fig 4.** Modelos de regressão da proporção média acumulada de células desoperculadas de larvas e pupas (população média de 806 indivíduos) de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em função de valores de tempo, expresso em horas após a morte das crias por congelamento.





**Fig 5.** Modelo de superfície de resposta da proporção média acumulada de remoção de pupas (RP) de *M. q. anthidioides* em função de valores de tempo, expresso em horas após a morte das crias por congelamento, e de população das colônias. Modelo RP:  $\mu = e^{(-2,4513 + 0,0238T + 0,0008P)} / 1 + e^{(-2,4513 + 0,0238T + 0,0008P)}$ .



**Fig 6.** Modelo de superfície de resposta da proporção média acumulada de células desoperculadas de pupas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em função de valores de tempo, expresso em horas após a morte das crias por congelamento, e de população das colônias. Modelo DP:  $\mu = e^{(-5,7781 + 0,0038T + 0,0017P)} / 1 + e^{(-5,7781 + 0,0038T + 0,0017P)}$ .

**Tabela 1.** Índices de qualidade do ajuste dos modelos lineares generalizados.

<b>Variáveis</b>	<b>GL<sup>1</sup></b>	<b>Pearson <math>\chi^2</math></b>	<b>Pearson (<math>\chi^2/</math>GL)<sup>0,5</sup></b>	<b>LogLik</b>
RL	1677	6648,6	1,99	-986,0
RP	1676	5406,5	1,80	-1264,0
DL	1678	4891,0	1,71	-904,5
DP	1677	3392,4	1,42	-578,1

GL: graus de liberdade; RL: proporção media acumulada de remoção de larvas; RP: proporção media acumulada de remoção de pupas; DL: proporção media acumulada de células desoperculadas com larvas; DP: proporção media acumulada de células desoperculadas com pupas.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expansão da meliponicultura e as modificações do ambiente oferecem risco de transmissão de patógenos em abelhas sem ferrão. A obtenção de colônias com alto grau de comportamento higiênico promove o aumento da sanidade contra agentes patogênicos e contaminantes.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo o método de congelamento de crias com Nitrogênio líquido é eficiente para avaliação do comportamento higiênico em colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. O tamanho da população influencia a remoção de pupas sugerindo que o comportamento higiênico deve ser mensurado em crias na idade de larva de ultimo instar, pois independe do tamanho da população para a eficiência de remoção.

Dessa forma sugere-se que novos estudos de comportamento higiênico em abelhas sem ferrão sejam realizados considerando a influencia dos fatores ambientais, investigações de doenças nas colônias e se a seleção por comportamento higiênico em abelhas sem ferrão promove incremento na produção.

## REFERÊNCIAS

- AIDAR, D.S. 2010. **A mandaçaia: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** FUNPEC, Ribeirão Preto, São Paulo.
- ARATHI, H.S.; SPIVAK, M. 2001. Influence of colony genotypic composition on the performance of hygienic behavior in the honeybee, *Apis mellifera* L. **Animal Behaviour** 62: 57-66.
- ARONSTEIN, K.A.; MURRAY, K.D. 2010. Chalkbrood disease in honey bees. **Journal of invertebrate pathology** 103: 20-29.
- BATALHA-FILHO, H.; MELO G.A.R.; WALDSCHMIDT, A.M.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. 2009. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). **Zoologia** 26: 213-219.
- BIGIO, G.; AL TOUFAILIA, H.; RATNIEKS, F.L.W. 2014b. Honey bee hygienic behaviour does not incur a cost via removal of healthy brood. **Journal of evolutionary biology** 27: 226-230.
- BIGIO, G.; AL TOUFAILIA, H.; HUGHES, W.O.; RATNIEKS, F.L. 2014a. The effect of one generation of controlled mating on the expression of hygienic behavior in honey bees. **Journal of Apicultural Research** 53: 563-568.
- BIGIO, G.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F.L. 2013. Hygienic Behavior in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae): Effects of Brood, Food, and Time of the Year. **Journal of economic entomology** 106: 2280-2285.
- BISHOP, H. **Robbing the bees: a biography of honey - the sweet liquid gold that seduced the world.** 2005. Free Press, New York, 326p.
- BOECKING, O.; SPIVAK, M. 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie** 30: 141-158.
- BOECKING, O.; BIENEFELD, K.; DRESCHER, W. 2000. Heritability of the varroa-specific hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Animal Breeding and Genetics** 117: 417-424.
- CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. 2007. **Meliponini Lepeletier, 1836.** In Moure, J.S.; URBAN, D. e MELO, G.A.R. orgs. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region online version. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em dezembro de 2015.
- CHAMBÓ, E.D. 2016. **Beekeeping and bee conservation: advances in research.** InTech, Rijeka, Croatia. 242 p.
- CHAUZAT, M.P.; MARTEL, A.C.; BLANCHARD, P.; CLÉMENT, M.C.; SCHURR, F.; LAIR, C.; RIBIÈRE, M.; WALLNER, K.; ROSENKRANZ, P.; FAUCON, J.P. 2010. A case report of a honey bee colony poisoning incident in France. **Journal of Apicultural Research** 49: 113-115.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ROUBIK, D.W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; NOGUEIRA-NETO, P. 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie** 37: 275-292.
- COSTA-MAIA, F.M.; TOLEDO, V.A.A.; MARTINS, E.N.; LINO-LOURENÇO, D.A.; SEREIA, M.J.; OLIVEIRA, C.A.L.; FAQUINELLO, P.; HALAK, A.L. 2011. Estimates of covariance components for hygienic behaviour in Africanized honeybees (*Apis mellifera*). **Revista Brasileira de Zootecnia** 40: 1909-1916.
- CRUZ, D.O.; FREITAS, B.M.; SILVA, L.A.; SILVA, E.M.S.; BOMFIM, I.A. 2005. Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper (*Capsicum annuum*). **Revista Agropecuária Brasileira** 40: 1197-1201.
- ESPINOSA-MONTAÑO, L.G.; GUZMÁN-NOVOA, E.; SÁNCHEZ-ALBARRÁN, A.; MONTALDO, H.; CORREA-BENÍTEZ, A. 2008. Estudio comparativo de tres pruebas para evaluar el

