


DOAÇÃO

ELEUZA GOMES TENÓRIO

BIBLIOTECA CENTRAL  
- UFV -

UFV	BIBLIOTECA	BBT	OBRA	RG000694351
	CLASSIFICAÇÃO	T 595.799451 / T312c / 1996		
TÍTULO				
Comportamento higienico em abelhas indigenas				
				
127567		BBT		

227.567

22.08.96

COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM ABELHAS INDÍGENAS (*Melipona quadrifasciata* LEPELETIER, 1836 E *Tetragonisca angustula* LATREILLE, 1811) E EM ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* LINNAEUS, 1758)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Entomologia, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

T  
595.799451  
T312c  
1996  
ex. 1

VIÇOSA - MINAS GERAIS - BRASIL

JULHO - 1996

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

T312c  
1996

Tenório, Eleuza Gomes, 1970 -  
Comportamento higiênico em abelhas indígenas (*Melipona  
quadrifasciata* Lepeletier, 1836 e *Tetragonisca angustula*  
Latreille, 1811) e em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*  
Linnaeus, 1758 / Eleuza Gomes Tenório. - Viçosa : UFV,  
1996.

54p. : il.

Orientador: Dejair Message

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Abelhas indígenas - Comportamento higiênico. 2. Abelha-  
africanizada - Comportamento higiênico. I. Universidade Fede-  
ral de Viçosa. II. Título.

CDD.18.ed. 595.79945

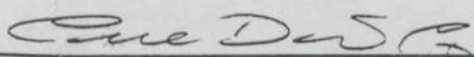
CDD. 19.ed. 595.799451

ELEUZA GOMES TENÓRIO

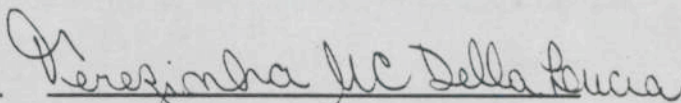
COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM ABELHAS INDÍGENAS (*Melipona quadrifasciata* LEPELETIER, 1836 E *Tetragonisca angustula* LATREILLE, 1811) E EM ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* LINNAEUS, 1758)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Entomologia, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

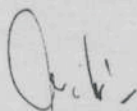
APROVADA: 16 de abril de 1996.



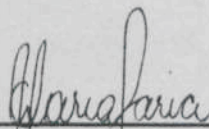
Prof. Cosme Damião Cruz  
(Conselheiro)



Prof. Terezinha M.C. Della Lucia



Prof. Evaldo F. Vilela



Prof. Georgina M. de Faria



Prof. Lúcio A. de Oliveira Campos  
(Presidente da banca)

## AGRADECIMENTO

A Universidade Federal de Viçosa, em especial, ao Departamento de Ecologia Animal pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

Aos meus pais Paulo J. de Brito Tenório, tão presente em meus pensamentos, pela saudade que deixou, tão vivo em minhas ações, pelos exemplos que me transmitiu, e Maria Janete A. G. Tenório, com todo o meu amor.

A TV Viçosa, na pessoa do Luis Nery, pelo auxílio no manuseio dos equipamentos.

A todas as abelhas sacrificadas em prol desta pesquisa, meu reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Dejar Messaça, pela orientação, pela dedicação, pelo desprendimento, pela confiança, pelo incentivo constante, pelo respeito e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Lucio A. de O. Campos, pela participação inestimável na presidência da banca de defesa da tese, pela direção, pelas sábias sugestões e pelas críticas.

Ao Prof. Dr. Cosmo Damirio Cruz, pelas contribuições indispensáveis como Conselheiro.

Ao Prof. Paulo De Marco Junior, pela amizade e pela assistência nas análises estatísticas.

A Prof. Dr.ª Terezinha M.C. Della Lucia, ao Prof. Dr. Eivaldo F. Vilela e à Prof. Dr.ª Georgina M. de Faria, pela amizade, pelas valiosas sugestões e pelas críticas.

A Mestre Izabel Christina da Silva, por compartilhar todos os momentos durante o curso, pelo incentivo e pelo auxílio na preparação do manuscrito.

Ao Prof. Dr. Dominique Fresneau, pelo fornecimento das etiquetas para marcação de insetos.

Aos demais professores do Curso de Entomologia da UFV, pelos ensinamentos e pela amizade.

#### AGRADECIMENTO

Aos técnicos do Agiar: Vinícius Costa, Galceminho Correia (Lulu), Antônio de Pádua Lopes (Toninho), Iris Raimundo Stanciole, José Antônio Silva (BO) e Geraldo Paiva (Cabrito), pela amizade e pela inestimável ajuda prestada à realização dos experimentos.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial, ao Departamento de Biologia Animal, pela acolhida e pelas facilidades fornecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

À TV Viçosa, na pessoa do Luís Neno, pelo auxílio no manuseio dos equipamentos.

A todas as abelhas sacrificadas em prol desta pesquisa, meu reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Dejair Message, pela orientação, pela dedicação, pelo desprendimento, pela confiança, pelo incentivo constante, pelo respeito e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Lúcio A. de O. Campos, pela participação inestimável na presidência da banca de defesa da tese, pela atenção, pelas sábias sugestões e pelas críticas.

Ao Prof. Dr. Cosme Damião Cruz, pelas contribuições indispensáveis como Conselheiro.

Ao Prof. Paulo De Marco Júnior, pela amizade e pela assistência nas análises estatísticas.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Terezinha M.C. Della Lucia, ao Prof.Dr. Evaldo F. Vilela e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Georgina M. de Faria, pela amizade, pelas valiosas sugestões e pelas críticas.

À Mestra Izabel Christina da Silva, por compartilhar todos os momentos, durante o curso, pelo incentivo e pelo auxílio na preparação do manuscrito.

Ao Prof. Dr. Dominique Fresneau, pelo fornecimento das etiquetas para marcação de insetos.

Aos demais professores do Curso de Entomologia da UFV, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos técnicos do Apiário: Osmar dos Anjos Costa, Gelcemino Correia (Lulu), Antônio de Pádua Lopes (Toninho), Íris Raimundo Stanciola, José Antônio Silva (50) e Geraldo Paiva (Cabrito), pela amizade e pela inestimável ajuda prestada à realização dos experimentos.

À secretária do Curso de Entomologia, Maria Paula Aparecida da Costa, pela amizade, pela carinhosa dedicação e pela presteza.

Ao técnico de laboratório, Francisco Ribeiro (Xico), pela ajuda na aquisição dos materiais utilizados nos experimentos.

Ao Carlos A. R. Matrangolo (Gu), pelo companheirismo, pelo apoio, pela compreensão, pela indispensável ajuda e pela maravilhosa convivência.

Ao Rui Peruquetti, pela amizade, pela inestimável ajuda no manuseio dos computadores e pelo auxílio na preparação do manuscrito.

À Luci Boa Nova Coelho e ao Elidiomar Ribeiro da-Silva, pela amizade, pelo companheirismo e pelo apoio decisivo, que facilitaram a realização dos experimentos.

Ao Marco Antônio dos Santos, pela amizade e pela colaboração no trabalho com as abelhas.

A todos os colegas do Curso de Entomologia, pela agradável convivência.

## BIOGRAFIA

Eleuza Gomes Tenório, filha de Paulo Jesus de Brito Tenório e de Maria Janete Alves Gomes Tenório, nasceu em Bezerros, Pernambuco, em 15 de fevereiro de 1970.

Em março de 1993, graduou-se em Biologia, pela Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA.

Em março de 1993, iniciou o Curso de Mestrado em Entomologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

1.3 Em 16 de abril de 1996, defendeu Tese. 7

1.4 O comportamento higiênico nas abelhas africanizadas 7

1.5 O comportamento higiênico nas abelhas indígenas 8

2 AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA MATAR CRIAS 11

2.1. Introdução 11

2.2. Materiais e métodos 13

2.3. Resultados 15

2.4. Discussão 20

2.5. Resumo e conclusões 22

3. Descrição do comportamento higiênico.....	24
3.1. Introdução.....	24
3.2. Materiais e métodos.....	25
3.2.1. Operárias marcadas.....	25
3.2.2. Técnica para matar crias.....	26
3.2.3. Procedimento dos experimentos.....	27
3.2.4. Observação do comportamento.....	27
3.3. Resultados.....	31
3.3.1. Abelhas africanizadas.....	31
3.3.2. Abelhas indígenas.....	33
3.3.3. Atividade das operárias com as crias mortas.....	34
3.3.4. Transporte das crias mortas para fora da colônia.....	36
3.3.5. Faixa etária das operárias que executaram o comportamento higiênico.....	
	PÁGINA
EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
3.5. Resumo e conclusões.....	45
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais.....	1
1.2. O comportamento higiênico.....	3
1.3. Técnicas para matar crias.....	7
1.4. O comportamento higiênico nas abelhas africanizadas.....	7
1.5. O comportamento higiênico nas abelhas indígenas.....	8
2. AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA MATAR CRIAS.....	11
2.1. Introdução.....	11
2.2. Materiais e métodos.....	13
2.3. Resultados.....	15
2.4. Discussão.....	20
2.5. Resumo e conclusões.....	22

3. DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO.....	24
3.1. Introdução.....	24
3.2. Materiais e métodos.....	25
3.2.1. Operárias marcadas.....	25
3.2.2. Técnica para matar crias.....	26
3.2.3. Procedimento dos experimentos.....	27
3.2.4. Observação do comportamento.....	27
3.3. Resultados.....	31
3.3.1. Abelhas africanizadas.....	31
3.3.2. Abelhas indígenas.....	33
3.3.3. Atividade das operárias com as crias mortas.....	34
3.3.4. Transporte das crias mortas para fora da colônia.....	36
3.3.5. Faixa etária das operárias que executaram o comportamento higiênico.....	39
3.3.6. Remoção dos controles.....	40
3.4. Discussão.....	40
3.5. Resumo e conclusões.....	45
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

depositadas na lixeira da colônia, sendo posteriormente transportadas para o campo. O não-canibalismo evita que as operárias se contaminassem, caso as crias estivessem infectadas, contribuindo para o controle de doenças.

## EXTRATO

TENÓRIO, Eleuza Gomes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1996.  
**Comportamento higiênico em abelhas indígenas (*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 e *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811) e em abelhas africanizadas (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758).** Professor Orientador: Dejour Message. Professores Conselheiros: Lúcio A. de Oliveira Campos e Cosme Damião Cruz.

Neste trabalho, confirmou-se a ocorrência do comportamento higiênico em abelhas da subfamília Meliponinae: *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula*; avaliou-se a resposta destas abelhas e de *Apis mellifera* (africanizadas) às crias mortas, pelas técnicas de congelamento e perfuração; e descreveu-se o comportamento higiênico das abelhas indígenas, comparando-o com aquele observado nas abelhas africanizadas. *A. mellifera* não mostrou diferença na remoção, em relação às crias mortas pelas duas técnicas. Nas abelhas indígenas, foi verificada maior rapidez na detecção e na remoção das crias mortas, pela técnica de congelamento, indicando que esta técnica seria a mais adequada para estudos sobre o comportamento higiênico nessas abelhas. Nas africanizadas, o comportamento higiênico envolveu o canibalismo total das crias mortas, na fase de larva em período de alimentação e de larva pós-defecante, o canibalismo parcial, no caso de pupas de olho-branco, e a remoção dos imagos. Nas abelhas indígenas, as operárias não ingeriram crias mortas, qualquer que fosse sua idade. Houve apenas remoção destas crias, que foram

depositadas na lixeira da colônia, sendo posteriormente transportadas para o campo. O não-canibalismo evitaria que as operárias se contaminassem, caso as crias estivessem infectadas, contribuindo para o controle de doenças.

#### ABSTRACT

TENORIO, Eleuza Gomes. M.S., Federal University of Viçosa, July, 1998.  
Hygienic behavior of stingless bees (*Melipona quadrifasciata* Lapeletier, 1838 and *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811) and africanized honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758). Adviser: Deivar Message. Committee members: Lúcio A. de Oliveira Campos and Cosme Camião Cruz.

This study has confirmed hygienic behavior of Meliponine bees: *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. Their response to dead brood removal was compared to that of africanized honey bees using the freezing and pin puncturing techniques and their hygienic behavior was described and compared. No differences in dead brood removal were found with both techniques in the africanized honey bees. Dead brood detection and removal was quicker among stingless bees when using the freezing technique, suggesting this would be a more appropriate technique to study hygienic behavior of these bees. Hygienic behavior of africanized honey bees involved total dead brood cannibalism during the larval stage, for both feeding and post-defecating larvae, partial cannibalism in the case of white-eyed pupae and imago removal. For stingless bees, workers did not feed on dead brood, irrespective of the latter's age, occurring only removal of the brood that was deposited in waste dumps and subsequently transported to the field. The absence of cannibalism would avoid workers' contamination in case brood were infected, contributing as a disease control measure in the colony.

## ABSTRACT

TENÓRIO, Eleuza Gomes, M.S., Federal University of Viçosa, July, 1996. Hygienic behavior of stingless bees (*Melipona quadrifasciata* Lapeletier, 1836 and *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811) and africanized honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758). Adviser: Dejour Message. Committee members: Lúcio A. de Oliveira Campos and Cosme Damião Cruz.

This study has confirmed hygienic behavior of Meliponinae bees: *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. Their response to dead brood removal was compared to that of africanized honey bees using the freezing and pin puncturing techniques and their hygienic behavior was described and compared. No differences in dead brood removal were found with both techniques in the africanized honey bees. Dead brood detection and removal was quicker among stingless bees when using the freezing technique, suggesting this would be a more appropriate technique to study hygienic behavior of these bees. Hygienic behavior of africanized honey bees involved total dead brood cannibalism during the larval stage, for both feeding and post-defecating larvae, partial cannibalism in the case of white-eyed pupae and imago removal. For stingless bees, workers did not feed on dead brood, irrespective of the latter's age, occurring only removal of the brood, that was deposited in waste dumps and subsequently transported to the field. The absence of cannibalism would avoid workers' contamination in case brood were infected, contributing as a disease control measure in the colony.

exercitam as mais variadas funções de construção e manutenção da colônia, desde o cuidado com a cria até a coleta de alimento no campo (VELTHUIS e SCHWABER, 1991). Outras características compartilhadas por espécies altamente eussociais são: colônias perenes, sistema de comunicação e arquitetura dos ninhos bem-elaborados, grande quantidade de alimento estocado e normalmente termoregulação, altamente, eficiente (SARICIC, 1962).

Entretanto, existem algumas diferenças que indicam o distinto relacionamento entre estas espécies. Existem várias diferenças morfológicas, por exemplo, variação dos asas, estrutura dos aparatos do furão (rudimentar nos Meliponinae), forte musculatura mandibular e posição das glândulas de cera (dorsal nos Meliponinae e ventral nos Apinae). Quanto à

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações gerais

O mais alto nível de organização social em abelhas é encontrado na família Apidae, nas subfamílias Apinae e Meliponinae (MICHENER, 1974).

