**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Polietismo e detecção de vírus deformador das asas em abelha
Apis mellifera scutellata (Africanizada) e *Apis mellifera ligustica*
(Europeia)**

Maria Emilene Correia de Oliveira

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2013**

Maria Emilene Correia de Oliveira
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

Polietismo e detecção de vírus deformador das asas em abelha *Apis mellifera scutellata* (Africanizada) e *Apis mellifera ligustica* (Europeia)

Orientador:
Prof. Dr. **LUÍS CARLOS MARCHINI**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Oliveira, Maria Emilene Correia de
Polietismo e detecção de vírus deformador das asas em abelha *Apis mellifera scutellata* (Africanizada) e *Apis mellifera ligustica* (Europeia) / Maria Emilene Correia de Oliveira. - Piracicaba, 2013.
178 p: il.

Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Colônia de abelhas 2. Glândulas 3. Polietismo 4. Vírus DWV I. Título

CDD 638.12
O48p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que passaram e ou estão presentes em minha vida, tocando-me com suas essências e possibilitando o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força nos momentos de fraqueza, pelo conforto nos momentos de desânimo e por me possibilitar iniciar e concluir essa fase da minha vida;

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia, pelo apoio estrutural na execução do trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Carlos Marchini, por todos os ensinamentos, transmissão de conhecimento e orientação no doutorado;

Ao PhD. Steven John Martin, pesquisador chefe do “Apiculture and Social Insects Laboratory”, no Department of Animal and Plant Sciences, University of Sheffield (Sheffield – UK), pelo maravilhoso acolhimento, convívio e toda estrutura disponibilizada para a realização do trabalho desenvolvido no doutorado sanduíche;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante o doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do doutorado sanduíche;

À Prof. Dr. Ricardo Olinda, pelo suporte com as análises estatísticas;

Ao meu filho, Glauber, à minha mãe, Maria José, às minhas irmãs, Elizabete, Elizângela, Edna e Ednévea, à minha sobrinha Elisa e aos meus sobrinhos Vinícius, Guilherme, Luan e Otávio, e ao meu pai, Luiz José, meu agradecimento especial pelo apoio e incentivo;

À minha família paulista, tia Elineuza, José Otávio, Noêmia, Nanci, Rafaela e Carlos Negrão, pelo acolhimento e incentivo constante;

Aos integrantes da minha colônia, sem os quais eu não conseguiria concluir a tese, Cherre Sade, Augusto Diniz, Valdson José, Luzimário Pereira, Eliane Grisoto,

Isabela Nascimento, Rodrigo, Rogena Amaral, Júlio Poderoso, Francisco Aldiney Costa Franco e Roque Pinho;

Ao Prof. Dr. Fernando Luís Cônsoli, pelos ensinamentos na disciplina Fisiologia de Insetos, fundamental para a realização dessa tese e por toda a ajuda prestada;

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP), pela oportunidade de cursar suas disciplinas, possibilitando-me a aquisição de uma experiência única e pelo apoio na realização da tese;

Aos colegas do Laboratório de Insetos Úteis Lorena Nunes, Talita Silveira, Diogo Araújo, Andréia Santos e Natasha Iwanicki, pelo convívio e momentos de aprendizado e alegrias;

À Regina Célia Botequio de Moraes e Andréa Varella Sintoni, por toda ajuda e prestatividade;

Ao técnico Vitor Silva, pelo apoio na execução da parte de campo do experimento; e

Aos colegas e funcionários do departamento de Entomologia e Acarologia

EPÍGRAFE

...Não importa, é assim a viagem, cheia de atropelos,
sonhos, fantasias, esperas, despedidas... porém, jamais,
retornos.

Façamos essa viagem, então, da melhor maneira possível,
tentando nos relacionar bem com todos os passageiros,
procurando, em cada um deles, o que tiverem de melhor,
lembrando, sempre, que, em algum momento do trajeto,
eles poderão fraquejar e, provavelmente, precisaremos
entender porque nós também fraquejaremos muitas vezes
e, com certeza, haverá alguém que nos entenderá.

O grande mistério, afinal, é que jamais saberemos em qual
parada desceremos, muito menos nossos companheiros,
nem mesmo aquele que está sentado ao nosso lado.

Eu fico pensando se quando descer desse trem sentirei
saudades ... acredito que sim. Me separar de alguns
amigos que fiz nele será, no mínimo dolorido. Deixar
meus filhos continuarem a viagem sozinhos, com certeza
será muito triste, mas me agarro na esperança que, em
algum momento, estarei na estação principal e terei a
grande emoção de vê-los chegar com uma bagagem que
não tinham quando embarcaram... e o que vai me deixar
feliz, será pensar que eu colaborei para que ela tenha
crescido e se tornado valiosa.

Amigos, façamos com que a nossa estada, nesse trem, seja
tranquila, que tenha valido a pena e que, quando chegar a
hora de desembarcarmos, o nosso lugar vazio traga
saudades e boas recordações para aqueles que
prosseguirem a viagem.

(Silvana Duboc)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivo geral	17
1.2 Objetivos específicos	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Apis mellifera</i>	19
2.2 <i>Apis mellifera scutellata</i> (Africanizada)	21
2.3 Polietismo	22
2.4 Glândulas da cabeça e tórax	26
2.4.1 Glândulas salivares	27
2.4.2 Glândula Mandibular	29
2.4.3 Glândula hipofaríngea	30
2.5 Cérebro	31
2.6 Proteínas	33
2.7 Quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976)	34
2.8 O vírus deformador de asas de abelhas (DWV)	34
2.9 PCR em tempo real	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Local do experimento e manutenção dos enxames	39
3.2 Obtenção das abelhas Africanizadas e Europeias para a montagem dos bioensaios	44
3.3 Extração do cérebro e glândulas de <i>Apis mellifera</i> (Africanizada e Europeia)	47
3.4 Avaliação do desenvolvimento cerebral e glandular por meio do teste de proteínas totais em abelha Africana e Europeia	50
3.5 Avaliação do polietismo em <i>Apis mellifera</i>	51
3.5.1 <i>Apis mellifera scutellata</i> (Africanizada)	51
3.5.2 <i>Apis mellifera ligustica</i> (Europeia)	54
3.6 Avaliação de enxame zanganeiro em <i>Apis mellifera</i> Africanizada	57
3.7 Avaliação do desenvolvimento das glândulas hipofaríngea e saliva cefálica em <i>Apis mellifera</i> Africanizada e Europeia	59
3.8 Teste de presença de vírus DWV em abelhas Africanizada e Europeia	61

3.9 Estudo da morfologia das glândulas e cérebro de abelhas com os sintomas do DWV	63
3.10 Análise estatística	63
4 RESULTADOS	65
4.1 Avaliação do desenvolvimento cerebral e glandular em abelhas <i>Apis mellifera</i> .	65
4.1.1 <i>Apis mellifera scutellata</i> (Africanizada)	65
4.1.1.1 Desenvolvimento das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea ao longo da fase adulta das abelhas Africanizadas.....	73
4.1.2 <i>Apis mellifera ligustica</i> (Europeia).....	76
4.1.2.1 Desenvolvimento das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea ao longo da fase adulta das abelhas Europeias.....	84
4.1.3 Africanizada x Europeia	87
4.2 Polietismo em abelhas <i>Apis mellifera</i> com a mesma idade	93
4.2.1 Africanizadas	93
4.2.2 Europeias.....	104
4.2.3 Africanizada x Europeia	118
4.3 Controle de enxame zanganeiro em <i>Apis mellifera</i> (Africanizada)	120
4.4 Detecção do Vírus deformador de asas em <i>Apis mellifera</i> utilizando a técnica de PCR em tempo real	125
4.4.1 <i>Apis mellifera scutellata</i> (Africanizada)	125
4.4.2 <i>Apis mellifera ligustica</i> (Europeia).....	128
4.5 Morfologia das glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro de abelhas Europeias sintomáticas para o vírus deformador de asas (DWV).	131
5 CONCLUSÕES.....	137
REFERÊNCIAS	139
APÊNDICES	155

RESUMO

Polietismo e detecção de vírus deformador das asas em abelha *Apis mellifera scutellata* (Africanizada) e *Apis mellifera ligustica* (Europeia)