comportamiento higiénico en colônias de abejas (*Apis mellifera* L.). **Veterinária México** 39: 39-54.

EVANS, J.D.; PETTIS, J.S. 2005. Colony-level impacts of immune responsiveness in honey bees, *Apis mellifera*. **Evolution** 59: 2270–2274.

EVANS, J.D.; SPIVAK, M. 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology** 103: 62-72.

EVANS, J.D.; ARONSTEIN, K.; CHEN, Y.P.; HETRU, C.; IMLER, J.L.; JIANG, H.; KANOST, M.; THOMPSON, G.J.; ZOU, Z.; HULTMARK, D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology** 15: 645-656.

FAQUINELLO, P.; BRITO, B.B.P.; CARVALHO, C.A.L. de; PAULA-LEITE, M.C. de; ALVES, R.M. de O. 2013. Correlação entre parâmetros biométricos e produtivos em colônias de *Melipona quadrfasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Animal Brasileira** 14: 312-317.

FREITAS, B.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; MEDINA, L.M.; KLEINERT, A.M.P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZA-EÚAN, J.J.G. 2009. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie** 40: 332-346.

GRAMACHO, K.P.; GONÇALVES, L.S. 2009. Comparative study of the hygienic behavior of Carniolan and Africanized honey bees directed towards grouped versus isolated dead brood cells. **Genetics and Molecular Research** 8: 744-750.

GRAMACHO, K.P.; GONÇALVES L.S. 2009. Sequential hygienic behavior in Carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*). **Genetics and Molecular Research** 8: 655-663.

GRAMACHO, K.P.; GONÇALVES, L.S.; ROSENKRANZ, P. e DE JONG, D. 1999. Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. **Apidologie** 30: 367-374.

GUERRA JR., J.C.V.; GONÇALVES, L.S.; DE JONG, D. 2000. Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) are more eficiente at removing worker brood astificially infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans than are Italian bees or Italian/Africanized hybrids. **Genetics and Molecular Biology** 23: 89-92.

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

HARPUR, B.A.; CHERNYSHOVA, A.; SOLTANI, A.; TSVETKOV, N.; MAHJOORIGHASRODASHTI, M.; XU, Z.; ZAYED, A. 2014. No genetic tradeoffs between hygienic behaviour and individual innate immunity in the honey bee, *Apis mellifera*. **PLoS ONE** 9: 104-214.

HARZ, M.; MÜLLER, F.; RADEMACHER, E. 2010. Organic acids: Acute toxicity on *Apis mellifera* and recovery in the haemolymph. **Journal of Apicultural Research** 49: 95-96.

JOHNSON, R.M. 2015. Honey bee toxicology. **Annual review of entomology** 60: 415- 434.

KAMEL, A.A.; MOUSTAFA, A.A.; NAFEA, E.A. 2013. Propolis as a natural antibiotic to control American foulbrood disease in honey bee colonies. **African Journal of Agricultural** 8: 3047-3062.

KLEIN, A.M.; VAISSIERE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings of the Royal Society of London B: **Biological Sciences** 274: 303-313.

LAPIDGE, K.L.; OLDROYD, B.P.; SPIVAK, M. 2002. Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. **Naturwissenschaften** 89: 565–568.