Entre os Apinae, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, é a espécie mais estudada e apresenta várias subespécies. No Brasil, predomina a abelha africanizada, resultante do cruzamento entre *Apis mellifera scutellata* Lapeletier, 1836, trazidas para o Brasil do Sul da África, em 1956, e as diversas subespécies de *A. mellifera* européias, introduzidas a partir de 1839 (GONÇALVES, 1974). As abelhas indígenas, encontradas no Brasil, pertencem à subfamília Meliponinae, tribos Meliponini, com um único gênero, *Melipona*, e Trigonini, com diversos gêneros, entre eles, *Tetragonisca*.

Pelo fato de os Meliponinae e de os Apinae serem grupos eussociais avançados, existem diversas similaridades básicas entre eles. Suas populosas colônias são compostas, principalmente, por fêmeas, que são especializadas em duas castas distintas, nas quais uma difere da outra, não apenas comportamentalmente, fisiologicamente e usualmente, em tamanho, mas também em estruturas externas e internas. A rainha é responsável pela oviposição e controla muitas das atividades da colônia, por meio de feromônios, que influenciam fortemente a fisiologia e o comportamento das operárias, garantindo, assim, a integridade e o funcionamento do ninho. As operárias

executam as mais variadas funções de construção e manutenção da colméia, desde o cuidado com a cria até a coleta de alimento no campo (VELTHUIS e SOMMEIJER, 1991). Outras características compartilhadas por espécies altamente eussociais são: colônias perenes, sistema de comunicação e arquitetura dos ninhos bem-elaborados, grande quantidade de alimento estocado e normalmente termorregulação, altamente, eficiente (SAKAGAMI, 1982).

Entretanto, existem algumas diferenças, que indicam o distante relacionamento entre estas subfamílias. Estas incluem várias diferenças morfológicas, por exemplo, venação das asas, estrutura dos aparatos do ferrão (rudimentar nos Meliponinae), forte musculatura mandibular e posição das glândulas de cera (dorsal nos Meliponinae e ventral nos Apinae). Quanto à estrutura do ninho, na maioria dos Meliponinae, os favos são construídos, horizontalmente, e são destinados apenas ao desenvolvimento das crias. O alimento é armazenado em potes de cera bastante diferentes dos favos de cria (SAKAGAMI e ZUCCHI, 1966). Nos Apinae, os favos são verticais e as células abrem-se nos dois lados opostos. Estas células servem tanto para estocar o alimento quanto para o desenvolvimento das crias (MICHENER, 1974). Além disso, os Meliponinae apresentam um sistema de aprovisionamento massal para alimentar suas larvas. Durante períodos curtos e intensivos da atividade de aprovisionamento, no qual um número restrito de abelhas participa, o alimento é despejado na célula; em seguida, as operárias podem depositar um ou mais ovos tróficos; a rainha sorve parte do alimento larval; ingere o ovo trófico; faz sua postura no topo do alimento; e a célula é, então, imediatamente operculada (VELTHUIS e SOMMEIJER, 1991). No caso dos Apinae, as operárias alimentam as crias progressivamente. A rainha põe o ovo na célula vazia e três dias depois, a larva nasce e passa a receber alimento durante, aproximadamente, seis dias, seguindo-se a operculação da célula (SAKAGAMI e ZUCCHI, 1966). Nos Meliponinae, as operárias normalmente defecam em locais bem-definidos, dentro do ninho e, posteriormente, as fezes juntamente com outros materiais das lixeiras são removidos da colônia (SAKAGAMI, 1982). Em *Apis*, as colônias não

apresentam lixeiras, os materiais estranhos e as abelhas mortas são removidos para fora da colméia e as operárias defecam fora do ninho (GARY, 1992).

O grupo das abelhas indígenas é caracterizado, por sua alta diversidade, e mostra interesse especial, em virtude dos vários níveis de sociabilidade, encontrados (VELTHUIS e SOMMEIJER, 1991), por sua abundância e por sua grande variação de tamanho, o que faz que sejam consideradas importantes polinizadores nos trópicos (ROUBIK, 1989). Além disso, a meliponicultura (criação racional) tem sido incentivada e seus produtos, utilizados na alimentação, ou como remédio, apresentam grande procura em várias regiões do Brasil, como, por exemplo, méis de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (mandaçaia) e *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (jataí), em Minas Gerais, São Paulo e Paraná (KERR et al., 1994).

## 1.2. O comportamento higiênico

Segundo MESSAGE (1994), ocorrem quatro tipos principais de doenças nas crias de *A. mellifera*, que são a cria-pútrida-americana, a cria-pútrida-européia, a cria-ensacada e a cria-giz. As características destas doenças têm sido descritas por BAILEY (1981), CRANE (1990) e MORSE e NOWOGRODZKI (1991), entre outros. Nestas abelhas, o controle dessas doenças pode ser auxiliado, por meio do comportamento higiênico. Entre os Melliponinae, existem poucos relatos a respeito de doenças, principalmente, as de cria.

KERR (1948) observou crias mortas em colônias de *M. quadrifasciata* e *Melipona nigra* (= *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836), possivelmente em consequência de doença causada por bactérias. NOGUEIRA-NETO (1970) observou mortalidade de crias de *M. quadrifasciata*, *Plebeia* spp., *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 e mais, raramente, de *T. angustula*, numa fase que denominou de transição (final da fase larval), ou, às vezes, um pouco antes de a larva atingir esta idade.

Vários mecanismos de resistência às doenças de cria são conhecidos em *A. mellifera*. Em relação à cria-pútrida-americana, são descritos a própria resistência fisiológica das larvas (ROTHENBUHLER e THOMPSON, 1956 e SUTTER

et al., 1968); o processo de filtração de patógenos do alimento efetuado, por meio da válvula proventricular (STURTEVANT e REVELL, 1953 e THOMPSON e ROTHENBUHLER, 1957); e as substâncias bactericidas ou bacteriostáticas, como o ácido 10-hidroxi-decenóico presente na geléia real (BLUM et al., 1959). Outros mecanismos de resistência têm sido propostos, envolvendo produtos da colônia, como a resina das plantas coletada pelas abelhas, e os produtos da glândula de Dufour e das glândulas cefálicas de abelhas adultas e imaturas, que são agentes biocidas, geralmente usados para impedir o desenvolvimento de patógenos (ROUBIK, 1989).

O comportamento higiênico, considerado um raro exemplo de mecanismo comportamental de resistência a doenças (SPIVAK e GILLIAM, 1993), tem sido estudado, principalmente em *A. mellifera*. É normalmente definido, como a capacidade de as abelhas detectarem, desopercularem e removerem crias mortas das células (ROTHENBUHLER, 1964a, 1964b e MESSAGE, 1979), apesar de ser também definido, como a remoção de qualquer material estranho do interior da colméia (MESSAGE, 1979). MORETO (1993) ampliou este conceito, considerando como higiênicas as colônias, cujas operárias conseguem se livrar do ácaro *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904.

Foi nos trabalhos de PARK (1936, 1937) e PARK et al.(1937), que, pela primeira vez, observou-se que havia uma variação, em relação à resistência às doenças (especificamente à cria-pútrida-americana), em *A. mellifera*, e que nas colônias, que apresentavam o fator para resistência, este poderia ser transmitido de uma estação do ano para outra, isto é, era herdável, havendo um nível fisiológico e outro comportamental de resistência.

O comportamento higiênico praticamente começou a ser estudado, a partir dos experimentos de WOODROW e HOLST (1942), quando mostraram que linhagens resistentes à cria-pútrida-americana removiam todas as crias mortas e as linhagens susceptíveis não.

A partir destes trabalhos, vários outros foram realizados, visando conhecer melhor os mecanismos de resistência à cria-pútrida-americana como, por exemplo, STURTEVANT e REVELL (1953), ROTHENBULER e THOMPSON (1956),

THOMPSON e ROTHENBULER (1957), LEWIS e ROTHENBULER (1961), BAMRICK e ROTHENBULER (1961), BAMRICK (1964, 1967), TRUMP et al. (1967), RINDERER e ROTHENBULER (1969) e ROSE e BRIGGS (1969).

THOMPSON (1964) verificou que colônias, compostas de abelhas jovens de linhagem resistente à cria-pútrida-americana, removiam todas, ou quase todas as crias doentes, independente das condições do fluxo de néctar, enquanto abelhas com mais de quatro semanas de idade somente removiam as crias mortas, durante um fluxo de néctar. MOMOT e ROTHENBUHLER (1971) verificaram que linhagens suscetíveis, que normalmente removem as crias lentamente, não eram afetadas pelo fluxo de néctar. ROTHENBUHLER (1964a, 1964b) também observou o efeito do fluxo de néctar no comportamento higiênico.

A quantidade de cria morta (de 100 a 2.000) parece não afetar o comportamento higiênico (JONES e ROTHENBUHLER, 1964). No entanto, uma grande desproporção, entre cria morta e abelhas nutrizas, parece reduzir este comportamento (THOMPSON, 1964). MOMOT e ROTHENBUHLER (1971) consideraram que a idade das abelhas, seu genótipo e o fluxo do néctar seriam todos fatores importantes, que influenciariam na taxa de remoção de crias mortas.

A base genética do comportamento higiênico foi estudada por ROTHENBUHLER (1964a, 1964b), quando ficou constatado que este comportamento é controlado por dois genes recessivos. Um deles, "u" ("uncapper"), responsável pela desoperculação de células, contendo crias mortas, e o outro, "r" ("remove"), responsável pela remoção de crias mortas. Uma vez que são genes recessivos, sua atuação depende de estarem em homozigose. Segundo este autor, as abelhas são classificadas, como higiênicas, apenas se possuírem ambos os genes em homozigose (u/u:r/r), e, em qualquer outra situação, são chamadas não-higiênicas. Posteriormente, MORITZ (1988) propôs que a expressão fenotípica deste comportamento poderia ser determinada por mais de um loco, sendo o comportamento higiênico,

controlado por três locos gênicos e não por dois. No entanto, esta suposição ainda não foi comprovada experimentalmente.

A expressão do comportamento higiênico pode ser facultativa, dependendo do vigor da colônia (forte, ou fraca), da composição de operárias (higiênicas e não-higiênicas), da necessidade de espaço, isto é, de células, das condições de recurso e de fatores ainda desconhecidos, embora este comportamento seja determinado geneticamente (SPIVAK e GILLIAM, 1993).

JONES e ROTHENBUHLER (1964), MOMOT e ROTHENBUHLER (1971) e MESSAGE (1979) consideraram que o comportamento higiênico consiste na seqüência de três passos: pontuação de células, ou seja, um orifício no opérculo (fase inicial da desoperculação), desoperculação de células e remoção de crias. MILNE JR. (1985a), entretanto, verificou que a pontuação do opérculo e o aumento do orifício (desoperculação da célula) estão diretamente relacionados, indicando que os dois seriam o mesmo comportamento.

NEWTON et al. (1975) sugeriram que, nas *A. mellifera* européias, a remoção de crias mortas em cerca de cinco dias, representa uma apreciável resistência às doenças de cria.

Estudos sobre o comportamento higiênico e a resistência a outras doenças também têm sido feitos por alguns pesquisadores. De acordo com TABER (1982a), toda e qualquer doença de cria será eliminada, por meio do comportamento higiênico. Entretanto, MILNE JR. (1985b) mostrou que o comportamento higiênico não confere resistência à doença cria-pútrida-européia. Por outro lado, GILLIAM et al. (1983) verificaram que as abelhas podem detectar e remover crias com sintomas da cria-giz, antes que o apicultor possa percebê-los. Posteriormente, TABER (1986) verificou uma baixa correlação entre o comportamento higiênico e a resistência à cria-giz.

Mais recentemente, o comportamento higiênico foi estudado, em relação à resistência das abelhas ao ácaro *V. jacobsoni* para as *A. mellifera* (MORETO, 1993 e SPIVAK et al., 1994), para as *Apis mellifera intermissa* Buttel-Reepen, 1906 (BOECKING e RITTER, 1993) e para *Apis cerana* Fabricius, 1798 (ROSENKRANZ et al., 1993).

### 1.3. Técnicas para matar crias

Para *A. mellifera* existem alguns métodos, utilizados para avaliar o comportamento higiênico. Estes consistem em matar crias da casta operária, por meio de técnicas, como inoculação de patógenos (PARK, 1936; WOODROW e HOLST, 1942 e ROTHENBULER, 1964a, 1964b, entre outros); utilização do gás cianeto (JONES e ROTHENBUHLER, 1964 e MOMOT e ROTHENBUHLER, 1971); congelamento ("freeze-killing") (GONÇALVES e KERR, 1970; MESSAGE, 1979 e SPIVAK e GILLIAM, 1993, entre outros); perfuração ("pin-killing") (NEWTON e OSTASIESWSKI JR., 1986; DANKA e VILLA, 1994; BUCHLER, 1994 e GRAMACHO, 1995); e microinjeções de água, etanol, ou extrato de pupa macho (TIRERA, 1994).

### 1.4. O comportamento higiênico nas abelhas africanizadas

No Brasil, onde hoje predominam as abelhas africanizadas, o comportamento higiênico começou a ser estudado, a partir dos trabalhos de GONÇALVES e KERR (1970), os quais afirmaram que para uma colônia ser considerada resistente, as operárias devem remover pelo menos 50% das crias mortas, em 48 h, e 100%, em 72 h. Caso contrário, elas não têm aptidão para suportar ataques de moléstias, especialmente, no caso de cria-pútrida. Entretanto, MORETO (1993) considera colônia higiênica aquela que apresenta capacidade de remoção de crias, no mínimo de 85%, e não-higiênicas aquelas que removerem abaixo de 50%, em 48 h.

COSENZA e SILVA (1972) observaram que as abelhas africanas e as africanizadas eram mais resistentes, ou mais higiênicas que as caucasianas. Além disso, LENGLER (1977) verificou que as abelhas africanizadas teriam uma leve vantagem quanto à eficiência de remoção de crias, em relação às abelhas italianas. GRAMACHO (1995) observou que o comportamento higiênico nas abelhas africanizadas é mais eficiente do que nas abelhas italianas e nas abelhas caucasianas.

Segundo MESSAGE (1979), a idade do favo, que contém crias mortas (novo, ou velho), não influencia o comportamento, no entanto, a idade da cria morta influencia, fortemente, a eficiência de remoção. Utilizando-se crias mortas

com idades de 10 e 20 dias, a eficiência de limpeza é maior, havendo decréscimo quando as crias utilizadas têm de 12 a 18 dias. Também, de acordo com esses autores, as condições climáticas parecem influenciar o comportamento higiênico, pois ambientes com temperatura média de 25,4°C proporcionaram menor comportamento higiênico, e ambientes com temperatura média de 18°C favoreceram o comportamento higiênico. Além disso, verificaram maior eficiência na execução deste comportamento, em períodos chuvosos, do que em períodos secos. Por outro lado, GRAMACHO (1995) observou que o comportamento higiênico foi mais eficiente, em dias ensolarados, que em dias tendentes à chuva. Também verificou que o tamanho populacional da colônia (com, aproximadamente, 5.000, 10.000 e 25.000 indivíduos) não interfere no comportamento higiênico.