O desempenho das atividades na colônia de abelhas *Apis mellifera* está relacionado com o funcionamento do sistema de glândulas que as abelhas possuem. No entanto, a presença de patógenos na população pode causar alterações comportamentais que prejudicam o bom desenvolvimento da colônia. O trabalho objetivou verificar se há relação entre a secreção proteica glandular e cerebral nas diferentes atividades desempenhadas por operárias adultas, em *A. m. scutellata* (Africanizada) e *A. m. ligustica* (Europeia), e como o vírus deformador de asas (DWV) poderia interferir no desempenho dessas atividades. Foram realizados: testes de proteínas pelo método Bradford no cérebro e nas glândulas salivar torácica, salivar cefálica, mandibular e hipofaríngea de abelhas Africanizadas e Europeias com idades de 0 (recém-emergidas), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias; medição da área dos acinos das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea dessas abelhas; avaliação do desenvolvimento de atividade realizada pelas abelhas e reversão do processo de oviposição por operárias em abelhas Africanizadas; teste para a presença do DWV por PCR em tempo real, em abelhas Africanizadas e em cérebro e glândulas salivar torácica, salivar cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias com 5 e 30 dias de idade; e avaliação morfológica dos danos causados pela infecção aguda do DWV no cérebro e glândulas estudadas. As abelhas Africanizadas e Europeias apresentaram teores estatisticamente significativos de proteínas ($p > 0,05$) para todas as estruturas e idades estudadas. As áreas dos acinos das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea apresentaram alterações de acordo com o desenvolvimento dessas glândulas nas diferentes idades estudadas. Foi observado que enxames de abelhas de mesma idade são capazes de executar diferentes atividades necessárias para a sobrevivência de sua colônia, sendo que a principal atividade, desempenhada nas diferentes idades estudadas, era indicada pelos teores significativos de proteínas encontrados ($p > 0,05$). As abelhas Europeias de mesma idade apresentaram desenvolvimento dos acinos da glândula salivar cefálica superior ao dos acinos da hipofaríngea nas idades iniciais avaliadas, diferindo da área dos acinos das mesmas glândulas quando comparadas com abelhas que tiveram o seu desenvolvimento em colônia normal. As operárias podem controlar o estado zanganeiro da colônia. As abelhas Africanizadas e Europeias apresentaram resultados positivos para o vírus DWV, resultado também observado nas glândulas salivar torácica e mandibular das abelhas com cinco dias de idade. Foi observado que a infecção aguda do DWV causa alterações morfológicas nas glândulas das abelhas, as quais apresentam plasticidade no desenvolvimento das atividades, não sendo estas restritas a uma determinada idade. Além disso, a infecção pelo vírus DWV não é limitante em abelhas Africanizadas, mas é em Europeias.

Palavras-chave: Glândulas das abelhas; Polietismo; Colônia zanganeira; DWV

ABSTRACT

Polyethism and deformed wing virus detection in honeybees *Apis mellifera scutellata* (Africanized) and *Apis mellifera ligustica* (European)

The performance of tasks in the *Apis mellifera* colony is related to the functioning of their gland system. However, the presence of pathogens in the population may lead to behavior modifications that can harm the proper development of the colony. This work aimed to verify whether there is relation between gland and brain protein secretion for the different tasks performed by the adult worker honeybees, in *A. m. scutellata* (Africanized) and *A. m. ligustica* (European), and how the deformed wing virus (DWV) could interfere with the performance of these tasks. The following analysis were carried out: protein tests (Bradford method) in the brain and in mandibular, hypopharyngeal, and thoracic and cephalic salivary glands, in Africanized and European honeybees at the ages of 0 (newborn), 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days; measurements of the acini area of cephalic salivary and hypopharyngeal glands in those honeybees; evaluation of the development of tasks performed by honeybees and reversion of the laying workers of Africanized honeybees; test to detect DWV using real-time PCR in Africanized honeybees and in the brain and in mandibular, hypopharyngeal, and thoracic and cephalic salivary glands of European honeybees at the ages of 5 and 30 days; and morphological evaluation of the damages caused by the DWV acute infection in the brain and in the studied glands. Africanized and European honeybees showed statistically significant protein contents ($p>0.05$) for all the structures and ages studied. The acini areas of cephalic salivary and hypopharyngeal glands showed modifications according to the development of those glands at the different studied ages. It was observed that the swarms of bees with the same age are capable to perform different tasks needed to the survival of their colony, being the principal task, performed at the different studied ages, indicated by the significant protein contents found ($p>0.05$). The European honeybees at the same age showed higher acini development in the cephalic salivary gland than in the hypopharyngeal one at the initial studied ages, differing from the acini area in the same glands of honeybees grown in a regular colony. The worker honeybees can control the laying workers of the colony. Africanized and European honeybees showed positive results for DWV, which was also observed in thoracic salivary and mandibular glands in five-day-old honeybees. It was observed that the acute DWV infection causes morphological modifications in the honeybees glands, which show plasticity in the performance of tasks, not being them restricted to a particular age. Moreover, the DWV infection is not limiting for Africanized honeybees, but it is for the European ones.

Keywords: Bee glands; Polyethism; Laying workers; DWV

1 INTRODUÇÃO

As abelhas (Hymenoptera: Apidae) têm sido utilizadas como modelo de organismo vivo devido à sua capacidade sensorial, que as tornam capazes de manter grandes populações com até 100 mil indivíduos. Entre as abelhas, *Apis mellifera* é considerada uma espécie modelo no que se refere a estudos voltados aos mecanismos de aprendizagem e memória nos insetos (MENZEL; MÜLLER, 1996).

Para manter uma população tão grande, as abelhas necessitam trabalhar conjuntamente, onde determinados grupos ficam encarregados de tarefas específicas que são fundamentais para o desenvolvimento da colônia. O desenvolvimento das atividades para manutenção da colônia exige que a abelha mude de função a cada período de tempo, o que só é possível devido à alimentação proteica e à secreção de glândulas encontradas ao longo do corpo desses insetos.

As abelhas possuem um surpreendente aparato glandular ao longo do corpo, no entanto, as glândulas relacionadas à produção de alimento localizam-se no tórax e na cabeça. Dentre essas glândulas, a hipofaríngea secreta produtos utilizados na alimentação das crias e rainhas em *A. mellifera* (CRAILSHEIM, 1991), além da produção de enzimas que atuam no processo de transformação do néctar em mel (SCHMITZOVÁ et al., 1998); a glândula salivar torácica secreta produtos utilizados para a lubrificação das peças bucais e enzimas digestivas (HOUSE; GINSBORG, 1985); a salivar cefálica ainda não possui as funções de suas secreções bem definidas, porém atribui-se a elas a lubrificação das peças bucais e produção de feromônios utilizados para marcação de trilha; já a secreção da glândula mandibular difere de acordo com a casta existente na colônia. Nas operárias, por exemplo, a secreção desta glândula é adicionada à secreção da glândula hipofaríngea para a alimentação das crias, além de produzir feromônios de marcação de trilha.

Por desenvolver atividades específicas em cada uma das diferentes fases de sua vida adulta, as abelhas continuam intrigando os estudiosos (WOYCIECHOWSKI; MORON, 2009). A plasticidade destes insetos com relação à execução de suas atividades permite que ele se adapte a várias situações diferentes ao longo da vida na colônia (DALE et al., 2005). A dinâmica de secreção dessas

glândulas e as alterações que podem ocorrer de acordo com a idade de operárias adultas ainda apresentam desafios, pois existem questões que não foram bem esclarecidas, principalmente no polihíbrido 'africanizada', que é oriundo do cruzamento das linhagens africana e europeia. Esse polietismo, em *A. mellifera*, pode ser controlado pelo cérebro, diferenciando-se dos demais insetos, onde o cérebro não desempenharia essa função (SNODGRASS, 1956). Acredita-se que a dinâmica temporal dos estágios da memória, que permitiria o polietismo, está ajustada ao comportamento desempenhado por este inseto (GHOSH, 2002).

A maior parte dos estudos fisiológicos realizados com *A. mellifera* envolve linhagens europeias. Há necessidade de estudos nas abelhas africanizadas, além de comparação entre as subespécies, pois ainda existem várias dúvidas de como as barreiras geográficas e a mistura de subespécies atuaram sobre esta espécie de abelha.

Além disso, uma grande preocupação que toma conta do cenário apícola são as possíveis doenças que acarretam em perda de enxames e consequentemente da produção de produtos apícolas. Vírus, bactérias, fungos, protozoários, ácaros parasitas e nematoides estão dentre os causadores de doenças em *A. mellifera* (BAILEY; BALL, 1991), ocasionando grande impacto na apicultura mundial. Em abelhas africanizadas esse impacto ainda não está sendo avaliado, pois essas abelhas possuem um histórico de alta resistência a alguns patógenos e ácaros parasitas (AUMEIER, 2001; MONDRAGÓN et al., 2005). Porém, após vários anos de baixa prevalência de doenças na população dessas abelhas no Brasil, o cenário começa a se modificar, tendo sido notificados declínios nas populações de abelhas africanizadas que causaram severos impactos na apicultura, principalmente na região Sudeste do país (TEIXEIRA et al., 2008).

Um patógeno que se destaca é o vírus deformador de asas, que, associado ao ácaro *Varroa destructor*, seu vetor, pode causar sérios danos morfofisiológicos às abelhas. Apesar da sua importância, pouco se sabe a respeito dos efeitos deste vírus sobre a secreção glandular, assim como sobre cada uma das diferentes atividades desempenhadas por operárias adultas.

Estudos envolvendo a frequência de ocorrência desse patógeno e os efeitos das alterações morfofisiológicas que ele pode causar são essenciais para que se possa classificar qualitativamente e quantitativamente os seus danos sobre

A. mellifera e, conseqüentemente, para auxiliar na busca por práticas mitigadoras de sua ocorrência. Ademais, o aprofundamento sobre o conhecimento da morfologia e comportamento da abelha africanizada poderá possibilitar o uso de práticas de manejo mais adequadas para o melhor aproveitamento dos serviços de polinização desse tão importante inseto, pelos apicultores e produtores agrícolas.