MASTERMAN, R.; ROSS, R.; MESCE, K.; SPIVAK, M. 2001. Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Comparative Physiology a Sensory, Neural, and Behavioral Physiology** 187: 441-452.

- MEDINA, L.M., HART, A.G.; RATNIEKS, F.L.W. 2009. Hygienic behavior in the stingless bees *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini). **Genetics and Molecular Research** 2: 571-576.
- MEIXNER, M.D.; COSTA, C.; KRYGER, P.; HATJINA, F.; BOUGA, M.; IVANOVA, E.; BÜCHLER, R. 2010. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. **Journal of Apicultural Research** 49: 85-92.
- MESSAGE, D.; TEIXEIRA, E.W.; DE JONG, D. 2012. Situação da sanidade das abelhas no Brasil p. 237-256. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; CANHOS, D.A.L.; ALVES, D.A.; SARAIVA, A.M., orgs. **Polinizadores do Brasil: Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. p.237- 256.
- MICHENER, C.D. 1990. **Classification of the Apidae**. University of Kansas Science Bulletin 54:75-164.
- MICHENER, C.D. 2000. **The bees of the World**. Johns Hopkins University. Baltimore 913 p.
- MICHENER, C.D. 2007. **The Bees of the World**. Ed. Johns Hopkins, Baltimore. 953 p.
- MORITZ, R.F.A. 1988. A reevaluation of the two-locus model for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.), **Journal of Heredity** 79: 257-262.
- MOURE, J.S.; KERR, W.E. 1950. Sugestões para as modificações da sistemática do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apoidea). **Dusenía** 12:105-129.
- NAZZI, F.; VEDOVA, G.D.; D'AGARO, M. 2004. A semiochemical from brood cells infested by *Varroa destructor* triggers hygienic behaviour in *Apis mellifera*. **Apidologie** 35: 65-70.
- NEWTON, D.C.; CANTEWELL, G.C. e BOURQUIN, E.P. 1975. Removal of freeze-killed brood as an index of nest cleaning behavior in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal** 115: 388-406.
- NEWTON, D.C.; OSTASIEWSKI, JR.N.J. 1986. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal** 126: 278-281.
- NICODEMO, D.; DE JONG, D.; COUTO, R.H.; MALHEIROS, E.B. 2013. Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. **Genetics and Molecular Research** 12: 6931-6938.
- NUNES, L.A.; ARAUJO, E.D.; CARVALHO, C.A.L. e WALDSCHMIDT, A.M., 2008. Population Divergence of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) Endemic to the Semi-arid Region of the State of Bahia, Brazil. **Sociobiology** 52: 81-93.
- NUNES-SILVA, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.P e GONÇALVES, L.S. 2009. Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini) **Genetics and Molecular Research** 2: 649-654.
- OLIVEIRA, K.N.de, PAULA-LEITE, M.C.de, FAQUINELLO, P., CARVALHO, C.A.L., LOURENCO, D.A.L., SAMPAIO, R.B., SANTOS, E.B. 2015. Parâmetros genéticos para características produtivas e biométricas em abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 67: 819-826.
- OLIVEIRA, M.P.de; BRITO, B.B.P.; ALVES, E.M.; FAQUINELLO, P.; ALVES, R.M. de O.; SODRÉ, G. da S.; CARVALHO, C.A.L. de. 2012. Substratos vegetais utilizados para nidificação pelas abelhas *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Scaptotrigona* sp. em área restrita do Bioma Caatinga. **Magistra** 24:186-193.
- OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos** 120: 321-326.
- OXLEY, P.R.; SPIVAK, M.; OLDROYD, B.P. 2010. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). **Molecular ecology** 19:1452-61.
- PEREIRA, R.A.; MORAIS, M.M.; FRANCOY, T.M.; GONÇALVES, L.S. 2013. Hygienic behavior of africanized honey bees *Apis mellifera* directed towards brood in old and new combs during diurnal and nocturnal periods. **Insects** 4: 521-532.