Algumas condições da colônia exercem grande influência sobre o comportamento higiênico. Neste caso, as quantidades de mel, ovos e larvas mostraram uma correlação positiva, enquanto a quantidade de células vazias apresentou correlação negativa, em relação ao comportamento higiênico, expresso pelo número de crias removidas (MESSAGE, 1979).

De acordo com MORETO (1993), o comportamento de limpeza também interfere na taxa de infestação do ácaro *V. jacobsoni*, uma vez que a remoção de crias, com grande quantidade do ácaro, diminui sua infestação na colônia. Neste aspecto, observou também que as abelhas africanizadas foram sete vezes mais eficientes que as italianas. SILVA (1994) mostrou que as colônias mais infestadas, por este ácaro, iniciavam mais rapidamente a atividade de limpeza, porém a continuidade deste comportamento foi mais lenta, quando comparado a colônias menos infestadas, mostrando que a resistência às doenças não está relacionada, somente, com a rapidez no início da atividade de limpeza, mas também, com a continuidade deste comportamento.

### 1.5. O comportamento higiênico nas abelhas indígenas

Quanto à subfamília Meliponinae, verifica-se a escassez de trabalhos específicos sobre o comportamento higiênico. Entretanto, Drory (1872, 1873) e Rayment (1932), apud NOGUEIRA-NETO (1970), observaram crias sendo

removidas para fora da colônia. Kerr<sup>1</sup> (comunicação pessoal) observou que, durante os meses mais frios em Uberlândia (MG), colônias de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, que é uma abelha típica do litoral nordestino, tiveram um grande número de crias mortas, sendo removidas para fora da colônia.

NOGUEIRA-NETO (1970) descreveu alguns aspectos básicos do comportamento higiênico, em Meliponinae, embora não tenha designado este comportamento por este nome. Segundo esse autor, caso os ovos não se desenvolvam, ou as larvas morram, é mais fácil para as abelhas abrirem as respectivas células e removerem estas larvas jovens, ou ovos, do que crias mortas no final da fase larval ("pré-pupas"), quando os indivíduos já defecaram e já teceram o casulo. Além disso, também observou que, quando a cria está morta, pode ser retirada de sua célula e deixada sobre os favos, em vez de ser imediatamente removida da colméia, ou ainda as células são apenas abertas.

De acordo com BRUIJN et al. (1989), que estudaram o comportamento de *Melipona favosa* Fabricius, 1789, o depósito de lixo, comumente encontrado nas colônias de Meliponinae, é usado, entre outras coisas, para estocar abelhas mortas, antes que elas sejam jogadas para fora da colônia.

Em decorrência do pouco conhecimento que se tem sobre doenças, que ocorrem em crias de Meliponinae, torna-se importante compreender o comportamento higiênico nestas abelhas, uma vez que, para *A. mellifera*, este comportamento tem sido considerado, de maneira geral, um importante mecanismo de resistência às doenças de crias. Compreendendo este comportamento, nestas abelhas, de uma forma comparativa com as abelhas *A. mellifera*, podem-se estabelecer condições para futuros trabalhos de seleção de linhagens, com comportamento higiênico mais eficiente, as quais, comparativamente às abelhas africanizadas, poderiam ser mais resistentes às doenças de crias.

Este trabalho teve por objetivos: verificar a ocorrência do comportamento higiênico em duas espécies de Meliponinae (*M. quadrifasciata* e *T. angustula*); avaliar técnicas para matar crias (congelamento e perfuração);

---

<sup>1</sup> Prof. Dr. Warwick E. Kerr, Departamento de Genética, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Amazônia, s/n, Campus Umuarama, CEP 38401-136, Uberlândia-MG.

verificar diferenças no comportamento das abelhas, em relação às crias mortas com diferentes idades; e descrever, qualitativamente, o comportamento higiênico, fazendo-se um estudo comparativo entre as *A. mellifera* (africanizadas) e as abelhas indígenas estudadas.

## 2. AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA MATAR CRIAS

### 2.1. Introdução

Como metodologia, empregada nos estudos sobre comportamento higiênico, são utilizadas algumas técnicas para matar larvas e pupas de operárias. Inicialmente, utilizava-se a técnica de inoculação de organismos causadores de doenças nas colônias. Neste caso, os autores inoculavam esporos de *Bacillus larvae*, causador da cria-pútrida-americana, diretamente nas crias (PARK, 1936; PARK et al., 1937; ROTHENBUHLER e THOMPSON 1956; BARRICK e ROTHENBUHLER, 1961; THOMPSON, 1964; BARRICK, 1964, 1967 e TRUMP et al., 1967); ou inoculavam estes esporos suspensos em água, ou xarope, via alimentação (PARK, 1937; TARR, 1937; WOODROW, 1941, 1942; WOODROW e HOLST, 1942; STURTEVANT e REVELL, 1963; THOMPSON e ROTHENBUHLER 1957; LEWIS e ROTHENBUHLER, 1961; ROTHENBUHLER, 1954a, 1954b; RINDERER e ROTHENBUHLER 1963 e ROSE e BEXIS, 1963). Esta técnica é também utilizada em alguns experimentos, até os dias de hoje e com outros agentes etiológicos como, por exemplo, esporos do fungo *Ascosphaera apis*, causador da cria-giz (TABER, 1986 e SPANAK e GILLUM, 1993).

Nos trabalhos de JONES e ROTHENBUHLER (1964), e, posteriormente, nos de MOMOT e ROTHENBUHLER (1971), o comportamento higiênico foi estudado utilizando-se gás cloro para matar as crias. Segundo estes autores, esta

## 2. AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA MATAR CRIAS

### 2.1. Introdução

Como metodologia, empregada nos estudos sobre comportamento higiênico, são utilizadas algumas técnicas para matar larvas e pupas de operárias. Inicialmente, utilizava-se a técnica de inoculação de organismos causadores de doenças nas colônias. Neste caso, os autores inoculavam esporos de *Bacillus larvae*, causador da cria-pútrida-americana, diretamente, nas crias (PARK, 1936; PARK et al., 1937; ROTHENBUHLER e THOMPSON 1956; BAMRICK e ROTHENBUHLER, 1961; THOMPSON, 1964; BAMRICK, 1964, 1967 e TRUMP et al., 1967); ou inoculavam esses esporos suspensos em água, ou xarope, via alimentação (PARK, 1937; TARR, 1937; WOODROW, 1941, 1942; WOODROW e HOLST, 1942; STURTEVANT e REVELL, 1953; THOMPSON e ROTHENBUHLER 1957; LEWIS e ROTHENBUHLER, 1961; ROTHENBUHLER, 1964a, 1964b; RINDERER e ROTHENBUHLER 1969 e ROSE e BRIGGS, 1969). Esta técnica é também utilizada em alguns experimentos, até os dias de hoje e com outros agentes etiológicos como, por exemplo, esporos do fungo *Ascosphaera apis*, causador da cria-giz (TABER, 1986 e SPIVAK e GILLIAM, 1993).

Nos trabalhos de JONES e ROTHENBUHLER (1964), e, posteriormente, nos de MOMOT e ROTHENBUHLER (1971), o comportamento higiênico foi estudado, utilizando-se gás cianeto para matar as crias. Segundo estes autores, esta

técnica seria mais fácil e permitiria maior flexibilidade experimental do que a utilização de organismos causadores de doenças, uma vez que era possível analisar a eficiência de limpeza, nos dois lados do quadro, podendo também ser trabalhado em colônias sadias, permitindo serem avaliadas, indiretamente, quanto à resistência às doenças. Neste caso, o favo a ser utilizado era exposto ao gás cianeto, durante algumas horas. Após a aeração, o favo era devolvido à colônia para o acompanhamento do comportamento higiênico. Entretanto, este gás é considerado tóxico, sendo perigoso para o manuseio e a aplicação no campo, exigindo ainda cuidados especiais no laboratório (WINDHOLZ et al., 1976).

Uma outra técnica simples e, amplamente, utilizada para matar cria em experimentos, nos quais se pretende quantificar o comportamento higiênico, é o método de congelamento dos favos, o qual tem demonstrado que dá resultados semelhantes ao da inoculação de doenças. Este método foi apresentado por GONÇALVES e KERR (1970) e consiste em cortar pedaços de favos com 5 cm x 10 cm, contendo cria operculada, os quais devem ser levados ao congelador a -1°C, durante um período de 48 h. Em seguida, estes pedaços são reintroduzidos no favo, o qual deverá ser devolvido à colônia a ser testada. MESSAGE (1979) e MORETO (1993) modificaram este método, deixando o pedaço de favo congelado, numa estufa, para secar e para voltar à temperatura da colônia, antes de sua reintrodução na colméia. Esta técnica vem sendo utilizada por autores, tais como MILNE JR. (1982, 1983a, 1983b, 1985a, 1985b) e TABER (1982b, 1989).

Uma simplificação do bioensaio para a seleção de características do comportamento higiênico, a ser utilizado na apicultura industrial, foi feita por NEWTON e OSTASIEWSKI JR. (1986), com a técnica de perfuração, em que as crias foram perfuradas com um alfinete, introduzido no centro da célula operculada, o qual penetra no corpo da "pré-pupa", ou pupa, até alcançar o fundo da célula. Os autores sugerem que, quando for feito o teste da cria morta por perfuração, a colônia só deve ser considerada higiênica, se todos os corpos mortos forem removidos. Caso contrário, as células devem ser desoperculadas, após o terceiro dia, para serem examinadas. Às vezes, a cria não morre pela

perfuração com o alfinete e pode vir a ser um indivíduo normal. A utilização deste método simples e de fácil aplicação, tanto no laboratório quanto no campo, também foi efetuada por DANKA e VILLA (1994), BUCHLER (1994), GRAMACHO e GONÇALVES (1994a, 1994b) e GRAMACHO (1995).

Uma outra técnica foi proposta por TIRERA (1994), que utilizou microinjeções, contendo água, solução fisiológica, etanol, extrato de pupa macho em células operculadas, sendo esta última a que mais estimulou o comportamento higiênico.

Poucos trabalhos testaram qual técnica para matar cria seria a mais adequada para a avaliação do comportamento higiênico. NEWTON e OSTASIESWSKI JR. (1986) apresentaram a técnica de perfuração, com a qual obtiveram remoção total das crias mortas, após um a três dias, enquanto as crias mortas pela técnica de congelamento levaram de 7 a 14 dias para serem removidas. Em abelhas africanizadas, GRAMACHO (1995) também comparou as técnicas de congelamento e perfuração, demonstrando que não houve diferença na taxa de remoção entre as duas. Entretanto, do ponto de vista prático, considerou a técnica de perfuração mais eficaz por ser mais rápida, de fácil manuseio no campo ou no laboratório, e mais econômica.

Nesta parte, o trabalho teve por objetivos: confirmar a ocorrência do comportamento higiênico em duas espécies de Meliponinae: *M. quadrifasciata* e *T. angustula*; comparar duas técnicas para matar crias (congelamento e perfuração); e verificar diferenças no comportamento das abelhas, em relação às crias mortas com diferentes idades, comparando-se os resultados, obtidos com essas abelhas indígenas, com os obtidos com as *A. mellifera* (africanizadas).

## 2.2. Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados no Apiário da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (20°45'30" S, 42°52'05" W). As abelhas *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *T. angustula* foram coletadas na região, acondicionadas em caixas de observação e alimentadas com solução de água e açúcar (1:2).

A técnica de congelamento consistiu em retirar um pedaço do favo de cria, de cada espécie, os quais foram colocados no congelador à temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ . Estes favos foram colocados em estufa para secar e para voltar à temperatura da colônia, no início de cada experimento. A técnica de perfuração consistiu em perfurar o corpo da cria, com auxílio de um alfinete entomológico, introduzindo-o, através do opérculo.

Os controles constaram de pedaços de favo contendo crias de várias colônias, e o mesmo número de crias vivas e da mesma idade do favo experimental. Estes foram introduzidos nas colônias juntamente com os tratamentos. Na técnica de congelamento, as crias dos controles foram mantidas vivas numa estufa, cerca de  $33^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, antes do início de cada experimento. Para a técnica de perfuração, os opérculos dos controles foram perfurados, sem danificar as crias.

As duas técnicas foram avaliadas, com os tratamentos e seus respectivos controles, dispostos lado a lado, sendo que para as abelhas africanizadas, foram colocados no centro do quadro e, para as indígenas, foram colocados sobre o invólucro das crias. Foi utilizada uma colônia de cada espécie, sendo realizadas cinco repetições em cada uma.

Para cada espécie, utilizou-se o mesmo número de indivíduos mortos, 10 crias de cada uma das três idades: larva em período de alimentação, larva pós-defecante e pupa de olho-branco.

Os favos, cuja cria foi morta, e os favos utilizados como controle, foram obtidos em colméias diferentes daquelas, utilizadas para observação para não enfraquecer e, ou, perturbar as colônias estudadas.

Os dados foram coletados a cada 24 h, durante um período máximo de 10 dias, após o início dos experimentos. Foram registrados o número de células pontuadas (início de desoperculação), desoperculadas e limpas.

O delineamento foi em fatorial (técnica de matar cria x idade da cria), instalado em blocos, onde cada bloco (colônia) conteve todos os tratamentos. As parcelas foram as 10 células de cada tratamento. Para comparar a percentagem de remoção, entre as duas técnicas e entre as três idades das crias mortas, utilizou-se uma Análise de Variância Randomizada, segundo MANLY (1991).

Esta Análise foi utilizada, em decorrência de os dados não terem apresentado distribuição normal, bem como, pelo fato, de ter sido utilizada apenas uma colônia de cada espécie.

A hipótese nula ( $H_0$ ), neste experimento, foi que não haja diferença entre as porcentagens de remoção, utilizando as duas técnicas e as três idades de crias mortas, contra a hipótese alternativa, que haja diferença.

Para construir-se a distribuição do valor da soma dos quadrados na ANOVA Randomizada, os dados originais são reagrupados aleatoriamente, de forma que, os valores da variável resposta estejam, aleatoriamente, distribuídos entre os tratamentos. É calculada uma estatística (normalmente, o valor da soma dos quadrados), para cada reagrupamento (MANLY, 1991). Neste experimento, foram feitos 1.000 reagrupamentos.

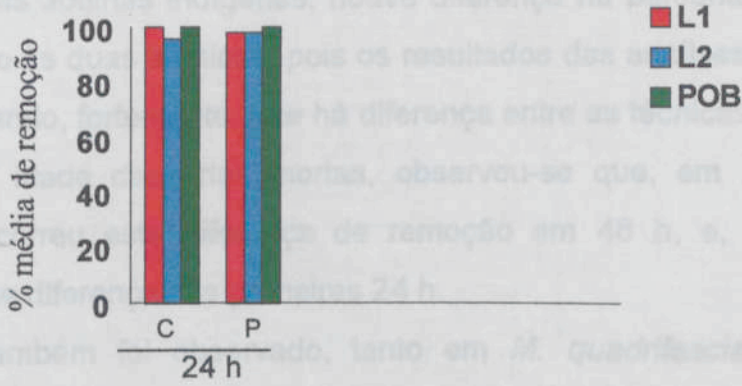
A proporção de vezes, em que valores da soma dos quadrados, obtidos pela Randomização, excederam o valor da soma dos quadrados observado, é utilizada como nível de significância atingido ("P-value"). Se os valores forem menores que 5 %, então,  $H_0$  será considerada falsa (MANLY, 1991).