1.1 Objetivo geral

Verificar se há relação entre a secreção proteica glandular e cerebral nas diferentes atividades desempenhadas por operárias adultas, em *Apis mellifera scutellata* (africanizada) e *Apis mellifera ligustica* (europeia), e como o vírus deformador de asas poderia interferir no desempenho dessas atividades.

1.1.1 Objetivos específicos

- Quantificar o teor proteico total das glândulas salivares cefálica, e torácica, hipofaríngea, mandibular e cérebro ao longo do estágio adulto de *A. mellifera*;
- Estudar o desenvolvimento glandular ao longo do estágio adulto das abelhas africanizada e europeia;
- Avaliar a plasticidade de operárias no desenvolvimento das atividades necessárias para a manutenção da colônia;
- Correlacionar os padrões de secreção proteica das glândulas estudadas com o comportamento das subespécies estudadas;
- Determinar a frequência de ocorrência do vírus deformador de asas nas duas subespécies de abelhas estudadas; e
- Averiguar a morfologia das glândulas e cérebros de abelhas *A. mellifera ligustica* com infecção aguda causada pelo vírus deformador de asas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Apis mellifera*

As abelhas pertencem à ordem Hymenoptera, existindo aproximadamente 25.000 espécies distribuídas em 11 famílias. As abelhas melíferas pertencem à família Apidae que se divide em três subfamílias, Bombinae, Meliponinae e Apinae, sendo que esta última engloba a tribo Apini, com o gênero *Apis* (DEVILLERS, 2002).

Embora sejam escassas evidências fósseis que indiquem realmente o surgimento das abelhas, acredita-se que elas evoluíram juntamente com o surgimento das plantas fanerógamas, no Período Cretáceo, entre 146 a 76 milhões de anos (COLLET, 2004). As famílias das abelhas modernas existem há aproximadamente 80 milhões de anos, tendo sua diversificação se dado juntamente com a irradiação evolutiva das plantas angiospermas (RAVEN et al., 2001), provavelmente através de vespas predadoras, que passaram a aproveitar pólen, mel e cuidar de suas crias (CALATAYUD, 2005).

Os mais antigos fósseis de abelhas são do período Eoceno, há aproximadamente 40 milhões de anos, no entanto, as evidências morfológicas mostram que houve pouca evolução das abelhas nos últimos 30 milhões de anos, e a semelhança física dos fósseis quando comparados aos das operárias atuais indica que o complexo comportamento social destes animais já estava desenvolvido, desde o Mioceno, há aproximadamente 27 milhões de anos (WINSTON, 1991).

O sucesso evolutivo desses insetos deu-se devido à sua capacidade de controlar a temperatura interna das colônias e de se agruparem. Estas características permitem a permanência em locais de temperaturas variadas, favorecendo a sua dispersão por regiões de climas diversos (COLLET, 2004).

A princípio, o gênero *Apis* foi descrito possuindo as espécies *Apis dorsata*, *A. florea*, *A. indica*, *A. mellifera* (DADE, 1962), *A. laboriosa* e *A. cerana* (WINSTON, 1991), considerando as abelhas existentes na África como subespécies de *A. mellifera* (DADE, 1962; WINSTON, 1991). No entanto, muitas espécies foram inicialmente descritas como raças geográficas divididas em: tropical, subtropical e de clima temperado, na África, Oriente Médio e Europa. Recentemente, com a realização de estudos moleculares aliados aos taxonômicos, foram acrescentadas

novas espécies que antes eram consideradas como subespécies, passando o gênero a englobar 10 espécies: *Apis nuluensis*, *A. nigrocincta*, *A. andreniformis*, *A. binghami*, *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea*, *A. koschevnikovi*, que são encontradas na Ásia, *A. laboriosa* na Índia, *A. mellifera lingustica*, oriunda da Europa, e *A. m. scutellata* e *A. m. lamarckii*, originárias da África (ARIAS; SHEPPARD, 1996; 2005).

As abelhas *A. mellifera* possuem muitas subespécies com características comportamentais e morfológicas diferentes (TOFILSKI, 2008). São abelhas altamente sociais e vivem em grandes colônias, sendo estudadas, tanto em pesquisas básicas como aplicadas, pois sua natureza singular associada a interesse econômico faz com que elas sejam consideradas “rainhas dos insetos” (WINSTON, 1991).

Esses insetos são altamente importantes para o meio ambiente e para a economia. O maior serviço prestado pelas abelhas é a polinização, que possui valor ecológico e agrícola, contribuindo para o sucesso reprodutivo de muitas plantas, garantindo a variabilidade genética destas (GRADES, 2007). Na agricultura é um fator fundamental para muitas culturas, aumentando o vingamento de frutos, dos grãos, o teor de óleos e demais substâncias extraídas dos frutos, melhorando a qualidade destes (WILLIAMS; CORBET; OSBORNE, 1991; FREITAS, 1997;).

Uma atividade importante é a criação racional de abelhas do gênero *Apis* com finalidade econômica (VILELA, 2000). A atividade apícola foi oficialmente reconhecida no Egito há cerca de 2.400 anos A.C. Os egípcios começaram as primeiras técnicas de manejo, passando a colocar as abelhas em potes de barro, visando o transporte das colmeias, palavra que possui origem grega e deriva de “colmo”, cujo significado é recipiente com forma de sino feito de palha trançada (CARVALHO, 2005). As abelhas produzem mel, pólen, cera, própolis, geleia real e, além disso, são responsáveis por boa parte da polinização das plantas (WINSTON, 1991).

O valor ambiental da apicultura é caracterizado pela interdependência das abelhas com a vegetação, pois as visitas desses insetos às flores das plantas garante a polinização, aumentando a produtividade agrícola, com a melhoria da qualidade e quantidade dos frutos e sementes, garantindo a regeneração e a perpetuação das espécies nativas (PEGORARO; ZILLER, 2003).

2.2 *Apis mellifera scutellata* (Africanizada)

O habitat natural das abelhas do gênero *Apis* inicia-se no extremo sul da África e do Mediterrâneo, norte da Europa até o sul da Escandinávia (WINSTON, 1991). A introdução no Brasil ocorreu aproximadamente em 1839, pelo padre Antonio Carneiro Aureliano que importou colmeias de Portugal e instalou-as no Rio de Janeiro. Em 1841 já havia mais de 200 colmeias, instaladas na Quinta Imperial. Em 1845, colonizadores alemães trouxeram abelhas da Alemanha conhecidas como Nigra, (*Apis mellifera mellifera*) e iniciaram a apicultura nos estados do sul (TRINDADE et al., 2004).

A partir daí os imigrantes trouxeram raças de abelhas Espanholas, Portuguesas e Alemãs para povoarem o país. Porém, em 1950, a vulnerabilidade dessas raças dizimou cerca de 80% dos enxames. Com o intuito de melhorar a apicultura nacional, em 1956, o professor Warwick Stevam Kerr, selecionou abelhas rainhas Africanas *A. mellifera scutellata*, consideradas mais produtivas e resistentes a doenças, que foram trazidas ao Brasil para pesquisas comparativas com as variedades Europeias que aqui existiam (PEREIRA; VILELA, 2003).

Dos enxames existentes, 26 fugiram acidentalmente do apiário experimental, que se localizava no horto florestal de Rio Claro, no estado de São Paulo (KERR, 1967; NOGUEIRA-NETO, 1964; PORTUGAL-ARAÚJO, 1971). Acredita-se que devido ao seu grande poder de colonização e maior defensividade, as abelhas Africanas inter cruzaram com as formas Europeias existentes na região sudeste do Brasil, originando as abelhas Africanizadas (MATIS, 1991; WINSTON, 1991).

Por sua maior rusticidade e melhor adaptação ao clima brasileiro, as abelhas Africanas se espalharam pelo país e devido à sua dominância genética, ocorreu a miscigenação com as abelhas Europeias na maioria dos apiários em apenas 02 anos (SILVA, 2001).

Em 1980, os Estados Unidos tomaram diversas medidas para impedir a entrada das abelhas Africanizadas no país, pois como eles utilizavam abelhas Europeias para polinização de culturas agrícolas, e como as abelhas Africanas eram conhecidas por serem altamente defensivas, os agricultores acreditavam que essas abelhas não serviriam para atuar como polinizadores (COLLET, 2004).

Buscando ressaltar a agressividade da *A. mellifera* polihíbrida, os americanos criaram o termo pejorativo “*killer bee*” (abelhas assassinas) e abelhas brasileiras, porém esta última denominação é usada para nomear as abelhas nativas, que não possuem ferrão. Criou-se, então, o termo “Africanizada”, que se refere a abelhas polihíbridas originadas no Brasil pelo cruzamento de espécies *A. mellifera* e *A. mellifera scutellata* (GONÇALVES, 2006).

Porém, apesar de ser mais produtiva e resistente a doenças do que as abelhas europeias, a abelha Africanizada inicialmente ocasionou um grande impacto na apicultura devido à sua defensividade, comportamento de pilhagem exacerbado e tendência a enxameação (GONÇALVES, 1992). Em meados dos anos 70, apicultores e pesquisadores passaram a desenvolver novas técnicas que possibilitassem o manejo adequado das abelhas Africanizadas (PEREIRA; VILELA, 2003), e novos estudos sobre a biologia, comportamento e melhoramento, fizeram com que a apicultura brasileira passasse por grandes mudanças, fazendo com que o produtor se adaptasse à abelha Africanizada (GONÇALVES, 1992; DE JONG, 1996).