- PÉREZ-SATO, J.A.; CHÂLINE, N.; MARTIN, S.J.; HUGHES, W.O.H.; RATNIEKS, F.L. 2009. Multi-level selection for hygienic behaviour in honeybees. **Heredity** 102: 609-615.
- PIRES, S.; 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: 45-49.
- RATNIEKS, F.L.; CARRECK, N.L. 2010. Clarity on honey bee collapse? **Science** 327: 152-153.
- RINDERER, T.E.; HARRIS, J.W.; HUNT, G.J.; DE GUZMAN, L.I. 2010. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. **Apidologie** 41: 409-424.
- ROTHENBUHLER, W.C. 1964. Behavior genetics of nest cleaning behavior in honeybees. I. Response of four inbred lines to disease killed brood. **Animal Behaviour** 12: 578-583.
- SAMPAIO, R.B. 2014. Comportamento higiênico da abelha urucu (*Melipona scutellaris* LATREILLE, 1811) (HYMENOPTERA: APIDAE). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 44f.
- SARTO, M.; OLIVEIRA, E.; GUEDES, R.; CAMPOS, L. 2014. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie** 45: 626-636.
- SCHMID, M.R.; BROCKMANN, A.; PIRK, C.W.W.; STANLEY, D.W.; TAUTZ, J. 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. **Journal of Insect Physiology** 54: 439-444.
- SCHMID-HEMPEL, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology** 50: 529-551.
- SCHÖNING, C.; GISDER, S.; GEISELHARDT, S.; KRETSCHMANN, I.; BIENEFELD, K.; HILKER, M.; GENERSCH, E. 2012. Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor*-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Experimental Biology** 215: 264-271.
- SCHWARZ, H. 1948. Stingless Bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, Estados Unidos, 167 p.
- SILVA, M.A. da; OLIVEIRA, F.de A.de; HRNCIR, M. 2016. Efeito de diferentes tratamentos de polinização em berinjela em casa de vegetação. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável** 11: 30-36.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R. e ALMEIDA, E.A.B. 2002. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**, Fundação Araucária, Belo Horizonte, 253 p.
- SLAA, E. J.; CHAVES, L.A.S.; MALAGODI-BRAGA, K.S.; HOFSTEDE, F.E. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie** 37: 293-315.
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M. 1998. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa mites. Part I: Hygienic behaviour and resistance to American foulbrood. **Bee World** 79: 124-134.
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M. Facultative expression of hygienic behavior of honey bees in relation to disease resistance. 1993. **Journal of Apicultural Research** 32: 147-157.
- SPIVAK, M.; REUTER, G.S. 1998a. Honey bee hygienic behavior. **American Bee Journal** 138: 283- 286.
- SPIVAK, M.; REUTER, G.S. 1998b. Performance of hygienic honey bee colonies in a comercial apiary. **Apidologie** 29: 291-302.
- SPIVAK, M.; REUTER, G.S. 2001. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. **Journal of Economic Entomology** 94: 326-31.
- SPIVAK, M.; DOWNEY, D.L. 1998. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology** 91: 64-70.



SPIVAK, M.; MASTERMAN, R.; ROSS, R.; MESCE, K.A. 2003. Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. **Journal of Neurobiology** 55: 341-354.

STANIMIROVIC, Z.; PEJOVIC, D.; STEVANOVIC, J. 2002. Hygienic behavior in disease resistance of two honeybee ecogeographic varieties (*Apis mellifera carnica*) from Serbia. **Apiacta** 1.

STANIMIROVIC, Z.; STEVANOVIC, J.; MIRILOVIC, M.; STOJIC, V. 2008. Heritability of hygienic behavior in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*). **Acta veterinaria** 58: 593-601.

SWANSON, J.A.I.; TORTO, B.; KELLS, S.A.; MESCE, K.A.; TUMLINSON, J.H.; SPIVAK, M. 2009. Odorants that induce hygienic behavior in honeybees: identification of volatile compounds in chalkbrood-infected honeybee larvae. **Journal of Chemical Ecology** 35: 1108-1116.

TSURUDA, J.M.; HARRIS, J.W.; BOURGEOIS, L.; DANKA, R.; HUNT, G.J. 2012. High-resolution linkage analyses to identify genes that influence Varroa sensitive hygiene behavior in honey bees. **PLoS One** 7: 48276.

vanENGELSDORP, D.; EVANS, J.D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B.K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D.R. e PETTIS, J.S. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS ONE** 4: 6481.

VENTURIERI, G.C.; ALVES, D.A.; VILLAS-BÔAS, J.K.; CARVALHO, C.A.L.de; MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F.A.L.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2012. Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In: Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca; Dora Ann Lange Canhos; Denise de Araujo Alves; Antonio Mauro Saraiva. (Org.). **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. 1ed.São Paulo-SP: EDUSP, p. 349-360.

WAITE, R.; BROWN, M.; THOMPSON, H. 2003. Hygienic behaviour in honey bees in the UK: a preliminary study. **Bee World** 84: 19-26.

WILSON-RICH, N.; DRES, S.T.; STARKS, P.T. 2008. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology** 54: 1392-1399.

WILSON-RICH, N.; SPIVAK, M.; FEFFERMAN, N.H.; STARKS, P.T. 2009. Genetic, Individual and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. **Annual Review of Entomology** 54: 405-23.

ZHAO, H.; LIANG, Q.; LEE, J.; ZHANG, X.; HUANG, W.; CHENG, H.; LUO, Y. 2015. Behavioral Responses of *Apis mellifera* Adult Workers to Odors from Healthy Brood and Diseased Brood. **Sociobiology** 62: 564-570.