Para as análises, foi usado programa em Fortran, gentilmente cedido pelo Dr. Bryan Manly. O código em Fortran encontra-se nas páginas de 84 a 90 de MANLY, (1991).

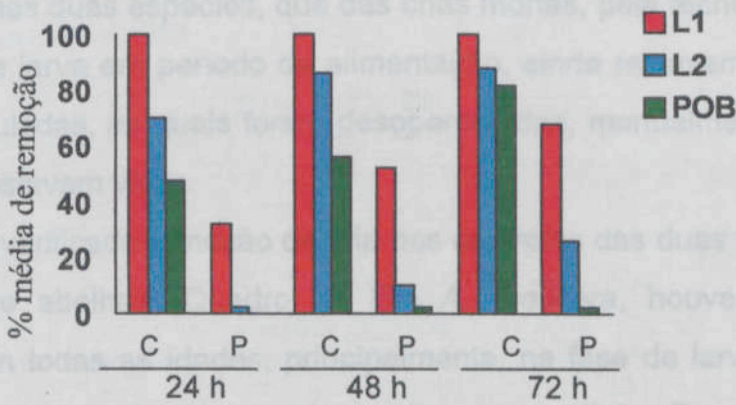
### 2.3. Resultados

Verificou-se que em *A. mellifera* houve, aproximadamente, 100% de remoção das crias mortas, pelas duas técnicas, e nas três idades, em até 24 h (Figura 1 I). Com relação às abelhas indígenas, tanto em *M. quadrifasciata* (Figura 1 II), quanto em *T. angustula* (Figura 1 III), independente da idade da cria morta, observou-se que a porcentagem de remoção das crias mortas foi maior, quando se utilizou a técnica de congelamento, em até 72 h de observação.

*Apis mellifera*



*Melipona quadrifasciata*



*Tetragonisca angustula*

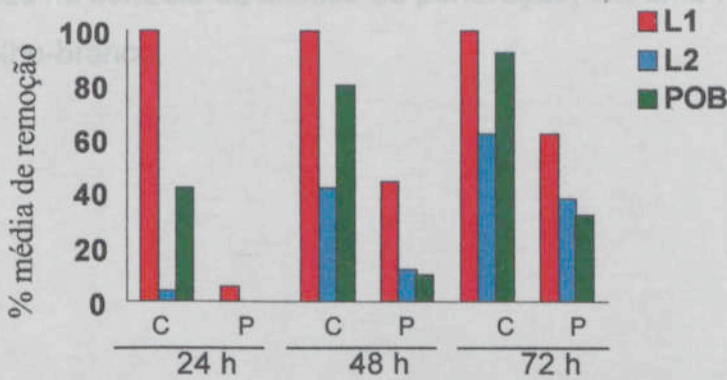


Figura 1- Percentagem média de remoção de crias mortas pela técnica de congelamento (C) e pela técnica de perfuração (P), em 24, 48 e 72 horas de observação, utilizando crias na fase de larva em período de alimentação (L1), larva pós-defecante (L2) e pupa de olho-branco (POB) em *Apis mellifera* (I), *Melipona quadrifasciata* (II) e *Tetragonisca angustula* (III).

Aplicando-se o método da Randomização (Quadro 1), comprovou-se que para as abelhas indígenas, houve diferença na percentagem de remoção, em relação às duas técnicas, pois os resultados das análises foram inferiores a 1%, indicando, fortemente, que há diferença entre as técnicas ( $H_0$  é falso). Com relação à idade das crias mortas, observou-se que, em *M. quadrifasciata*, apenas ocorreu esta diferença de remoção em 48 h, e, em *T. angustula*, verificou-se diferença nas primeiras 24 h.

Também foi observado, tanto em *M. quadrifasciata* quanto em *T. angustula*, que em nenhum momento houve 100% de remoção de cria morta pela técnica de perfuração, em 10 dias de observação. Numa das repetições, foi verificado, nas duas espécies, que das crias mortas, pela técnica de perfuração, na idade de larva em período de alimentação, ainda restavam duas células de crias operculadas, as quais foram desoperculadas, manualmente, e constatado que ainda estavam vivas.

Foi verificada remoção de cria nos controles das duas técnicas, nas três espécies de abelhas (Quadro 2). Em *A. mellifera*, houve uma acentuada remoção em todas as idades, principalmente, na fase de larva em período de alimentação, sendo, em média, cinco crias por repetição. Em *M. quadrifasciata*, ocorreu remoção de controle em duas repetições, e, em *T. angustula*, isto ocorreu apenas no controle da técnica de perfuração, em uma repetição, na fase de pupa de olho-branco.

Quadro 1 - Nível de significância da randomização (proporção da soma de quadrados da randomização que excedem a soma dos quadrados observados)

ESPÉCIES	FONTE DE VARIAÇÃO	24 h	48 h	72 h
<i>Apis mellifera</i>	TÉCNICA	1,000	-	-
	IDADE	0,535	-	-
	TÉCNICA X IDADE	0,749	-	-
<i>Melipona quadrifasciata</i>	TÉCNICA	0,001*	0,001*	0,001*
	IDADE	0,071	0,041*	0,063
	TÉCNICA X IDADE	0,860	0,749	0,435
<i>Tetragonisca angustula</i>	TÉCNICA	0,004*	0,001*	0,002*
	IDADE	0,012*	0,063	0,191
	TÉCNICA X IDADE	0,052	0,579	0,572

\* Significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 2 - Número médio e desvio-padrão da remoção de indivíduos nos controles da técnica de congelamento (C) e da técnica de perfuração (P) para as três idades de crias em *Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula* para as cinco repetições

	C			P		
	L1	L2	POB	L1	L2	POB
<i>Apis mellifera</i>	5,8 $\pm$ 5,33	0,6 $\pm$ 0,89	0,8 $\pm$ 1,78	8,2 $\pm$ 4,02	2,6 $\pm$ 4,33	0,4 $\pm$ 0,89
<i>Melipona quadrifasciata</i>	0,2 $\pm$ 0,44	0,0	0,2 $\pm$ 0,44	0,6 $\pm$ 0,89	0,0	0,2 $\pm$ 0,44
<i>Tetragonisca angustula</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4 $\pm$ 0,89

L1= larva em período de alimentação, L2= larva pós-defecante e POB= pupa de olho-branco.

## 2.4. Discussão

Em *A. mellifera*, o fato de ter sido observada a remoção de quase 100% das crias, mortas em ambas as técnicas em até 24 horas, confirma a alta capacidade de remoção de cria morta das abelhas africanizadas. Entretanto, estes resultados estão acima do que foi observado, por outros autores, para estas abelhas, tais como: COSENZA e SILVA (1972), em que a remoção de crias congeladas foi de, aproximadamente, 99% após 86 h; LENGLER (1977), em que a remoção de crias mortas por congelamento foi, em média, 41%, 72% e 86% em 24, 48 e 72 h; MESSAGE (1979), em que a remoção de crias congeladas foi de 42%, em 24 h, e 50%, em 38 h; SILVA (1994), em que a remoção de crias mortas por congelamento foi de 63%, 70% e 100% em 24, 48 e 72 h; GRAMACHO (1995), em que a remoção de crias foi, em média, de 57% para crias mortas, por congelamento, e 73% para crias mortas, por perfuração, após 48 h. Porém, deve-se levar em conta que nos experimentos, realizados pelos autores citados, foram utilizados núcleos, ou ninhos, com peças de favo, contendo cria morta, com o tamanho que variou entre 9 cm x 7,5 cm e 10 cm x 10 cm, portanto, com número de crias mortas bem maior do que foi aqui utilizado.

O fato de não ter havido diferença na percentagem de remoção, entre as duas técnicas, está de acordo com os resultados obtidos por GRAMACHO (1995). Do ponto de vista prático, pode-se considerar que a técnica de perfuração é mais rápida e de fácil manuseio.

Nas abelhas indígenas, verificou-se que a remoção de cria morta por congelamento foi mais rápida, o que indica maior eficiência na utilização desta técnica, para estudos sobre o comportamento higiênico nestas abelhas. No entanto, para uma extrapolação destes resultados, seriam necessários testes, utilizando-se maior número de colônias.

A marcante lentidão das abelhas indígenas para remoção de crias mortas, principalmente, de cria morta pela técnica de perfuração, pode ser inerente a estas abelhas. Nestas, a verificação de crias vivas no tratamento de perfuração, após 10 dias de observação, indica que, provavelmente, o alfinete não atingiu as crias, permitindo que continuassem seu desenvolvimento. Este fato também poderia indicar que a técnica de perfuração não seria adequada

para os estudos de comportamento higiênico, pelo menos, nesta fase de larva em período de alimentação. Em *A. mellifera*, NEWTON e OSTASIESWSKI JR. (1986) sugeriram que, quando forem realizados testes de comportamento higiênico, utilizando-se a técnica de perfuração, a colônia só deve ser considerada higiênica, se todos os corpos mortos forem removidos. Caso contrário, as células devem ser desoperculadas, após o terceiro dia, para serem examinadas, pois, às vezes, um indivíduo pode não ter sido morto pelo alfinete e poderá emergir normalmente.

No caso das abelhas africanizadas, a remoção de crias mortas na fase de larva, em período de alimentação, seria mais rápida, uma vez que as células destas crias não apresentam opérculo, entretanto, isso não foi detectado. Talvez, a quantidade de crias mortas, em cada idade, não tenha sido suficientemente grande para detectar-se diferença de remoção, entre elas, como foi observado por MESSAGE (1979), que verificou maior eficiência de remoção para crias mortas com idade de 10 e 20 dias, havendo um decréscimo nesta eficiência, nas crias mortas, com idade entre 12 e 18 dias. Todavia, a quantidade de crias mortas, utilizadas por este autor, foi superior à aqui utilizada.

Nas abelhas indígenas, aparentemente, crias mortas com idade de larva em período de alimentação seriam mais facilmente manipuladas, pelas operárias, uma vez que a parede de suas células é de consistência mais mole, em virtude da ausência de casulo. Entretanto, os resultados obtidos não mostraram claramente diferença de remoção, de acordo com a idade da cria morta, embora de acordo com NOGUEIRA-NETO (1970), as operárias teriam maior facilidade em remover as crias mortas, enquanto ovo e, ou, larva, do que quando os indivíduos já tenham defecado e tecido o casulo.

Quanto à remoção dos controles, certamente foi decorrente da manipulação desses pequenos pedaços de favo, que, no caso das abelhas africanizadas, tinham que ser cortados e colocados na mesma posição, em que se encontravam no favo de origem, na caixa de observação. Segundo NAULLEAU (1960), a aceitação de larvas e pupas numa colônia não pode ser considerada definitiva, antes de três, ou quatro dias. Neste período, as células das larvas e pupas podem ser desoperculadas e ingeridas por operárias jovens. Mesmo a

mais delicada manipulação causa sempre perturbação da cria. Em outros estudos, como os de NEWTON e MICHL (1974), em que células de "pré-pupas" e pupa foram desoperculadas, manualmente, também houve considerável remoção de crias vivas. Além disso, nos estudos feitos por GRAMACHO (1995), também ocorreu remoção de crias do controle. Estas remoções foram atribuídas a fatores, como a presença do ácaro *V. jacobsoni*, o canibalismo natural inerente das abelhas, em relação às crias e à manipulação do favo, durante a coleta dos dados. Especificamente, no caso do controle da técnica de perfuração, a remoção destas crias ocorreu, provavelmente, porque o alfinete não só perfurou os opérculos, mas também atingiu as crias, matando-as.

Sabe-se que, em *A. mellifera*, o comportamento higiênico, que é caracterizado pela capacidade de as operárias removerem as crias do favo, após a morte natural, ou induzida, confere a estas abelhas resistência às doenças. Esta resistência está relacionada com a rapidez, em que este comportamento ocorre. Entretanto, é importante ressaltar que, no caso das abelhas indígenas, estes resultados não indicam que, em condições naturais de mortalidade de cria, por exemplo, causada por um patógeno, o comportamento higiênico das operárias seria mais rápido, igual, ou mais lento do que foi observado, utilizando as duas técnicas. Apenas foi testada a adequabilidade da utilização das duas técnicas, nos estudos sobre o comportamento higiênico, nestas abelhas.

## 2.5. Resumo e conclusões

Neste trabalho, confirmou-se a ocorrência do comportamento higiênico em abelhas da subfamília Meliponinae: *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula*. Foram comparados os comportamentos destas abelhas e de abelhas africanizadas *Apis mellifera*.

Em cada espécie, foram, simultaneamente, testadas duas técnicas para matar cria: congelamento, em que pedaços de favo, contendo 10 indivíduos de cada idade (larva pré-defecante, larva pós-defecante e pupa de olho-branco), foram colocados no congelador, durante 24 h, e, posteriormente, foram transferidos para uma estufa para secagem e retorno à temperatura da colônia;

e perfuração, em que um alfinete entomológico foi introduzido, através do opérculo, perfurando o corpo dos indivíduos na mesma quantidade e com as mesmas idades da primeira técnica. Os dados foram coletados a cada 24 h, registrando-se o número de células pontuadas, desoperculadas e limpas. O experimento foi realizado, cinco vezes, em cada colméia, utilizando uma colônia de cada espécie. As análises estatísticas foram feitas com a Análise de Variância Randomizada.

Em *A. mellifera*, talvez a quantidade de cria morta, em cada idade, não tenha sido suficientemente grande para detectar-se diferença de remoção, entre elas. Em *M. quadrifasciata*, apenas foi detectada diferença, em 48 h, e em *T. angustula*, nas primeiras 24 h. *A. mellifera* não mostrou diferença na remoção, em relação às crias mortas pelas duas técnicas. Para as abelhas indígenas, foi verificada maior rapidez na detecção e na remoção das crias mortas pela técnica de congelamento, indicando que esta técnica seria a mais adequada para os nossos estudos sobre o comportamento higiênico, nestas abelhas.

Quanto aos Meliponídeos, verifica-se a escassez de trabalhos específicos sobre o comportamento higiênico. NOGUEIRA-NETO (1970) descreveu aspectos deste comportamento nestas abelhas, embora não as designasse com este nome. Observou que, quando a cria estava morta, podia ser retirada de sua célula e apodada sobre os favos, em vez de ser, imediatamente, removida da colônia, ou ainda, as células, cujas crias estavam mortas, eram apenas cobertas abertas. De acordo com SILVA *et al.* (1999), em *M. ferrugineus*, os depósitos de fezes são usados, entre outras coisas, para colocar abelhas mortas, antes de serem removidas para fora da colônia.

### 3. DESCRIÇÃO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO

Este trabalho, nesta parte, teve por objetivo descrever, qualitativamente, os padrões etológicos das operárias, em relação à cria morta em diferentes idades, comparando-se este comportamento entre as Meliponídeos *M. mellifera* e *M. angulatus*, com aquele observado em *A. mellifera* (afincamento).