A alta capacidade de defesa, adaptação a ambientes inóspitos e a capacidade de reprodução com ciclo de vida mais curto que as demais subespécies europeias são características das africanizadas que muito se assemelham às das abelhas africanas. Tais características permitem a esta raça de abelhas uma rápida ampliação da biomassa e significativo aumento populacional (GONÇALVES, 1994). Em todo o Brasil, a apicultura está sendo desenvolvida com abelha Africanizada, que apresentou uma melhor adaptação às condições climáticas do país e que apesar de serem mais defensivas que as subespécies europeias, respondem docilmente a um manejo adequado, reservando o potencial de defensividade para os inimigos naturais (VILELA, 2000).

2.3 Polietismo

A colônia de *A. mellifera* é dividida em indivíduos reprodutivos (rainha, zangão) e não reprodutivos (operárias) (HÖLLDOBLER; WILSON, 2009) ou castas, onde existe o macho fértil ou zangão, e as fêmeas, que podem ser classificadas como fértil, como a rainha, ou infértil, como as operárias (TEIXEIRA et al., 2007). A

determinação dessas castas pode ser genética, como na diferenciação dos sexos (masculino e feminino) e/ou hormonal e nutricional, em caso de rainha e operária, pois um ovo fertilizado tem a capacidade de desenvolver tanto uma rainha quanto uma operária, dependendo do tipo de célula onde a larva se desenvolverá e alguns aspectos nutricionais (WINSTON, 1991).

Essa divisão em indivíduos reprodutivos e não reprodutivos fortalece a colônia, tornando-a mais eficiente, uma vez que evita a competição reprodutiva entre seus integrantes, e a sobrevivência de uma colônia é dependente da existência de códigos de comunicação, sistemas de castas e divisão do trabalho (HÖLLDOBLER; WILSON, 2009).

No enxame de abelhas, a casta operária (fêmeas inférteis) realiza todo o trabalho de manutenção da colmeia (CRUZ-LANDIM, 1994). Isso é possível devido ao polietismo, que é a divisão de trabalho de acordo com a idade temporal (BESHERS et al., 2001). A presença de castas e polietismo em insetos sociais torna-os um superorganismo, ou seja, indivíduos autossuficientes e organizados de acordo com a divisão de trabalho e unidos por meio de um sistema fechado de comunicação, podendo ser comparado com um organismo em relação a sua organização (Tabela 1). Teoricamente o polietismo necessita de indivíduos especialistas em cada atividade desenvolvida em proporção adequada à necessidade da colônia, por sua vez os trabalhadores necessitam de uma especialização fisiológica para o desempenho dessas atividades (HÖLLDOBLER; WILSON, 2009).

Tabela 1 - Paralelos funcionais entre um organismo e um superorganismo

Organismo	Superorganismo
Células	Membros da colônia
Órgãos	Castas
Gônadas	Castas reprodutivas
Órgãos somáticos	Casta trabalhadora
Sistema imune	Casta defensiva; comunicação de alarme-defensa; critérios de reconhecimento da colônia
Sistema circulatório	Distribuição do alimento, incluindo trofalaxia, distribuição de feromônios e pistas químicas
Órgãos sensoriais	Combinado aparato sensorial de membros da colônia
Sistema nervoso	Comunicação e interação entre os membros da colônia
Pele, esqueleto	Ninho
Organogênese: crescimento e desenvolvimento do embrião	Sociogênese: crescimento e desenvolvimento da colônia

Fonte: HÖLLDOBLER; WILSON, 2009.

As tarefas executadas pelas operárias na colmeia são: limpeza e construção das células, cuidado e alimentação da rainha, manipulação do alimento, ventilação, guarda e forrageamento (SEELEY, 1982). Essas atividades são realizadas em função da idade da operária (Figura 1), ou seja, com menos de três semanas a abelha desempenhará atividades no interior da colônia e após esse período iniciará a atividade de forrageamento, trabalhando fora da colônia buscando néctar e pólen (MENZEL; GIURFA, 2001).

Figura 1 - Divisão temporal de trabalho, baseada na mudança de comportamento em operárias de *Apis mellifera*. Fonte: HÖLLDOBLER; WILSON, 2009

Acredita-se que as mudanças de atividades são reguladas pela taxa de hormônios circulantes (SULLIVAN et al., 2000), por reações químicas (SCHULZ; ROBINSON, 1999), por mudanças estruturais do cérebro (WITHERS et al., 1993) e pela influência do gene do forrageamento (*Amfor*) associado com a idade (BEN-SHAHAR et al., 2003). Ou seja, são necessárias especializações fisiológicas para que as abelhas possam desempenhar todas as atividades necessárias à colônia, que fornece sinais para o sistema sensorial da abelha. Os sinais alteram a atividade cerebral enviando podendo ser inibidores ou estimuladores para a *corpora allata*,

responsável pela produção do hormônio juvenil, agindo sobre o tamanho e a atividade da glândula hipofaríngea e consequentemente pelo trabalho desempenhado pela abelha (HUANG; ROBINSON, 1999).

O sistema que permite o polietismo em *A. mellifera* é bastante flexível, permitindo que, de acordo com a necessidade da colônia, a abelha alterne a atividade desenvolvida em determinada idade. Porém, é possível notar que o seu desenvolvimento ocorre de uma forma progressiva, iniciando-se no interior do ninho e indo para atividades externas, realizando nesse ínterim trabalhos altamente especializados como a limpeza dos alvéolos, alimentação das larvas e o forrageamento (WINSTON, 1991).

2.4 Glândulas da cabeça e tórax

Essas glândulas geralmente são denominadas de acordo com o apêndice onde se localizam (Figura 2), assim, as glândulas mandibulares encontram-se nas mandíbulas, as salivares ligam-se aos lábios (anteriormente chamadas de glândulas labiais) e a hipofaríngea, cujos dutos desembocam no assoalho da hipofaringe (CRUZ-LANDIM, 2008).

Figura 2 - Glândulas da cabeça e tórax de abelha *Apis mellifera*. Salivary Glands = glândulas salivares (porção cefálica e torácica); Hypopharyngeal Gland = glândula hipofaríngea; Mandibular Gland = glândula mandibular. Fonte: WINSTON, 1999

2.4.1 Glândulas salivares

Em Himenóptera, as glândulas salivares consistem de vários túbulos secretores ou unidades secretoras (Figura 3) que possuem forma acinosa, podendo ainda conter um reservatório (ROCHA; CAETANO, 2004). Essas glândulas desempenham um papel importante na vida social dos insetos, como em abelhas, por exemplo, onde a execução das atividades é desenvolvida principalmente com base na idade das operárias (DESEYN; BILLEN, 2004).

A glândula salivar pode apresentar ramos torácicos e cefálicos, que possuem porções secretoras pares, com seus dutos unindo-se para atravessar a cabeça, liberando suas secreções na base da língua por um duto excretor único. O ramo torácico está presente em todos os himenópteros, porém, a porção cefálica é restrita a algumas espécies de abelhas, principalmente às integrantes da família Apidae (CRUZ-LANDIM, 2008).

A glândula salivar torácica de *A. mellifera* está situada na parte ventral anterior do tórax (DESEYN; BILLEN, 2004). É constituída por porções secretoras pares providas de um duto excretor. Essas porções secretoras são compostas por um conjunto de três unidades secretoras tubulares. O ramo maior encontra-se

ventral e paralelamente ao esôfago e os ramos menores localizam-se anteriormente, sob o pronoto (SCHÖNITZER; SEIFERT, 1990; CRUZ-LANDIM, 2008).

Figura 3 - Representação da glândula salivar de *Apis mellifera* operária. 1. glossa; 2. palpo labial; 3. paraglossa; 4. salivarium; 5. premento; 6. post-mento; 7. duto excretor comum; 8. glândula salivar cefálica; 10. duto da glândula do tórax; 11. glândula salivar torácica; 12. reservatório. Fonte: CRUZ-LANDIM, 2008

As secreções da glândula salivar torácica são importantes para a maturação do mel (MAURIZIO, 1975), pois produzem enzimas que promovem a dissolução dos açúcares do mel, quebra de gorduras, produção da secreção utilizada pelas abelhas para lambar a rainha (SIMPSON, 1960), possivelmente contendo feromônios (MAURIZIO, 1975), além de secreções que umedecem o pólen, a cera etc. (SIMPSON, 1963).

Já a glândula pós-cerebral ou salivar cefálica é composta por um par de unidades glandulares situada na cabeça (SIMPSON, 1960). Esta é constituída por unidades secretoras alveolares formadas por epitélio coberto por uma cutícula, que converge para formar os dutos excretores, os quais se unem ao duto excretório comum da glândula salivar torácica, formando o ducto excretório principal, que joga

o conteúdo secretado por ambas as glândulas na língua (POIANI; CRUZ-LANDIM, 2010).

Essas glândulas são responsáveis pela produção de compostos voláteis (hidrocarbonetos) que são utilizados no reconhecimento dos membros da colônia (KATZAV-GOZANSKY et al., 2001), feromônios reguladores de comportamento dos adultos (BECARD et al., 2004) e enzimas utilizadas no metabolismo de carboidratos (FUJITA et al., 2010)

2.4.2 Glândula Mandibular

As glândulas mandibulares apresentam morfologia e funções diferentes de acordo com as castas de abelhas (SNODGRASS, 1956) e estão localizadas internamente à mandíbula (Figura 4), com origem a partir de invaginações da membrana de articulação mandibular com a cabeça. São glândulas classe III, ou seja, as células secretoras geralmente não estão incorporadas na epiderme, apesar de serem originadas dessa camada e possuírem um canal que liga a célula a um poro na cutícula por onde sai a secreção (CRUZ-LANDIM, 2002). Produzem feromônio que desempenha papel direto na comunicação da colônia (CRUZ-LANDIM; MELO, 1967), sendo importante, por exemplo, na detecção da presença da rainha na colônia, uma vez que essa glândula em operárias e rainha de *A. mellifera* secretam componentes distintos.

A glândula mandibular de operárias secreta feromônios de inibição do hormônio juvenil III que retardam o início da atividade de forrageio, conservação do alimento e nutrição das larvas (PLETTNER et al., 1990), sendo que esta última ocorre nos primeiros 15 dias da fase adulta das abelhas (WINSTON, 1991).

Figura 4 - Representação da localização da glândula mandibular de operária de *Apis mellifera*: glândula mandibular (A); saída da secreção (B); fibra (C); prato hipofaríngeo (D); músculo (E); ponte tentorial (F); parte do clipeo (G); forame occipital (H). Fonte: SIMPSON, 1960

2.4.3 Glândula hipofaríngea

A glândula hipofaríngea é composta por cachos unicelulares internos, que se originam a partir de invaginações da placa hipofaríngea, sendo formada por células de classe III (CRUZ-LANDIM, 2002), que quando estão em seu ponto máximo de desenvolvimento formam cachos com acinos pluricelulares com mais de 1 cm de comprimento, se enrolando sobre o cérebro. Esses acinos ligam-se a um duto principal, responsável pela síntese e secreção de componentes para a formação da geleia real (HUANG et al., 1989).

Essa glândula inicia a secreção de seus produtos nos primeiros dias após a emergência das abelhas, atingindo o seu tamanho máximo entre o quinto e o 15º dia da fase adulta, quando a abelha desenvolve a atividade de nutriz (KNECHT; KAATS, 1990; WINSTON, 1999). Nesse período a hipofaríngea secreta a maior parte da geleia real utilizada na alimentação das crias, rainha e outros adultos como operárias e zangões (CRAILSHEIM, 1990, 1991).

Além disso, em operárias, esta produz a enzima invertase, usada para processar néctar em mel (MAURIZIO, 1965), e secreção do feromônio de alarme 2-heptanona (CASSIER; LENSKEY, 1991). Em operárias que desenvolvem a atividade de forrageio, essa glândula apresenta tamanho reduzido e menor quantidade de enzimas proteolíticas intestinais que as nutrízes (CRAILSHEIM; STOLBERG, 1989). Porém, a mudança dos produtos secretados pela hipofaríngea pode ser programada geneticamente, de forma a possibilitar a execução de diversas atividades pela abelha e/ou pelas condições da colônia que induziria o seu desenvolvimento (WINSTON, 1991).

2.5 Cérebro

O sistema nervoso é responsável por gerar e controlar o comportamento (ABOITIZ, 1996), que é considerado um dos fatores do sucesso adaptativo das abelhas (GIURFA, 2003), sendo o cérebro o governante e produtor de padrões comportamentais de longa duração, controlando suas modificações pela aprendizagem (SNODGRASS, 1956).

O cérebro dos insetos divide-se em protocérebro, deutero cérebro e tritocérebro. No protocérebro, além dos lobos ópticos, encontram-se os corpos pedunculados ou corpos de cogumelo, estruturas compostas por dois pares de cálices que são formados pelos neurônios ou células de Kenyon. O deutero cérebro é formado por dois lóbulos que se localizam lateralmente ao esôfago, abrigando os centros olfatórios que englobam as arborizações terminais dos axônios neurosensoriais e motores das antenas. Já o tritocérebro é composto por um par de lóbulos paralelos ao esôfago, que são responsáveis pela ligação do cérebro ao gânglio subesofágico e nervos anteriores (CRUZ-LANDIM, 2008).

A abelha é um excelente modelo para estudos de aprendizagem, pois possuem excelente sistema cerebral, apesar do cérebro pequeno, com aproximadamente 1 mm^3 e 95,000 neurônios (MENZEL; LEBOULLE; EISENHARDT, 2006). Existem diferenças entre os tamanhos dos cérebros nas castas de abelhas, sendo as operárias as que possuem esta estrutura mais desenvolvida em comparação aos zangões e à rainha (JAWLOWSKI, 1957), o que contribui para que ocorram as diferenças individuais em habilidades cognitivas. Os corpos de

cogumelos são os centros cerebrais mais importantes para a aprendizagem em insetos (GRONENBERG; COUVILLON, 2010), e essa estrutura é ainda responsável pela expressão da proteína três da geleia real (RJP-3) (KUCHARSKI; MALESZKA, 1998).

Figura 5 - Reconstrução tridimensional do cérebro de *Apis mellifera*: gânglios medulares (ME); lóbulo (LO); lóbulo antenal (AL); corpos de cogumelo (parte superior); cálice lateral (LC); cálice mediano (MC); outras neurópilas (centro); Gânglio subesofagiano (SOG). Fonte: MENZEL; LEBoulle; EISENHARDT, 2006

As abelhas desenvolveram um sofisticado sistema sensorial que inclui capacidades de aprendizado e memorização (GIURFA; MENZEL, 1997). As operárias de *A. mellifera*, por exemplo, possuem os cálices dos corpos de cogumelo maiores quando executam a atividade de forrageio (GRONENBERG; COUVILLON, 2010). Essa atividade é essencial para a sobrevivência da colônia e, para que seja realizada com sucesso, a abelha precisa aprender e lembrar não somente as cores, os formatos e o recurso alimentar (pólen e/ou néctar) das flores, mas também como irá coletar esse alimento (MENZEL et al., 1996).

Além disso, as abelhas têm sensores de tempo, com moduladores que respondem a estímulos de acordo com o horário do dia, podendo aprender a inverter a sua preferência por um padrão visual (ZHANG et al., 2006), ajustando seus esforços de aprendizagem em resposta à evolução das necessidades da informação visual, que são motivadas pela qualidade dos alimentos e fontes de incerteza

espacial do ambiente, permitindo que a abelha tenha informações suficientes que lhes permitam voltar a uma fonte de alimento (WEI; RAFALKO; DYER, 2002).

Essas habilidades tonam as abelhas os insetos que apresentam a mais sofisticada estrutura cerebral; não sendo possível, no entanto, sobreviver em isolamento, pois precisam se comunicar intensivamente com os outros integrantes da colônia para desempenhar as diversas atividades necessárias para a sobrevivência da sociedade em que vive (MENZEL; LEBoulLE; EISENHARDT, 2006).

2.6 Proteínas

A palavra proteína deriva do grego *Protos*, que significa “primeira” ou “mais importante”. São macromoléculas abundantes nas células, com grande diversidade de funções biológicas e de produtos finais em várias vias de informação. As células são capazes de produzir proteínas com propriedades e atividades diversas, possibilitando aos seres vivos sintetizar produtos diversos, como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, músculos etc. (NELSON; COX, 2002). São formadas basicamente por 20 aminoácidos padrão (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, triptofano, serina, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, cisteína, lisina, arginina, histidina, ácidos aspartâmico e glutâmico) tendo as propriedades físico-químicas mais bem definidas e consequentemente sendo mais fáceis de isolar e caracterizar do que os ácidos nucleicos, polissacáridos, ou lipídios (VOET; VOET, 2011).

Em insetos, a ingestão de proteínas é necessária, pois a sua ausência ou baixo consumo prejudica o desenvolvimento adequado do sistema glandular (CRUZ-LANDIM; AKAHIRA, 1966). Em abelhas, influenciam na composição corporal, incluindo as percentagens de glicogênio, lipídios e proteínas (HRASSNIGG; CRAILSHEIM, 2005). Nesses insetos, a ingestão de pólen como fonte proteica, inicia-se após a emergência das operárias (HAGEDORN; MOELLER, 1967), que dependendo da idade e função desempenhada na colônia terão necessidade de diferentes quantidades no seu consumo diário (CRAILSHEIM et al., 1992).

2.7 Quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976)

Existem vários métodos para a determinação da concentração de proteínas totais, no entanto, as metodologias mais utilizadas são as espectrofotométricas. Antes da escolha do método de análise para a determinação de proteínas totais, é necessário o conhecimento da natureza da amostra, para facilitar a identificação de possíveis interferentes, levando ainda em consideração a sensibilidade do método, que é dependente da quantidade e do volume disponível da amostra, rapidez e custo da metodologia e grau de confiabilidade dos resultados obtidos (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

O método de Bradford é comumente usado para a determinação de proteínas totais em diversos tipos de amostras, devido à sua sensibilidade e facilidade de execução (NAKAMURA et al., 1997; SAPAN; LUNDBLAD; PRICE, 1999). Bradford padronizou o método em 1976, utilizando o corante azul de Coomassie para a quantificação de proteínas totais presentes em diversos tipos de amostras, com a vantagem desse método ser mais rápido, simples e preciso que outros testes com a mesma finalidade (BRADFORD, 1976).