#### 3.1. Introdução

De todos os comportamentos das abelhas *A. mellifera*, o de defesa e o higiênico são os mais estudados (GONÇALVES, 1994). O comportamento higiênico consiste na detecção, na desoperculação e na remoção de crias mortas das células, ou de qualquer material estranho à colônia (ROTHENBUHLER, 1964a, 1964b e MESSAGE, 1979).

Para o apicultor, este comportamento tem grande relevância, pois está, diretamente, relacionado com a resistência às doenças de cria, uma vez que quanto menos focos de infecção existirem na colônia, menor a probabilidade de abelhas sadias infectarem-se (GONÇALVES, 1994).

De acordo com MESSAGE (1979), as operárias utilizam-se de dois processos na execução do comportamento higiênico, dependendo da idade das crias, que são ingestão e remoção. SILVA (1994) observou que um alvéolo era limpo por mais de uma operária, sendo que ao conseguir arrancar um pedaço de pupa morta, a operária andava agitada pela colônia, como se dançasse. Além disso, observou que, em alguns casos, as operárias aglomeravam-se sobre as crias mortas e produziam um forte zumbido, que diminuía no decorrer do processo de limpeza.

Quanto aos Meliponinae, verifica-se a escassez de trabalhos específicos sobre o comportamento higiênico. NOGUEIRA-NETO (1970) descreveu aspectos deste comportamento nestas abelhas, embora não os designasse com este nome. Observou que, quando a cria estava morta, podia ser retirada de sua célula e abandonada sobre os favos, em vez de ser, imediatamente, removida da colméia, ou ainda, as células, cujas crias estavam mortas, eram apenas deixadas abertas. De acordo com BRUIJN et al. (1989), em *M. favosa*, os depósitos de lixo são usados, entre outras coisas, para estocar abelhas mortas, antes de serem removidas para fora da colônia.

Este trabalho, nesta parte, teve por objetivo descrever, qualitativamente, os padrões etológicos das operárias, em relação à cria morta em diferentes idades, comparando-se este comportamento entre os Meliponinae: *M. quadrifasciata* e *T. angustula*, com aquele observado em *A. mellifera* (africanizada).

### 3.2. Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados no Apiário da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil (20°45'30" S, 42°52'05" W). As abelhas *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *T. angustula* foram coletadas na região e acondicionadas em caixas de observação. Entre a colméia e a saída, foi adaptada uma caixa menor, com tampa de vidro, a qual facilitou a observação do transporte das crias mortas (Figura 2). No caso das abelhas africanizadas, dentro da caixa intermediária foi colocada uma tela excludora de rainha para impedir a enxameagem e, ou, o abandono da colméia. As abelhas de todas as espécies foram alimentadas com solução de água e açúcar (1:2).

#### 3.2.1. Operárias marcadas

Em cada experimento, operárias recém-emergidas de cada espécie foram marcadas, individualmente, e introduzidas, diariamente, nas caixas de observação. Para a obtenção destas operárias, favos com abelhas prestes a

emergir foram retirados de várias colônias e colocados em estufa, cerca de 30°C.

No caso de *M. quadrifasciata* e *A. mellifera*, as operárias foram marcadas com etiquetas de papel (Figura 2). Para isso, foi desenvolvida uma técnica de confecção de etiquetas, as quais foram impressas no verso de papel contínuo para etiquetas adesivas. Foi utilizado o programa Microsoft Word 6.0<sup>®</sup> for Windows, com fonte Arial tamanho 5, impresso em várias cores. Posteriormente, as etiquetas numeradas de 00 a 99 receberam uma camada de lápis-de-cor branco ou de outras cores, para promover impermeabilização, destaque e aumento de combinações, possibilitando a marcação de um maior número de operárias. As etiquetas foram cortadas, utilizando uma tesoura fina, ou estilete, deixando-as de forma quadrada, ou utilizando um vasador, deixando as etiquetas redondas. Estas foram coladas no mesonoto das operárias, com auxílio de uma pinça de ponta fina, empregando cola branca comum com a parte inferior das etiquetas, sempre voltadas para o abdome.

As operárias de *T. angustula* foram marcadas, utilizando um código de marcação com pintas coloridas, usando-se colas escolares e com etiquetas numeradas, obtidas por método fotográfico (FRESNEAU, 1994) (Figura 3).

Foi marcado um total de 2.700 operárias de *A. mellifera*, provenientes de 10 colônias; 1.581 operárias de *M. quadrifasciata*, provenientes de 12 colônias, sendo que metade destas caixas estava com sintomas de doenças; e 792 operárias de *T. angustula*, sendo 259 com etiquetas numeradas, 300 com o código, e 233 apenas com tinta automotiva, sem individualização. Nesta espécie, as operárias foram provenientes de quatro colônias.

### 3.2.2. Técnica para matar crias

A técnica de congelamento ("freezer-killing") foi utilizada para matar as crias de todas as abelhas, pois, em experimentos preliminares, foi verificado que, nestas espécies de Meliponinae, crias mortas por esta técnica foram mais rapidamente detectadas e removidas. Esta consistiu em se retirar um pedaço do favo de cria, de cada espécie, e colocá-lo no congelador a -15°C por, no mínimo, 48 h.

O controle da técnica de congelamento consistiu na retirada de um pedaço de favo, contendo o mesmo número de células e crias, na mesma idade do favo-teste, sendo as crias mantidas vivas numa estufa. Os favos-teste e seus respectivos controles foram dispostos, lado a lado, sendo que, para as africanizadas, foram colocados no centro do quadro. Para as indígenas, os favos-teste foram colocados sobre o invólucro da cria.

Foram utilizadas 10 crias para cada espécie de abelha, com as seguintes idades: larva em período de alimentação, larva pós-defecante, pupa de olho-branco e imago. Estas foram provenientes de diferentes colônias para não enfraquecer e, ou, perturbar as colônias observadas.

### 3.2.3. Procedimento dos experimentos

No primeiro experimento com *M. quadrifasciata*, os favos a serem testados foram retirados do congelador e colocados em estufa, com temperatura em torno de 30°C, para secar e voltar à temperatura ambiente e, logo depois, foram introduzidos na colônia. No segundo experimento, os favos-teste foram deixados na estufa, durante 24 h antes de sua introdução na colméia. Nos dois últimos experimentos, foram deixados na estufa, durante cinco dias antes da realização dos experimentos, para incrementar o processo de putrefação das crias.

Em *T. angustula*, em todas as repetições, os favos, após serem colocados no congelador, foram colocados em estufa com temperatura, em torno de 30°C durante cinco dias, exceto os favos de larva em período de alimentação, que só foram para a estufa 30 min antes do experimento, para não haver ressecamento e endurecimento do alimento larval. Com as africanizadas, os favos permaneceram, pelo menos, 24 h na estufa antes do início de cada experimento.

### 3.2.4. Observação do comportamento

Foi utilizada uma colônia de cada espécie, sendo feitas quatro repetições em cada uma. As atividades das operárias sobre os favos-teste foram

registradas, em fitas de vídeo, iniciando-se as filmagens, cerca de 30 min após a introdução dos tratamentos, utilizando-se uma filmadora modelo NV-M3000PN (Figura 4).



Figura 2 - Operárias marcadas de *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera*.

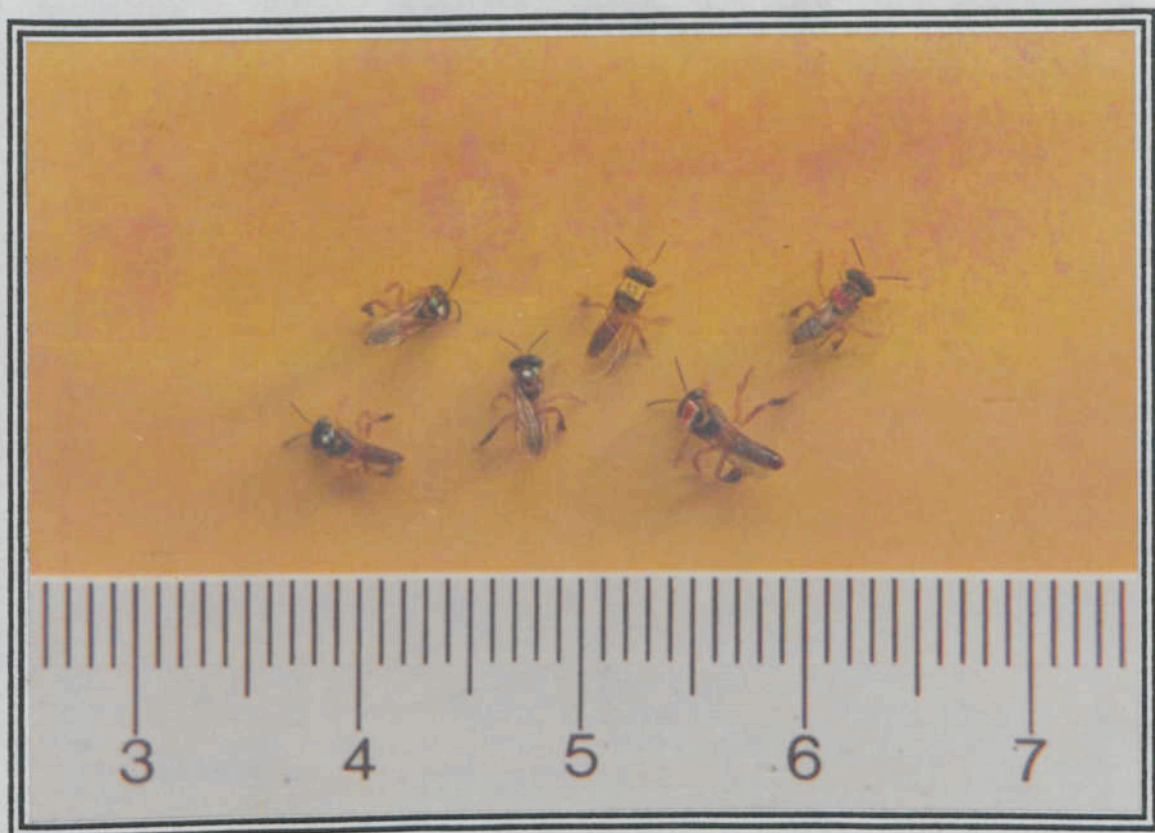


Figura 3 - Operárias marcadas de *Tetragonisca angustula*.

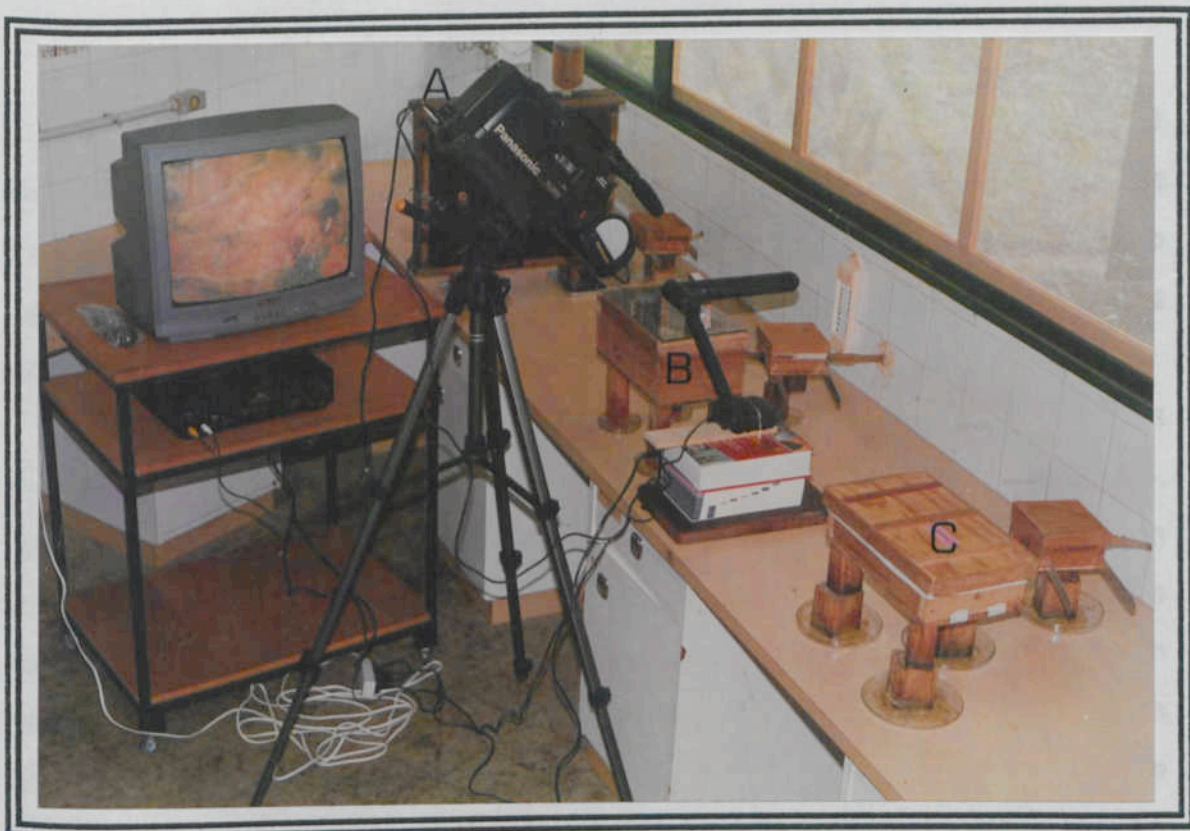


Figura 4 - Caixas de observação adaptadas com caixa menor para *Apis mellifera* (A), *Melipona quadrifasciata* (B) e *Tetragonisca angustula* (C) e equipamentos para filmagem.

### 3.3. Resultados

Nas três espécies de abelhas, observou-se que operárias, freqüentemente, esfregavam as pernas posteriores e faziam movimentos, contorcendo-se sobre os favos com crias mortas, antes, ou durante a desoperculação e a remoção das crias.

As operárias de todas as espécies, durante o comportamento higiênico, apresentaram dedicação exclusiva a este trabalho, isto é, não desempenharam outras atividades. Também foi observado que as operárias abandonavam, temporariamente, a cria morta semi-removida na própria célula, sendo que, especificamente, no caso das abelhas indígenas, as crias removidas eram deixadas sobre o favo, ou nas proximidades deste.

Um resumo das principais atividades, executadas pelas operárias de todas as espécies, encontra-se no Quadro 3.

#### 3.3.1. Abelhas africanizadas

Em *A. mellifera*, quando se iniciavam as observações, as operárias já haviam começado o comportamento higiênico. Em pouco tempo, os favos eram trabalhados simultaneamente. Das operárias, que estavam realizando o comportamento higiênico, apenas 40% estavam marcadas, apesar da presença de cerca de 80% das operárias marcadas introduzidas.