Na solução desenvolvida por Bradford, o corante é mantido a um pH baixo, possuindo coloração acastanhada. Com a ligação da proteína ao corante, a forma aniônica do corante azul de Coomassie se estabiliza, produzindo assim a cor azul que, ao ser levada ao espectrofotômetro para leitura de absorbância óptica num comprimento de onda de 595 nanômetros, fornece um resultado quantitativo do teor de proteínas totais (ROTH, 2012).

A validação do método para a amostra deve ser feita com a construção de uma curva de calibração. Normalmente essa curva é realizada com a quantificação de uma proteína genérica como a albumina de soro bovino (*bovine serum albumin* – BSA) (KRUGER, 2002).

2.8 O vírus deformador de asas de abelhas (DWV)

Os insetos possuem uma extraordinária resistência a infecções. Quando um organismo estranho entra em contato com a sua hemolinfa, ocorre uma reação celular e humoral que busca eliminar esse agente invasor (GILLESPIE;

KANOST, 1997). Porém, algumas vezes esses invasores conseguem desenvolver estratégias para burlar essa resistência natural, momento em que ocorrem as doenças. Como todo organismo vivo, as abelhas são expostas a uma ampla variedade de patógenos, incluindo aproximadamente 18 vírus, que são ameaças significativas para a sua saúde e bem-estar (CHEN; FELDLAUFER, 2006).

O vírus deformador de asas (*deformed wing virus* - DWV) é associado aos sinais de deformação das asas em *Apis mellifera* (MIRANDA; GENERSCH, 2010). O DWV foi inicialmente conhecido como vírus de abelhas do Egito (EBV), que foi isolado em abelhas adultas assintomáticas coletadas no Egito em 1977 (BAILEY; CARPENTER; WOODS, 1979). Em 1982, foi detectado por sorologia em abelhas adultas deformadas coletadas no Japão um vírus que parecia ser da mesma família do EBV, que foi chamado de isolado japonês do EBV, e posteriormente rebatizado de vírus deformador de asas de abelhas, devido aos sintomas com os quais ele estava intimamente associado (BAILEY; BALL, 1991; SHEN et al., 2005; RIBIÈRE; BALL; AUBERT, 2008).

O vírus é transmitido para as operárias verticalmente, por rainhas contaminadas por seus genitores ou por zangões durante o acasalamento, gerando prole que conterà o vírus (CHEN et al., 2006; YUE et al., 2007), no entanto, sem causar sintomas da doença ou danos para a colônia (MIRANDA; GENERSCH, 2010). O DWV também pode ser transmitido por trofalaxia para as larvas (YUE; GENERSCH, 2005) e pelo ácaro vetor *Varroa destructor*, quando normalmente causa infecção e o surgimento dos sintomas da doença (MIRANDA; GENERSCH, 2010).

O ácaro transmite o vírus para as abelhas durante a fase de pupa 1 (YUE; GENERSCH, 2005), quando possui olhos brancos e as asas não estendidas (CUZ-LANDIM, 2008). Se sobreviverem à infecção inicial, essas abelhas geralmente desenvolvem deformação nas asas, encurtamento do abdômen, descoloração da cutícula e terão a sua longevidade reduzida (YUE; GENERSCH, 2005).

Acredita-se que esse vírus pode ser um dos desencadeadores da desordem do colapso da colônia (DCC), particularmente em colônias fortemente infestadas por *Varroa destructor* (MARTIN et al., 1998; BAILEY; BALL, 1991; BOWEN-WALKER et al., 1999).

No Brasil as pesquisas com este vírus são recentes, tendo sido detectado em abelhas oriundas de apiários de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2009) e Minas Gerais (ALMEIDA et al., 2009). Até o presente momento, não existe relato de manifestações das doenças causadas por esse vírus em abelhas africanizadas, tendo apenas a constatação da presença do vírus.

2.9 PCR em tempo real

A reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction – PCR) é uma técnica amplamente utilizada para estudos moleculares, onde é possível amplificar *in vitro* regiões específicas do genoma de qualquer organismo, permitindo assim estudos em diversas áreas (OLIVEIRA et al., 2007). Essa técnica é amplamente utilizada para a detecção dos agentes etiológicos causadores de doenças em abelhas (GOVAN et al., 1999; LAURO et al., 2003; ALIPPI et al., 2004; DE GRAAF et al., 2006; RYBA et al., 2009).

Existem dois tipos principais de PCR, a qualitativa e a quantitativa. A PCR qualitativa baseia-se na presença ou não do produto amplificado no gel, gerando apenas resultado positivo ou negativo. Já a PCR quantitativa (qPCR), determina a quantidade de ácido desoxirribonucleico (DNA) que foi amplificada em comparação a um padrão (VIEIRA, 2012).

A PCR em tempo real é uma técnica quantitativa que utiliza *primers* e desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) marcados por compostos fluorescentes, utilizando termocicladores especiais que realizam diferentes ciclos de temperatura e leitores de fluorescência que fornecem reações quantitativas (VIEIRA, 2012). Isso é possível porque cada nucleotídeo floresce a um determinado comprimento de onda, captado pelo leitor do aparelho, que envia os resultados para um computador que realiza a análise dos resultados (OLIVEIRA et al., 2007). A qPCR é amplamente utilizada na determinação da expressão gênica específica e em técnicas de diagnóstico, em que é necessária a informação sobre a quantidade inicial de DNA nas amostras e quantas moléculas foram formadas durante a reação (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A PCR, em geral, é composta por: amostras de DNA, cujo segmento irá ser amplificado; mistura que contenha os nucleotídeos necessários para a síntese

das novas fitas do DNA (dNTPs: dATPs, dTTPs, dCTPs e dGTPs); enzima DNA-polimerase, que é responsável pela síntese das novas fitas de DNA; cloreto de magnésio, co-fator da reação; e dois iniciadores ou *primers*, que são pequenas sequências conhecidas de DNA (oligonucleotídeos), que delimitam e são complementares à região-alvo de amplificação (OLIVEIRA et al., 2007).

É necessária uma combinação adequada de temperatura e tempo para que ocorra a amplificação e a síntese de novas fitas de DNA. A PCR apresenta três fases fundamentais: a desnaturação, fase na qual o DNA perde sua estrutura de dupla hélice, por meio da elevação da temperatura entre 94°C e 95°C, permitindo que os *primers* se liguem à região complementar à sua sequência na amostra de DNA; o anelamento, onde ocorre a união dos *primers* nas respectivas sequências complementares à região alvo da amplificação; e a extensão onde a enzima de DNA polimerase se reposiciona junto aos *primers* que se anelaram e com o auxílio do magnésio iniciará a síntese da nova fita de DNA (OLIVEIRA et al., 2007).

A qPCR atualmente é amplamente utilizada para a detecção do DWV (TENTCHEVA et al., 2004;2006; FIEVET et al., 2006; SHAH; EVANS; PIZZORNO, 2009; DE GRAAF et al., 2008; EVANS; PIZZORNO, 2009; MARTIN et al., 2012), pois além de identificar a presença viral na amostra é possível a quantificação do DNA viral, possibilitando o conhecimento dos padrões desse vírus em indivíduos sintomáticos e assintomáticos, o que pode contribuir para a busca de soluções para o controle desse vírus que causa um grande impacto na apicultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento e manutenção dos enxames

Foram realizados cinco experimentos em condições de campo, sendo três com abelhas *Apis mellifera scutellata* (Africanizada) no apiário do Laboratório de Insetos Úteis (Figura 6) do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), localizado em Piracicaba, São Paulo, e dois com abelhas *Apis mellifera ligustica* (Europeia) no apiário do Apiculture and Social Insect Laboratory (Figura 7), pertencente ao Department of Animal & Plant Sciences da University of Sheffield, localizado na cidade de Sheffield, Inglaterra.

Figura 6 - Apiário do Laboratório de Insetos Úteis, Piracicaba, São Paulo, BR

Figura 7 - Apiário do Apiculture and Social Insect Laboratory. Sheffield - UK

Os trabalhos de campo no Brasil tiveram início em novembro de 2010, com a preparação dos enxames para a obtenção das abelhas, e os experimentos sendo realizados no verão e inverno de 2011, verão e primavera de 2012, sendo finalizados em novembro de 2012.

Foram selecionados cinco enxames doadores para a formação dos cinco núcleos de abelhas para retirada dos quadros com pupas. Em cada um dos cinco enxames doadores que estavam em colmeias modelo Langstroth, foram retirados cinco quadros contendo crias em estágio de ovos, larvas e pupas, mel e pólen, além de uma parte das abelhas, para formar cinco núcleos. As colmeias doadoras com cinco quadros foram removidas para outro apiário e em seus locais foram colocados os núcleos para que as operárias, ao retornarem da atividade de forrageio, entrassem nos mesmos.

Após uma semana da divisão foi realizada uma revisão nos núcleos para avaliar o seu estado quanto à presença de rainha, realeira e ovos. Caso a rainha estivesse presente no núcleo, era retirada para que uma nova rainha fosse formada.

As revisões dos enxames foram realizadas quinzenalmente (Figura 8), onde eram observadas a uniformidade e a quantidade da postura da rainha, presença ou não de alimento (mel e pólen) (Figura 9) e inimigos naturais. Quando era observada a ausência de espaço no núcleo, retirava-se um favo com cria aberta (ovos e larvas) que era inserido em outro núcleo ou nas demais colônias existentes no apiário, e em seu lugar eram colocados quadros com cera alveolada. Para reduzir a entrada de vento e frio no período de inverno, foi colocado redutor de alvado em todos os núcleos, facilitando o controle da temperatura interna pelas abelhas.

Figura 8 - Procedimentos realizados na revisão dos enxames em núcleo de abelhas africanizadas no Brasil. a. abertura do núcleo e aplicação de fumaça; b. separação dos favos; c. inspeção dos favos

Figura 9 - Quadro observado durante a revisão de enxames de *Apis mellifera*. a. mel estocado; b. pólen ou pão de abelha estocado; c. postura de rainha; d. cria em estágio de pupa

Os experimentos com abelhas europeias foram realizados na primavera e verão europeu de 2012 (correspondendo ao outono e inverno brasileiro).

Para os enxames europeus foram utilizadas colmeias modelo *National*, que contém 10 quadros, porém, com quadros maiores que os utilizados no modelo Langstroth. Apresentavam adaptações para minimizar os efeitos da baixa temperatura, como alvado reduzido e fundo com tela, para que ao se desprender da abelha, o ácaro *Varroa destructor* caia no chão, dificultando o seu retorno para a colmeia.

Em abelhas europeias as revisões foram realizadas semanalmente (Figura 10) e não foram transferidos enxames para núcleos. Entretanto, devido às constantes mudanças de temperatura, foi necessário trabalhar com os enxames doadores nas respectivas colmeias, e como as rainhas possuíam idades conhecidas foi desnecessária a padronização dos enxames. A primeira revisão foi realizada para avaliar a qualidade dos enxames quanto à postura da rainha, à incidência de ácaro e à necessidade ou não de alimentação proteica ou energética.

Figura 10 - Manejo realizado em colmeias europeias: a. apiário na primeira semana de abril de 2012; b. apiário na terceira semana de abril de 2012; c. redução de alvado; d. verificação do nível de infestação do ácaro *Varroa destructor*; e. abertura da colmeia; f. separação dos quadros da colmeia; g. colmeia com 10 quadros e alimentador interno energético; h. detalhe do alimentador interno, com a colocação de material orgânico para facilitar o acesso das abelhas ao alimento

Os enxames possuíam rápido desenvolvimento após o início da primavera, no entanto, foi necessário fornecer a alimentação energética duas vezes por semana em julho, agosto e setembro. Não foi oferecido alimento proteico devido à quantidade e ao fluxo de entrada de pólen observados nas colmeias. Durante as revisões, quando era confirmada infestação de traça da cera, os quadros eram removidos e a cera era derretida com maçarico a gás. Após as revisões, os formões eram lavados com desinfetante à base de amônia para evitar a disseminação de possíveis patógenos.

3.2. Obtenção das abelhas africanizadas e europeias para a montagem dos bioensaios

Para obtenção das abelhas, foram separados de três a cinco quadros com crias operculadas (em estágio de pupas), tendo os mesmos padrões de escurecimento dos opérculos para cada bioensaio. A quantidade de quadros com cria operculada variou de acordo com a área de cria (Figura 11), que era obtida no momento da montagem do experimento, e idade aproximada de emergência das abelhas.

Figura 11 - Quadro com crias coletado para obtenção de abelhas *Apis mellifera*: a. área das crias; b. detalhe de células operculadas; c. abelha emergindo da célula

Após a coleta, os quadros foram envolvidos em tecido filó, para que os adultos permanecessem no quadro após emergirem da célula de cria (Figura 12). Em seguida, os quadros foram colocados em câmara de demanda bioquímica de oxigênio com temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ e umidade de $\pm 60\%$ até a emergência dos adultos (Figura 13).

Figura 12 - Abelhas recém-emergidas retidas no quadro envolvido pelo tecido filó

Figura 13 - Quadros de cria de *Apis mellifera* envolvidos em tecido filó acondicionados em câmaras de demanda bioquímica de oxigênio. a. Laboratório de Insetos Sociais (Brasil); b. Apiculture and Insect Social Laboratory (Inglaterra)

As operárias que emergiram foram marcadas no pronoto com caneta atóxica da marca Uniposca® enquanto ainda estavam presas ao quadro (Figura 14). Após a marcação, as operárias foram introduzidas em um núcleo e/ou colmeia para o desenvolvimento de suas atividades normais. A fumaça foi utilizada para disfarçar

os hidrocarbonetos de reconhecimento de colônia que dificultam a aceitação da abelha estranha numa colônia.

Figura 14 - a. Processo de marcação das abelhas; b. Abelhas marcadas

A frequência de coletas das abelhas marcadas ocorreu do dia zero (início) até 30 dias de idade dos adultos, com intervalos de cinco dias entre as mesmas, totalizando assim sete coletas para cada estação estudada, tanto em abelhas africanizadas quanto em europeias.

Para a realização das coletas, foi adaptado um sugador elétrico, a partir de um aspirador de pó que era acoplado a um recipiente plástico, em cuja tampa haviam sido colocadas duas mangueiras de látex de dois tamanhos. A mangueira de menor tamanho ficava acoplada ao aspirador de pó e a maior era utilizada para a sucção das abelhas (Figura 15). Após a coleta o material era acondicionado em um congelador a $\pm -20^{\circ}\text{C}$.

Figura 15 - Coleta de abelhas *Apis mellifera*. a e b. Detalhe do recipiente de captura e acondicionamento das abelhas; c. Sugador formado por aspirador de pó e recipiente plástico acoplado; d. abelhas marcadas na colmeia; e. processo de sucção das abelhas

3.3 Extração do cérebro e glândulas de *Apis mellifera* (Africanizada e Europeia)

A extração foi realizada enquanto a abelha ainda estava congelada, sendo retirada uma a uma do congelador e colocada em placa de Petri que continha tampão de fosfato-salino (PBS) (mmol/L) com pH 7,4. Foi utilizado microscópio estereoscópico Leica® para a visualização dos procedimentos que seriam realizados. Para o acondicionamento das glândulas e cérebros após a extração, foram adicionados 50 μ l de PBS em cinco microtubos de 1,5 mL previamente identificados com a parte extraída e a idade da abelha. Primeiramente, a cabeça foi

separada do tórax com auxílio de uma tesoura oftalmológica, e em seguida inseriu-se uma pinça no tórax retirando a glândula salivar torácica (Figura 16).

Figura 16 - Extração de glândula salivar torácica em *Apis mellifera*. a. abelha antes da extração; b. tórax separado da cabeça; c. tórax com a glândula exposta evidenciada pelas setas; d. glândula extraída

Para a extração das glândulas cefálicas e cérebro, manteve-se a cabeça na placa de Petri com PBS, com a face ventral voltada para cima. Com o auxílio de uma pinça, fixou-se a mandíbula e com a outra pinça retirou-se a probóscide, apoiando em seguida a pinça onde a probóscide estava localizada.

Com a cabeça fixa, foram feitas inserções com um microestilete na proximidade da mandíbula direita para facilitar a retirada da cutícula ou exoesqueleto com a pinça. Com a retirada da cutícula, a glândula mandibular fica exposta, facilitando a sua extração juntamente com a mandíbula. A mesma operação foi repetida para a retirada da glândula mandibular esquerda da abelha.

Após a extração da glândula mandibular, foi retirada com a pinça toda a parte ventral do exoesqueleto da cabeça, expondo as demais glândulas que ficam enoveladas no cérebro. Com o uso de uma pinça, separou-se o exoesqueleto cefálico dorsal, e foram extraídas a glândula hipofaríngea, que fica enrolada sobre o cérebro, e a glândula salivar cefálica, que fica localizada na parte posterior do cérebro (Figura 17). No cérebro, coletou-se apenas a massa cefálica, descartando-se os olhos compostos e ocelos.

Figura 17 - Extração de glândulas cefálicas de *Apis mellifera*. a. vista ventral da cabeça; b. retirada do exoesqueleto; c. cabeça com o exoesqueleto retirado; d. cérebro ainda com os olhos compostos e glândulas hipofaríngea e salivar cefálica; e. glândula mandibular; f. glândula hipofaríngea; g. glândula salivar cefálica

3.4 Avaliação do desenvolvimento cerebral e glandular por meio do teste de proteínas totais em abelha Africana e Europeia

A quantificação das proteínas totais das glândulas e cérebro das abelhas africanizadas e europeias pelo método de Bradford (1976) foi a ferramenta utilizada para avaliar o desenvolvimento das glândulas e cérebro nas diferentes idades e situações estudadas.