Ao lado de células, contendo indivíduos abandonados, havia outros indivíduos, da mesma idade, sendo ingeridos por cerca de quatro operárias. Enquanto ocorria o comportamento higiênico, as operárias continuavam inserindo a cabeça e o corpo em células já vazias. As operárias, que trabalhavam num determinado favo de cria morta, numa certa idade, podiam trabalhar em outros favos. Além disso, as operárias, nem bem desoperculavam uma célula, passavam para outra. Houve operária que só desoperculou, ou que só removeu, ou que desoperculou e removeu, que removeu e ingeriu e que só ingeriu. Também houve operária, que primeiro desoperculou todas as células de um determinado favo e, depois, ingeriu os indivíduos. A limpeza total dos favos com cria morta ocorreu depois de 9 a 10 h.

Quadro 3 - Resumo das principais atividades relacionadas com o comportamento higiênico das abelhas africanizadas e das abelhas indígenas

ATIVIDADES DAS OPERÁRIAS	AFRICANIZADAS	INDÍGENAS
Tempo para remoção	+ rápido (10 h)	+ lento: ↑ rapidez, ↑ putrefação das crias  <i>M. quadrifasciata</i> - 4 dias, 2 dias e 12 h  <i>T. angustula</i> - 12 horas
Comportamento higiênico envolvido	Pontuação, desoperaculação das células e remoção das crias	Pontuação, desoperaculação/destruição das células e remoção das crias
Modo de remoção	c/ canibalismo total (L1 e L2)  c/ canibalismo parcial (POB)  s/ canibalismo (I)	s/ canibalismo para todas as idades
Transporte das crias mortas	Diretamente para fora da colônia	Primeiro para lixeira, depois para fora da colônia
Faixa etária das operárias	De 5 a 31 dias	<i>M. quadrifasciata</i> - de 13 a 46 dias <i>T. angustula</i> - de 12 a 28 dias

L1 = larva em período de alimentação, L2 = larva pós-defecante, POB = pupa de olho-branco e I = imago.

### 3.3.2. Abelhas indígenas marcas nos favos-controlis, com pontos de cara

Em *M. quadrifasciata* e *T. angustula*, inicialmente, as operárias caminhavam sobre os favos e tocavam, com as antenas, os opérculos das células. Trabalhavam em duas posições das células, nos opérculos e nas laterais destas. Geralmente, antes de desopercularem, destruíam, parcialmente, as paredes das células e retiravam as crias pela lateral.

No caso dos favos de larva, em período de alimentação, inicialmente, as operárias faziam uma limpeza externa do favo, retirando o resto de alimento larval, pois, quando se cortava o pedaço de favo, contendo crias nesta idade, por mais que se limpasse, sempre sobrava alimento larval. Posteriormente, após a desoperculação, ou destruição parcial das células, as operárias sorviam o alimento larval, contido no interior destas, mesmo com a cria ainda na célula. Em *T. angustula*, as crias só foram removidas, depois que estavam totalmente expostas com suas células, praticamente, destruídas, restando apenas os fundos destas.

Nos favos de larva pós-defecante, pupa de olho-branco e imago, à medida que as células eram desoperculadas, eram destruídas, sendo que várias células eram trabalhadas, ao mesmo tempo, em fases diferentes do comportamento higiênico, isto é, algumas estavam no início e outras, numa fase mais adiantada.

Em *M. quadrifasciata*, cerca de 70% das operárias, que estavam executando o comportamento higiênico, eram as operárias marcadas. Em *T. angustula*, este número foi reduzido para cerca de 20%.

As operárias tenderam permanecer num mesmo favo. Entretanto, constantemente passavam de uma célula a outra, ou seja, não acabavam de desopercular uma célula e passavam para outra. Durante a execução do comportamento higiênico, foram observados buracos no invólucro, sob, ou, ao lado dos favos com crias mortas.

O primeiro experimento com *M. quadrifasciata* durou quatro dias. Neste caso, os favos de cada idade foram trabalhados, praticamente, um de cada vez, iniciando com larva em período da alimentação. Durante este período, as operárias executavam as mais diversas atividades sobre os favos, por exemplo,

uniram os favos com crias mortas aos favos-controle, com pontes de cera. Tentavam cobri-los com invólucro, desidratavam néctar sobre estes e até mesmo incubavam os favos, que continham crias mortas. A duração do segundo experimento, em que os favos-teste foram deixados durante 24 h na estufa, foi reduzida pela metade. E nos dois últimos experimentos, em que os favos-teste foram deixados, na estufa, durante cinco dias, houve uma redução drástica do tempo de remoção, não passando de 12 h, sendo os favos trabalhados simultaneamente. Em *T. angustula*, o tempo de duração dos experimentos também não ultrapassou 12 h.

### 3.3.3. Atividade das operárias com as crias mortas

Em *A. mellifera*, a atividade das operárias dependeu da idade da cria morta. Os indivíduos mortos na fase de larva em período de alimentação foram imediatamente ingeridos. Neste caso, as operárias introduziam a cabeça e o tórax, ficando com metade do abdome para fora, o qual fazia movimentos rítmicos.

As crias mortas, na fase de larva pós-defecante, também foram ingeridas. Neste caso, em células já pontuadas, as operárias introduziam a língua e sugavam a hemolinfa das crias, e quando a célula já estava desoperculada, as operárias não puxavam a cria. À medida que iam ingerindo-a, introduziam seu corpo na célula, até ficar na mesma posição, observada nas células das crias mortas na fase de larva, em período de alimentação. Não houve observação de operárias, carregando larva pós-defecante para fora da célula.

Os indivíduos mortos na fase de pupas de olho-branco podiam ser, parcialmente, removidos e ingeridos. As operárias puxavam a cabeça de cada indivíduo, perfuravam seu tegumento com as mandíbulas e introduziam a língua (Figura 5). Muitas vezes, arrancavam a cabeça da cria, que caía no fundo da colméia e lá também era ingerida, enquanto o resto do corpo continuava sendo ingerido, por cerca de uma a seis operárias. Posteriormente, o resto do corpo era retirado da célula.

No caso das grãos verdes na fase de imago, após a desoperculação, foram retiradas das células, sendo passadas pelas antenas, ou pelas pernas anteriores, para ser esfareladas. Aparentemente, as operárias fazem bastante força, a ponto de se romperem as células. Normalmente, uma só operária passa a cria da célula. Não houve observação de outras operárias para resgate, no caso de ingestão de cria.

Em *A. mellifera* (Figura 6) e *T. angustula* (Figura 7), foi observado que as operárias não ingeriam as crias mortas, qualquer que fosse sua idade. Entretanto, ingeriam as crias mortas na fase de larva, em período de alimentação, retirando o mel do alimento larval impregnado. Além disso, as operárias, aparentemente, manipulavam as crias cuidadosamente, não procurando rompimento de seu tegumento, e quando isto ocorria, várias operárias colocavam fragmentos de cera sobre a cria e só depois removiam-na.

A maioria operária, que pontuou e desoperculou, pôde remover, se possível (no caso das abelhas africanizadas), sem a pontuação e desoperculação e a ingestão de cria morta (no caso das abelhas indigenas) (Figura 8).



Figura 5 - Operárias de *Apis mellifera* ingerindo cria morta na fase de pupa de olho-branco.

No caso das crias mortas na fase de imago, após a desoperculação, foram retiradas das células, sendo puxadas pelas antenas, ou pelas pernas anteriores, porém, sem canibalismo. Aparentemente, as operárias faziam bastante força, contorcendo-se para puxá-las das células. Normalmente, uma só operária puxava a cria da célula. Não houve cooperação de outras operárias para remoção, só no caso de ingestão de cria.

Em *M. quadrifasciata* (Figura 6) e *T. angustula* (Figura 7), foi observado que as operárias não ingeriram as crias mortas, qualquer que fosse sua idade. Entretanto, lamberam as crias mortas na fase de larva, em período de alimentação, retirando o resto de alimento larval impregnado. Além disso, as operárias, aparentemente, manipulavam as crias cuidadosamente, não provocando rompimento de seu tegumento, e, quando isto ocorria, várias operárias colocavam fragmentos de cera sobre a cria e só depois removiam-na.

A mesma operária, que pontuou e desoperculou, pôde remover, ou ingerir (no caso das abelhas africanizadas), mas a pontuação, a desoperculação e a destruição de cada célula (no caso das abelhas indígenas) foram produtos do trabalho conjunto de várias operárias.

#### 3.3.4. Transporte das crias mortas para fora da colônia

Em *A. mellifera*, as crias removidas (pupa de olho-branco e imago), ou pedaços destas (pupa de olho-branco) sempre caíam no fundo da colônia. Posteriormente, estes foram carregados por outras operárias, que não participaram da desoperculação das células e da remoção dos indivíduos mortos. Estas operárias permaneciam andando agitadas, por toda a colônia, inclusive pelo vidro. Percorriam o tubo que levava à caixa intermediária, e de lá retornavam em direção à colônia, repetidamente. Na caixa intermediária, tinham dificuldade em atravessar a tela excludora de rainha, carregando cria morta.

Em *T. angustula*, as crias, removidas de todos os tratamentos, foram deixadas na lixeira, juntamente com pedaços de cera e fundos de células. Em *M. quadrifasciata*, não foi possível observar as lixeiras, em razão da grande quantidade de potes de alimentos.

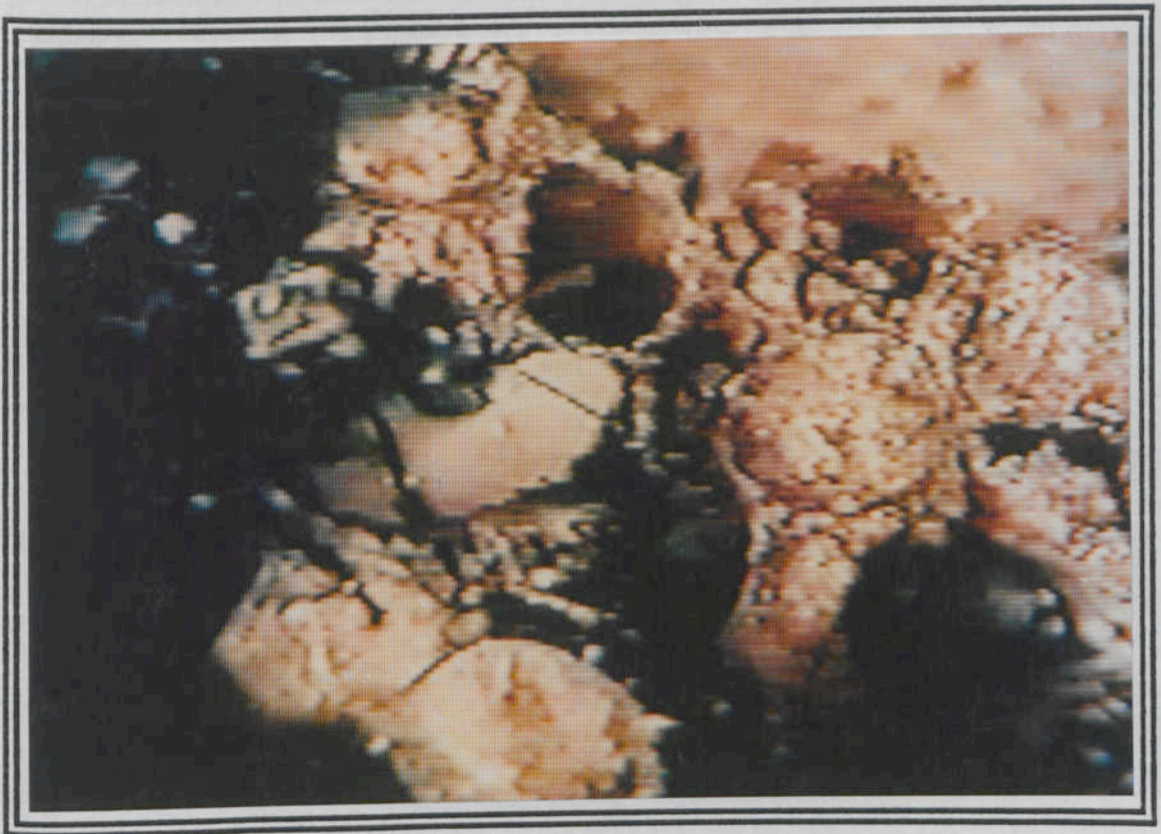


Figura 6 - Operária de *Melipona quadrifasciata* removendo cria morta na fase de larva pós-defecante.



Os indivíduos, removidos em *T. angustula*, eram transferidos de uma lixeira para outra por operárias, que, na maioria das vezes, não trabalhavam nos favos. As crias também podiam ser deixadas no fundo da colônia, entre a lixeira e o tubo de saída. Foram observadas crias mortas nas lixeiras, até cerca de 15 horas depois de terem sido deixadas nelas. Foram observadas, também, operárias que retiraram as crias da lixeira, passaram estas para outras operárias, que transportaram-nas para a caixa intermediária e de lá para o campo. As crias, bem como, pedaços de cera e fundos de células podiam ser deixados na caixa intermediária, até serem carregados para o campo.

Em *M. quadrifasciata*, não foi observada nenhuma cria, deixada na caixa intermediária, exceto na primeira repetição, em que as crias removidas, durante a noite, foram transportadas para fora da colônia na manhã seguinte.

Assim como as *A. mellifera*, as operárias das abelhas indígenas também apresentaram dificuldade em transportar a cria para fora da colônia. As operárias, repetidamente, percorriam o tubo que conduzia à caixa intermediária, e de lá retornavam em direção à colônia.

### 3.3.5. Faixa etária das operárias que executaram o comportamento higiênico

Foram observadas operárias de várias idades, executando o comportamento higiênico, sendo que as mais velhas realizaram efetivamente a remoção e o transporte da cria morta para o campo. Em *A. mellifera*, a idade das operárias, executando o comportamento higiênico, variou entre 5 e 31 dias, sendo a maioria, em torno de 20 dias; em *M. quadrifasciata*, entre 13 e 46 dias; e em *T. angustula*, entre 12 e 28 dias. Nas abelhas indígenas, mesmo as operárias não-marcadas, que foram observadas, exercendo o comportamento higiênico, apresentaram a pigmentação do corpo escura, o que demonstra não serem as operárias mais novas.

### 3.3.6. Remoção dos controles

As crias dos favos, correspondentes aos controles nas colônias das abelhas indígenas, permaneceram vivas, durante a realização de cada experimento. Posteriormente, completaram seu desenvolvimento normal.

Nas abelhas africanizadas, houve remoção de cria, principalmente, na fase de larva em período de alimentação, em média, seis indivíduos, removidos em cada repetição. As crias na fase de larva pós-defecante tiveram em média 0,5 indivíduo removido; as crias na fase de pupa de olho-branco, tiveram, em média, 0,6 indivíduo removido em cada repetição; e nenhuma cria, na fase de imago, foi removida em todas as repetições.

### 3.4. Discussão

Em todas as abelhas, a observação de que as operárias, freqüentemente, esfregavam as pernas, antes, e durante o comportamento higiênico, pode indicar uma forma de comunicação entre elas. De acordo com BLUM (1992), nas pernas das abelhas existem as glândulas tarsais, que liberam feromônio de trilha, empregado na orientação. Talvez este comportamento sirva de estímulo ao comportamento higiênico, isto é, poderia orientar, ou atrair outras operárias aos tratamentos, contendo crias mortas.

O fato de que as operárias tanto das abelhas africanizadas, quanto das indígenas, nem bem desoperculavam uma célula, passavam para outra, esse fato também foi observado para abelhas africanizadas por SILVA (1994).

Apesar de terem sido introduzidas muitas operárias marcadas em *A. mellifera*, o número de operárias, executando o comportamento higiênico, foi reduzido, indicando que talvez este comportamento seja realmente restrito a algumas operárias. Em *T. angustula*, talvez a quantidade introduzida de operárias tenha sido pequena.

Nas abelhas africanizadas, as operárias continuavam inserindo a cabeça e o corpo nas células vazias, provavelmente, para higienização completa destas células, visando à sua posterior utilização.

A verificação de operárias, que executaram todas as etapas e, ou, apenas algumas etapas do comportamento higiênico, pode indicar que algumas operárias apresentavam ambos os genes recessivos "u" ("uncapper") e "r" ("remover") em homozigose, e, em outros casos, mostravam um, ou outro gene em homozigose, conforme os clássicos trabalhos de ROTHENBUHLER (1964a, 1964b).

Diferentemente das africanizadas, as operárias das abelhas indígenas podem trabalhar pela lateral das células para remover a cria morta. A destruição dos favos foi iniciada, antes mesmo de a cria ser removida. Dessa forma, o comportamento higiênico das abelhas indígenas envolveria não só a desoperculação e a remoção das crias, mas também, paralelamente à desoperculação, a destruição das células, que é um comportamento inerente dessas abelhas. Nas *A. mellifera*, de acordo com SPIVAK e GILLIAM (1993), o comportamento higiênico pode ser uma adaptação para o reúso de células, pois, ao contrário dos Meliponinae, estas abelhas reutilizam as células, cujas crias emergem, em vez de construir novas células, que são energeticamente custosas.

Os buracos, observados no invólucro das duas espécies de abelhas indígenas, sob, ou, ao lado dos favos-teste, provavelmente, foram feitos para facilitar o escoamento da cria morta para as lixeiras da colônia.

Após a aceleração do processo de putrefação das crias das abelhas indígenas, com os favos-teste, deixados durante cinco dias na estufa, ocorreu uma redução drástica do tempo de remoção, ficando semelhante ao tempo, gasto pela abelhas africanizadas. Segundo GONÇALVES e KERR (1970), é necessário um determinado período de tempo, para que se inicie o comportamento higiênico, isto é, as operárias precisam reconhecer a cria morta para, posteriormente, iniciarem a desoperculação e a retirada da mesma. Além disso, de acordo com MESSAGE (1979), a pontuação e a desoperculação estão relacionadas com a produção de voláteis, provavelmente, resultantes da putrefação das crias mortas, cujo odor estimularia as abelhas a realizarem a atividade higiênica.

Em *M. quadrifasciata*, quando os tratamentos não foram deixados apodrecer, foi trabalhado, inicialmente, com o favo de larva, em período de alimentação, o que ocorreu, provavelmente, em função da detecção de odores provenientes do alimento larval, pois, de acordo com NOGUEIRA-NETO (1970), o alimento larval dos Meliponinae é instável e se altera pela falta de larvas que o consomem.

O canibalismo normalmente ocorre nos Hymenoptera sociais (WILSON, 1971). De acordo com NEWTON e MICHL (1974), o canibalismo é um método comum para controle populacional e para conservação de proteínas dos animais. Pode ocorrer também, quando há macho diplóide na colônia, no caso de *A. mellifera* (MICHENER, 1974).

Para formigas, NONACS (1991) sugeriu que as larvas servem para múltiplas funções, numa colônia. Uma delas pode ser, como estoque de nutrientes para serem canibalizadas, quando necessário. CLOUSE (1995) observou canibalismo intercolonial em vespas *Mischocyttarus mexicanus*.

Segundo WOYKE (1977), em *A. mellifera*, o canibalismo pode ocorrer tanto, em condições adversas, quanto em colônias normais, sendo provável que raças e até colônias tenham diferentes predisposições para ingerir a cria viva. Além disso, conforme foi aqui observado e também por outros autores, as operárias ingeriram as crias mortas (MESSAGE, 1979 e SPIVAK e GILLIAM, 1993).

Entretanto, nas abelhas indígenas, tanto em *M. quadrifasciata* quanto em *T. angustula*, não foi observada a ingestão da cria morta, qualquer que fosse sua idade. Pelo contrário, as operárias aparentemente manipulavam as crias, cuidadosamente, evitando o rompimento de seu tegumento, e, quando isto ocorria, várias operárias colocavam fragmentos de cera sobre a cria e só depois removiam-na. Não obstante, isto poderia ser uma vantagem, pois, no caso de mortalidade da cria, provocada por algum agente patogênico, ou tóxico, as operárias não se contaminariam e, dessa forma, não disseminariam a doença, o que, provavelmente, levaria à morte da colônia. Em *A. mellifera*, este fato levaria ao abandono da colônia. De acordo com DE JONG (1994), no processo de remoção, com o canibalismo das crias, mortas pelo *Bacillus larvae* (causador da cria-pútrida-americana), as operárias se contaminariam com os esporos. Estes

seriam transmitidos às operárias nutrizas, por meio de trofalaxia, que, por sua vez, passariam a infectar outras larvas. O comportamento higiênico confere resistência a essa doença, quando há detecção e remoção da cria, infectada antes da formação de esporos (SEELEY, 1985).

As operárias das abelhas africanizadas, que executaram o transporte da cria para fora da colônia, não foram as que participaram da desoperculação e da remoção, pois as crias, ao serem removidas, sempre caíam no fundo da colônia, sendo retiradas por outras operárias. Isto sugere a existência de um grupo específico de abelhas, encarregadas desta tarefa. Diferentemente, SILVA (1994) observou que as mesmas operárias, que removiam, transportavam a cria para fora da colônia.

O comportamento necrofórico (remoção de corpos) faz parte do repertório comportamental de higiene da colônia (VISSCHER, 1983). Segundo este autor, em *A. mellifera*, existe, claramente, um grupo de abelhas especializadas neste comportamento, cerca de 1% a 2% das abelhas de uma colônia e, dentre estas, algumas são mais ativas. Ele observou, ainda, que as operárias removem abelhas mortas mais rapidamente do que fragmentos em geral, por causa de mudanças químicas, que ocorrem nas abelhas, imediatamente, após a sua morte. Além disso, VISSCHER (1983) também sugeriu que as abelhas, que removem os corpos, nem sempre são as mesmas que os carregam para fora da colônia. Isto seria realizado por operárias, que já fizeram seu primeiro vôo de orientação, mas antes de serem campeiras.

Este comportamento necrofórico poderia ser executado por um grupo específico de abelhas e, neste caso, o comportamento higiênico, como um todo, no sentido de eliminar o foco da doença, abrangeria outras abelhas, além daquelas envolvidas, diretamente, na desoperculação e na remoção dos indivíduos mortos.

Nas abelhas africanizadas, a agitação das abelhas, que carregavam as crias, ou pedaços de crias, provavelmente, foi decorrente da luz, utilizada para observação. Esta agitação também foi observada por SILVA (1994).

Em *M. quadrifasciata*, apesar de não ter sido possível a observação de suas lixeiras, é muito provável que as crias mortas tenham sido ali depositadas,

temporariamente, como foi observado, em *T. angustula*, antes de serem transportadas para fora da colônia. Pois, de acordo com BRUIJN et al. (1989), as lixeiras de *M. favosa* servem, entre outras coisas, para estocar abelhas mortas, antes de serem jogadas para fora e para o estoque temporário de outros materiais de lixo, bem como sítios de defecação. Em *T. angustula*, o fato de terem sido observadas crias mortas nas lixeiras, até cerca de 15 h, poderia estar relacionado com as condições ambientais destes dias, que estavam com chuviscos.

Nas abelhas indígenas, a verificação de crias mortas, abandonadas sobre os tratamentos, ou nas proximidades destes, confere com as observações de NOGUEIRA-NETO (1970). Assim como em *A. mellifera*, este fato também sugere que outras operárias estariam, indiretamente, envolvidas no processo do comportamento higiênico.

Em todas as espécies, o entra-e-sai das operárias, transportando crias mortas, entre as colônias e as caixas intermediárias, e vice-versa, ocorreu certamente, em virtude dos obstáculos encontrados nas instalações das caixas de observação, adaptadas com as caixas intermediárias, que, no caso das africanizadas, ainda apresentava tela excludora de rainha.

Em todas as espécies, a faixa etária das operárias, que estavam envolvidas com o comportamento higiênico, foi ampla, demonstrando a flexibilidade comportamental destas abelhas. A importância disso é que, no caso de as crias estarem infectadas, várias operárias de diversas idades estariam engajadas na remoção destas crias, eliminando mais rapidamente o foco de doenças.

Além disso, conforme o polietismo etário, as operárias, nas faixas etárias observadas, executariam as mais diversas atividades, inclusive, a inatividade (MICHENER, 1974 e SAKAGAMI, 1982). De acordo com GARY (1992), há uma interação entre a idade das operárias, suas condições fisiológicas, situações de estímulo e seus genótipos, que coletivamente afetariam o comportamento das abelhas. Neste caso, o estímulo foi a cria morta.

### 3.5. Resumo e conclusões

Teve-se por objetivo descrever, qualitativamente, o comportamento higiênico em *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula*, comparando-se com aquele observado em *Apis mellifera* (africanizada).

Foi utilizada a técnica de congelamento para matar as crias, em quatro idades: larva em período de alimentação, larva pós-defecante, pupa de olho-branco e imago. Foram montadas caixas de observação específicas, para cada tipo de abelha, contendo operárias marcadas individualmente.

Nas africanizadas, o comportamento higiênico envolveu o canibalismo total de crias mortas, na fase de larva em período de alimentação e pós-defecante; canibalismo parcial dos indivíduos mortos, na fase de pupa de olho-branco; e remoção das crias mortas, na fase de imago. Nas abelhas indígenas, as operárias não ingeriram crias mortas, qualquer que fosse sua idade. Apenas houve remoção das crias, que foram depositadas na lixeira da colônia, sendo, posteriormente, transportadas para o campo. Nestas abelhas, o não-canibalismo evitaria que as operárias se contaminassem, caso as crias estivessem infectadas, contribuindo para o controle de doenças. Além disso, as operárias das abelhas indígenas deixavam as crias mortas, nas lixeiras, antes do transporte para fora da colônia.

A faixa etária das operárias observadas, executando o comportamento higiênico em todas as espécies, foi bem ampla, indicando que, no caso de as crias estarem infectadas, várias operárias de diversas idades estariam engajadas na remoção destas crias, eliminando mais rapidamente o foco de doenças.

Em *A. mellifera*, talvez a quantidade de crias mortas em cada idade não tenha sido suficientemente grande para detectar diferença de remoção, entre elas. Em *M. quadrifasciata*, apenas foi detectada diferença em 48 h e, em *T. angustula*, nas primeiras 24 h. *A. mellifera* não mostrou diferença na remoção, em relação às crias mortas pelas duas técnicas. Nas abelhas indígenas, foi verificada maior rapidez na detecção e na remoção das crias mortas pela técnica de congelamento, indicando que esta técnica seria a mais adequada para estudos sobre o comportamento higiênico nestas abelhas.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, confirmou-se a ocorrência do comportamento higiênico em duas espécies de Meliponinae (*M. quadrifasciata* e *T. angustula*); avaliou-se técnicas para matar crias (congelamento e perfuração); verificou-se diferenças no comportamento das abelhas, em relação às crias mortas com diferentes idades; e descreveu-se, qualitativamente, o comportamento higiênico, fazendo-se um estudo comparativo entre as *A. mellifera* (africanizadas) e as abelhas indígenas estudadas.

Em cada espécie, foram testadas duas técnicas para matar crias: congelamento, em que pedaços de favo, contendo 10 indivíduos de cada idade (larva em período de alimentação, larva pós-defecante e pupa de olho-branco), foram colocados no congelador durante 24 h, sendo posteriormente transferidos para uma estufa, para secagem, e retorno à temperatura da colônia; e perfuração, em que um alfinete entomológico foi introduzido, através do opérculo, perfurando o corpo dos indivíduos na mesma quantidade e com as mesmas idades da primeira técnica.

Os dados foram coletados a cada 24 h, registrando-se o número de células pontuadas, desoperculadas e limpas. O experimento foi realizado cinco vezes, em cada colméia, utilizando uma colônia de cada espécie. As análises estatísticas foram feitas, por meio da Análise de Variância Randomizada.

Em *A. mellifera*, talvez a quantidade de cria morta em cada idade não tenha sido suficientemente grande para detectar diferença de remoção, entre elas. Em *M. quadrifasciata*, apenas foi detectada diferença em 48 h e, em *T. angustula*, nas primeiras 24 h. *A. mellifera* não mostrou diferença na remoção, em relação às crias mortas pelas duas técnicas. Nas abelhas indígenas, foi verificada maior rapidez na detecção e na remoção das crias mortas pela técnica de congelamento, indicando que esta técnica seria a mais adequada para estudos sobre o comportamento higiênico nestas abelhas.

Para a descrição do comportamento higiênico, foi utilizada a técnica de congelamento para matar as crias em quatro idades: larva em período de alimentação, larva pós-defecante, pupa de olho-branco e imago. Foram montadas caixas de observação específicas para cada tipo de abelha, contendo operárias marcadas individualmente.

Nas africanizadas, o comportamento higiênico envolveu o canibalismo total de crias mortas, na fase de larva em período de alimentação e pós-defecante, canibalismo parcial dos indivíduos mortos, na fase de pupa de olho-branco, e remoção das crias mortas na fase de imago. Nas abelhas indígenas, as operárias não ingeriram crias mortas, qualquer que fosse sua idade. Apenas houve remoção das crias, que foram depositadas na lixeira da colônia, sendo posteriormente transportadas para o campo. Nestas abelhas, o não-canibalismo evitaria que as operárias se contaminassem, caso as crias estivessem infectadas, contribuindo para o controle de doenças.

As operárias das abelhas indígenas deixavam as crias mortas nas lixeiras, antes do transporte para fora da colônia. A faixa etária das operárias observadas, executando o comportamento higiênico em todas as espécies, foi bem ampla, demonstrando flexibilidade comportamental das operárias, pois, no caso de as crias estarem infectadas, operárias com várias idades estariam engajadas na remoção destas crias, eliminando mais rapidamente o foco de doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUCHLER, R. *Varroa Tolerans* in honey bees - occurrence, characters and breeding. *Bee World*, v.75, p.54-70, 1994.
- CLOUSE, R.M. Nest usurpation and inter-colonial cannibalism in *Microcyllarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). *J. Kans. Entomol. Soc.*, v.59, p.67-73, 1986.
- COSENZA, G.W., SILVA, T. Comparação entre a capacidade de limpeza de favos de abelha africana, de abelha caucasiana e de suas híbridas. *Ciênc. Cult.*, v.24, p.1153-1158, 1972.
- CRANE, E. *Bee and beekeeping - science, practice and world resources*. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1980, 514p.
- DANKA, R.G., VILLA, J.D. Preliminary observations on the susceptibility of africanized honey bees to american foulbrood. *J. Apic. Res.*, v.33, p.243-245, 1994.
- BAILEY, L. *Honey bee pathology*. London: Academic Press, 1981, 124p.
- BAMRICK, K.J.F. Resistance to american foulbrood in honey bees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. *J. Insect. Pathol.*, v.6, p.284-304, 1964.
- BAMRICK, K.J.F. Resistance to american foulbrood in honey bees. VI. Spore germination in larvae of different ages. *J. Invertebr. Pathol.*, v.9, p.30-34, 1967.
- BAMRICK, K.J.F., ROTHENBUHLER W.C. Resistance to american foulbrood in honey bees. VI. The relationships between larval ages at inoculation and mortality in a resistant and a susceptible line. *J. Insect. Pathol.*, v.3, p.381-390, 1961.
- BLUM, M. S., NOVAK, A.F., TABER III, S. 10-hydroxy-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science*, v.130, p.452-453, 1959.
- BLUM, M.S. Honey bee pheromones. In: GRAHAM, M.J. (Ed.) *The hive and the honey bee*. Hamilton: Dadant & Sons, 1992, p.374-394.
- BOECKING, O., RITTER, W. Grooming and removal behaviour of *Apis mellifera intermissa* in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. *J. Apic. Res.*, v.32, p.127-134, 1993.
- BRUIJN, L.L.M. De, SOMMEIJER, M. J., DIJKSTRA, E. Behaviour of workers on waste dumps in the nest of *Melipona favosa* (Apidae, Meliponini). *Insectes Soc.*, v.5, p.31-39, 1989.

- BUCHLER, R. *Varroa* Tolerance in honey bees - occurrence, characters and breeding. *Bee World*, v.75, p.54-70, 1994.
- CLOUSE, R.M. Nest usurpation and intercolonial cannibalism in *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). *J. Kans. Entomol. Soc.*, v.68, p.67-73, 1995.
- COSENZA, G.W., SILVA, T. Comparação entre a capacidade de limpeza de favos da abelha africana, da abelha caucasiana e de suas híbridas. *Ciênc. Cult.*, v.24, p.1153-1158, 1972.
- CRANE, E. *Bees and beekeeping - science, practice and world resources*. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1990, 614p.
- DANKA, R.G., VILLA, J.D. Preliminary observations on the susceptibility of africanized honey bees to american foulbrood. *J. Apic. Res.*, v.33, p.243-245, 1994.
- DE JONG, D. Cria pútrida americana, um problema em potencial para a apicultura brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 10, 1994, Rio Quente, GO. *Anais...* Rio Quente, GO: Associação dos Apicultores do Estado de Goiás, 1994, p. 152-157.
- FRESNEAU, D. *Biologie et comportement social d'une fourmi ponerine neotopical (Pachycondyla apicalis)*. Paris. 331p. (These Docteur D'eat es-Sciences) - Université Paris XIII, 1994.
- GARY, N.E. Activities and behavior of honey bees. In: GRAHAM, J.M. (Ed.). *The hive and the honey bee*. Hamilton: Dadant & Sons, 1992, p.269-372.
- GILLIAM, M., TABER III, S., RICHARDSON, G. V. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie*, v.14, p.29-39, 1983.
- GONÇALVES, L.S. Comments on the aggressiveness of the africanized bees in Brazil. *Am. Bee J.*, v.114, p.449-450, 1974.
- GONÇALVES, L.S. Biología, genética y selección de abejas *Apis mellifera*. Generalidades y principios fundamentales. In: CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4: FORO EXPO-COMERCIAL INTERNACIONAL DE APICULTURA, 1, 1994, Córdoba. *Anales...* Córdoba: Ministério de Agricultura Ganadería y Recursos Renovables, Fundacion BPC, SRRC, 1994, p.1-10.
- GONÇALVES, L.S., KERR, W.E. Genética, seleção e melhoramento.1. Noções sobre genética e melhoramento em abelhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1, 1970, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: Secretaria de Agricultura do Estado de Santa Catarina, 1970, p. 10-36.

- GRAMACHO, K.P. Estudo do comportamento higiênico em *Apis mellifera*, como subsídio a programas de seleção e melhoramento genético em abelhas. Ribeirão Preto. 103p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1995.
- GRAMACHO, K.P., GONÇALVES L.S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 10, 1994, Rio Quente, GO. Anais... Rio Quente, GO: Associação dos Apicultores do Estado de Goiás, 1994a, p.342.
- GRAMACHO, K.P., GONÇALVES L.S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4: FORO EXPO-COMERCIAL INTERNACIONAL DE APICULTURA, 1, 1994, Córdoba. Anales... Córdoba: Ministério de Agricultura Ganadería y Recursos Renovables, Fundación BPC, SRRC, 1994b, p.45.
- JONES, R. L., ROTHENBUHLER, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. II. Responses of two inbred lines to various amounts of cyanide-killed brood. *Anim. Behav.*, v.12, p.584-588, 1964.
- KERR, W.E. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *An. Esc. Super. Agric. "Luiz de Queiróz"*, v. 3, p.299-313, 1948.
- KERR, W.E., NASCIMENTO, V.A., CARVALHO, G.A. Há salvação para os meliponíneos? In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS DE RIBEIRÃO PRETO, 1, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: Legis Summa, 1994, p.60-65.
- LENGLER, S. Comparação da abelha italiana com a abelha africanizada quanto a resistência à doença da cria. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 4, Curitiba, PR, 1976. Anais... Curitiba: INCRA, FAEP, 1977, p.199-203.
- LEWIS, L.F., ROTHENBUHLER, W.C. Resistance to american foulbrood in honey bees: III. Differential survival of the two kinds of larvae from two-drone matings. *J. Insect. Pathol.*, v.3, p.197-215, 1961.
- MANLY, B.F.J. *Randomization and Monte Carlo methods in Biology*. London: Chapman and Hall, 1991, 281p.
- MESSAGE, D. Doenças de cria em abelhas *Apis mellifera* no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 10, 1994, Rio Quente, GO. Anais... Rio Quente, GO: Associação dos Apicultores do Estado de Goiás, 1994, p.158-162.

- MESSAGE, D. Efeito de condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas *Apis mellifera*. Ribeirão Preto. 136p. (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1979.
- MICHENER, C.D. The social behavior of bees - a comparative study. Cambridge: Harvard University Press, 1974, 404 p.
- MILNE JR., C.P. Laboratory measurement of brood disease resistance in the honey bee. 1. Uncapping and removal of freeze-killed brood by newly emerged workers in laboratory test cages. *J. Apic. Res.*, v.21, p.111-114, 1982.
- MILNE JR., C.P. Honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behavior and resistance to chalkbrood. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v.76, p.384-387, 1983a.
- MILNE JR., C.P. Laboratory measurement of honey bee brood disease resistance. 2. Uncapping of freeze-killed and live brood by newly emerged workers in cages. *J. Apic. Res.*, v.22, p.115-118, 1983b.
- MILNE JR., C.P. Estimates of the heritabilities of and genetic correlation between two components of honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behavior: uncapping and removing. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v.78, p.841-844, 1985a.
- MILNE JR., C.P. Laboratory tests of honey bee hygienic behavior and resistance to european foulbrood. *Am. Bee J.*, v.125, p.578-580, 1985b.
- MOMOT, J.P., ROTHENBUHLER, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *J. Apic. Res.*, v.10, p.11-21, 1971.
- MORETO, G. Estudo de algumas variáveis relacionadas a um mecanismo de defesa de operárias de *Apis mellifera* à varroatose e à taxa de reprodução do ácaro *Varroa jacobsoni*. Ribeirão Preto. 116p. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1993.
- MORITZ, R.F.A. A reevaluation of the two-locus model for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Hered.*, v.79, p.257-262, 1988.
- MORSE, R.A., NOWOGRODZKI, R. (Ed.). Honey bee pests, predators and diseases. 2 ed. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1990, 474p.
- NAULLEAU, G. Sur les consequences de diverses perturbations apportées au couvain dans la ruche: la désoperculation - les transpositions. *Insectes Soc.*, v.7, p.333-343, 1960.

- NEWTON, D.C., CANTWELL, G.C., BOURQUIN, E.P. Removal of freeze-killed brood as an index of nest cleaning behavior in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). *Am. Bee J.*, v.115, p.388, 402, 406, 1975.
- NEWTON, D.C., MICHL, D.J. Cannibalism as an indication of pollen insufficiency in honeybees: ingestion or recapping of manually exposed pupae. *J. Apic. Res.*, v.13, p.235-241, 1974.
- NEWTON, D.C., OSTASIEWSKI JR., N.J. A simplified bioassay for behavioral resistance to american foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Am. Bee J.*, v.126, p. 278-281, 1986.
- NOGUEIRA-NETO, P. A criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Chácaras e Quintais, 1970, 365p.
- NONACS, P. Less growth with more food: how insect-prey availability changes colony demographics in the ant, *Camponotus floridanus*. *J. Insect. Physiol.*, v.37, p.981-898, 1991.
- PARK, O.W. Disease resistance and american foulbrood. *Am. Bee J.*, v. 76, p.12-15, 1936.
- PARK, O.W. Testing for resistance to american foulbrood in honeybees. *J. Econ. Entomol.*, v.30, p.504-512, 1937.
- PARK, O.W., PELLET, F.C., PADDOCK, F.B. Disease resistance and american foulbrood. *Am. Bee J.*, v. 77, p. 20-25, 1937.
- RINDERER, T.E., ROTHENBUHLER, W.C. Resistance to american foulbrood in honey bees. X. Comparative mortality of queen, worker, and drone larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, v.13, p.81-86, 1969.
- ROSE, R.I., BRIGGS, J.D. Resistance to american foulbrood in honey bees. IX. Effects of honey-bee larval food on the growth and viability of *Bacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.*, v.13, p.74-80, 1969.
- ROSENKRANZ, P., TEWARSON, N.C., SINGH, A. et al. Differential hygienic behaviour towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to mites. *J. Apic. Res.*, v.32, p. 89-93, 1993.
- ROTHENBUHLER, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Anim. Behav.*, v.12, p.578-583, 1964a.
- ROTHENBUHLER, W.C. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. responses of F<sub>1</sub> and backcross generations to disease-killed brood. *Am. Zoologist.*, v.4, p.111-123, 1964b.

- ROTHENBUHLER, W.C., THOMPSON, V.C. Resistance to american foulbrood in honey bees. I. Diferencial survival of larvae of diferent genetic lines. *J. Econ. Entomol.*, v.49, p.470-475, 1956.
- ROUBIK, D.W. *Ecology and natural history of tropical bess*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989, 514p.
- SAKAGAMI, S.F. Stingless bee. In: HERMANN, H.R. (Ed.). *Social insects*. New York: Academic Press, 1982, p. 361-423.
- SAKAGAMI, S.F., ZUCCHI, R. Estudo comparativo do comportamento de várias espécies de abelhas sem ferrão, com especial referência ao processo de provisionamento e postura de células. *Ciênc. Cult.*, v.18, p.283-296, 1966.
- SILVA, M.L.B. *Estudos de fatores genéticos e ambientais na resistência ao ácaro Varroa jacobsoni, pelas abelhas (Apis mellifera) africanizadas*. Jabotocabal. 76p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 1994.
- SEELEY, T.D. *Honeybee ecology*. Princeton: Princeton University Press, 1985, 221p.
- SPIVAK, M., GILLIAM, M. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resritance. *J. Apic. Res.*, v. 32, p.147-157, 1993.
- SPIVAK, M., REUTER, G.A., MELTON, R. et al. Honey bee hygienic behaviour and tolerance to *Varroa jacobsoni*. *Am. Bee J.*, v.134, p.836-837, 1994.
- STURTEVANT, A.P., REVELL, I.L. Reduction of *Bacillus larvae* spores in liquid food of honey bees by action of the honey stopper and its relation to development of american foulbrood. *J. Econ. Entomol.*, v.46, p.855-860, 1953.
- SUTTER, G.R., ROTHENBUHLER, W.C., RAUN, E.S. Resistance to american foulbrood in honey bees VII. Growth of resistance and susceptible larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, v.12, p.25-28, 1968.
- TABER, S. Breeding for disease resistance. *Am. Bee J.*, v.122, p.177-179, 1982a.
- TABER, S. Determinig resistance to brood diseases. *Am. Bee J.*, v.122, p.422-425, 1982b.
- TABER, S. Breeding bees resistance to chalkbrood disease. *Am. Bee J.*, v.126, p.823-825, 1986.
- TABER, S. Backyard breeding. *Glean. Bee Cult.*, v.69, p.117, 330-331, 1989.

- TARR, H.L.A. Studies on american foulbrood of bees. I. The relative pathogenity of vegetative cells and endospores of *Bacillus larvae* for the brood of the bees. *Ann. Appl. Biol.*, v.24, p. 377-384, 1937.
- THOMPSON, V.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. III. Effect of the age bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. *J. Apic. Res.*, v. 3, p.25-30, 1964.
- THOMPSON, V.C., ROTHENBUHLER, W.C. Resistance to american foulbrood in honey bees. II. Diferencial protection of larvae by adults of different genetic lines. *J. Econ. Entomol.*, v.50, p.731-737, 1957.
- TIRERA, J.K. Effect of the microinjections into the brood cells on the opening and cleaning behaviour of honeybees. *Apidologie*, v.2, p.503-504, 1994.
- TRUMP, R.F., THOMPSON, V.C., ROTHENBUHLER, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees V. Effect of previous experience and composition of mixed colonies on resonse to disease-killed brood. *J. Apic. Res.*, v.6, p.127-131, 1967.
- VELTHUIS, H.H.W., SOMMEIJER, M.J. Roles of morphogenetic hormones in caste polymorphism in stingless bees. In: GUPTA, A.P. (Ed.). *Morphogenetic hormones of arthropods*. New Brunswick: Rutgers University Press, 1991, p.346-383.
- VISSCHER, P.K. The honey bee way of death: necrophoric behaviour in *Apis mellifera* colonies. *Anm. Behav.* v.31, p.1070-1076, 1983.
- WILSON, E.O. *The insect societies*. Cambridge: Harvard Universyt Press, 1971, 548p.
- WINDHOLZ, M., BUDAVARI, S., STROUMTSOS, L.Y. (Ed.). *The merck index: an encyclopaedia of chemicals and drugs*. 9 ed. Rahway: Merck, 1v, 1976.
- WOYKE, J. Cannibalism and brood-rearing efficiency in the honeybee. *J. Apic. Res.*, v.16, p.84-94, 1977.
- WOODROW, A.W. Susceptibility of honey bee larvae to american foulbrood. *Glean. Bee Cult.*, v.69, p.148-151, 1941.
- WOODROW, A.W. Susceptibility of honey bee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *J. Econ. Entomol.*, v.35, p.892-895, 1942.
- WOODROW, A.W., HOLST, E.C. The mechanism of colony resistance to american foulbrood. *J. Econ. Entomol.*, v.35, p.327-330, 1942.