As análises em glândulas e cérebros de abelhas Africanizadas foram realizadas no Laboratório de Insetos Úteis do Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP) em Piracicaba, SP, e as análises das glândulas e cérebros de abelhas Europeias foram feitas no laboratório do Apiculture and Social Insect, no Department of Animal & Plant Sciences (University of Sheffield) em Sheffield, Inglaterra.

As amostras foram formadas pelas glândulas salivar torácica, salivar cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro de 10 abelhas com as idades de zero (recém-emergida), cinco, 10, 15, 20, 25 e 30 dias; e abelhas com infecção aguda causada pelo vírus DWV (apenas em abelhas Europeias), compondo um *pool* por estrutura (glândulas e cérebro) avaliada.

As estruturas extraídas das abelhas foram acondicionadas em microtubos contendo 50 µl de PBS, maceradas utilizando micropistilo de ponta cônica, adicionando-se após mais 250 µl de PBS. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga a 14.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Em seguida, transferiram-se 50 µl do sobrenadante da amostra para três tubos de ensaio (análise em triplicata), sendo acrescentados 1.500 µl do reagente Coomassie Plus Protein Assay® (Thermo Scientific Pierce). A mistura foi homogeneizada por 10 segundos a 9.000 rpm em agitador tipo vórtex e transferida para cubeta de polietileno, sendo efetuada em seguida sua leitura em espectrofotômetro a 595 nm de absorbância.

Foi realizada curva de calibração com albumina de soro bovino para garantir a estabilidade do espectrofotômetro nos espaços de tempo em que as análises foram realizadas.

$$\mu \frac{gP}{gl} = 53.616 \times A \times 1.543 \times \frac{Vt}{Vp} \times \frac{f}{10}$$

O resultado obtido foi submetido à equação:

Onde:

$\mu\text{gP/gI}$ = Micrograma de proteína por glândula;

53,616 = valor obtido no eixo x da regressão da curva de calibração;

A = Valor da Absorbância;

1,543 = valor obtido no eixo y da r;

Vt = Volume total;

Vp = Volume pipetado;

f = Valor da diluição (quando houver); e

10 = Quantidade de glândulas utilizadas.

3.5 Avaliação do polietismo em *Apis mellifera*

3.5.1 *Apis mellifera scutellata* (Africanizada)

Foi construído um núcleo de observação para facilitar o acompanhamento do desenvolvimento das abelhas, com as dimensões de um núcleo modelo Langstroth, porém com paredes de vidro que limitavam a quantidade de quadros para apenas um, e tendo duas portinholas laterais que permitiam a visualização do seu interior sem a retirada da tampa (Figura 18).

Figura 18 - Núcleo de observação construído para a avaliação do polietismo em abelhas africanizadas: a. portinhola lateral para visualização do interior do núcleo; b. vista superior do núcleo com o delimitante de quadros que impede o acesso das abelhas pela parte superior para outras áreas do núcleo; c. vista superior do núcleo com as paredes de vidro que limitam as abelhas à área do quadro

A avaliação do polietismo consistiu em um experimento realizado no Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP) em três etapas, das quais duas foram realizadas no núcleo de observação entre os meses de dezembro 2011 e janeiro de 2012 e a outra em núcleo normal entre os meses de outubro e novembro de 2012. Para a obtenção de abelhas, foram separados quadros de crias operculadas com o procedimento igual ao descrito no item 3.2. As abelhas não foram marcadas, pois os enxames montados tinham aproximadamente 1.000 abelhas com as mesmas idades em todas as três etapas do experimento.

Na etapa realizada nos núcleos de observação um e dois (NA1 e NA2), foi deixado um quadro que continha uma pequena área de mel até os cinco dias de idade das abelhas, sendo depois substituído por um quadro com cera alveolada (Figura 19). No núcleo três (NA3), foi deixado um quadro que continha mel e que não foi substituído durante o período de avaliação (Figura 20).

Figura 19 - Detalhe do experimento com abelha africanizada de mesma idade: a. abelhas nos primeiros cinco dias após a emergência em favo que contém uma pequena quantidade de alimento; b. quadro com faixa de cera alveolada que substituiu o com alimento após o quinto dia de idade das abelhas

Figura 20 - Quadro contendo mel, que permaneceu no núcleo três

No NA2 foi colocado um pedaço de favo com ovos quando as abelhas estavam com cinco, 10 e 15 dias de idade; no NA1 pedaços de favos com ovos foram adicionados quando as abelhas completaram 20 dias de idade; no NA3 os pedaços de favos com ovos de rainha foram colocados quando as abelhas estavam com 10 dias (Figura 21).

Figura 21 - Pedacos de favos contendo ovos de rainha de *Apis mellifera* colocados nos núcleos do experimento de plasticidade de abelhas africanizadas: a. favo em NA1; b. favo em NA2; c. favo em NA3

Não foram realizadas manutenções nos experimentos, pois o objetivo era avaliar se as abelhas da mesma idade seriam capazes de sobreviver e desempenhar todas as funções de que a colônia necessita. A primeira observação ocorreu 24 horas após a introdução das abelhas no núcleo por um período de cinco minutos. As demais observações do comportamento das abelhas e coletas de amostras para a avaliação do teor protéico das glândulas salivar torácica, glândulas cefálicas e cérebro ocorreram a cada cinco dias até as abelhas completarem 30 dias de idade em NA1, NA2 e NA3. Neste último, no entanto, foram realizadas apenas observações, sem coleta de amostras.

3.5.2 *Apis mellifera ligustica* (Europeia)

As abelhas europeias dos dois núcleos utilizados no experimento de avaliação de plasticidade no apiário do *Apiculture and Social Insect Laboratory, University of Sheffield*, não puderam ser submetidas às mesmas condições das abelhas africanizadas, devido às condições ambientais, pois apesar da montagem do experimento ter sido entre junho e setembro de 2012, as temperaturas variavam de 05 a 20 °C, o que provocou a morte das abelhas quando foi trocado o favo de alimento pelo com cera alveolada. As variações de temperatura também impossibilitaram a utilização de um núcleo de observação.

Para que as aproximadamente 1.000 abelhas tivessem condições de manter uma temperatura mínima necessária para resistir às variações de temperatura no núcleo, foi utilizado quadro contendo mel operculado. No núcleo

européu 1 (NE1), foram colocados três favos, sendo dois com mel e um com cera alveolada, e o núcleo europeu 2 (NE2) foi montado com um favo com mel, um sem alimento e um alimentador interno com solução de água e açúcar na proporção 1:1. (Figura 22).

Figura 22 - Experimento de plasticidade desenvolvido com abelhas europeias: a. núcleo um, composto por 2 quadros contendo mel operculado e cera alveolada ao centro; b. núcleo dois, composto por um quadro contendo mel operculado, ao centro um quadro sem alimento e na lateral o alimentador interno

No NE1, foi colocado um pedaço de favo contendo ovos quando as abelhas completaram 15 dias, e no NE2 as abelhas foram marcadas com tinta atóxica Uniposca® de cor branca antes de serem introduzidas no núcleo, e quando completaram 10 dias de idade elas foram transferidas para uma colmeia normal.

As abelhas de outras colônias pilhavam os núcleos para retirar todo o mel (Figura 23) que estava sendo utilizado para controlar a temperatura das abelhas no núcleo. Para tentar controlar a pilhagem dos núcleos as observações e coletas de amostras de abelhas passaram a ser realizadas às 20 horas. As entradas dos núcleos foram reduzidas (Figura 24) de maneira que dificultasse o acesso de várias abelhas ao mesmo tempo e também foi utilizado apenas um quadro com mel mais o alimentador interno nos núcleos, além de intensificar a alimentação artificial das demais colônias existentes no apiário, colocando alimento a cada dois dias.

Figura 23 - Núcleo de experimento de plasticidade em abelhas europeias após a pilhagem de abelhas de outras colmeias: a. abelhas mortas no núcleo; b. favo com todo o mel saqueado

Figura 24 - Redução do alvado do núcleo para limitar a entrada e facilitar a defesa do núcleo pelas abelhas de mesma idade

A primeira observação do comportamento das abelhas ocorreu 24 horas após a introdução das abelhas no núcleo por um período de cinco minutos. As demais observações e coletas de amostras para a avaliação do teor protéico das

glândulas salivar torácica, glândulas cefálicas e cérebro ocorreram a cada cinco dias até que as abelhas completaram 25 dias de idade em NE1 e NE2. Devido ao problema de pilhagem, todos os dias durante os 25 dias de avaliação dos núcleos foi realizada vistoria para verificar se havia abelhas no entorno do núcleo, o que indicaria o início da atividade de pilhagem.

3.6. Avaliação de enxame zanganeiro em *Apis mellifera* Africanizada

Foi realizado um experimento para avaliar o tempo necessário para que, num enxame órfão, uma operária inicie a postura de ovos, tornando o enxame zanganeiro.

Para a realização do experimento, foram retirados de três núcleos todos os quadros que possuíam crias em estágios de ovos e larvas com até três dias, além das suas rainhas. A retirada dos ovos e larvas com até três dias impede a formação de uma nova rainha, possibilitando o desenvolvimento dos ovários das abelhas operárias que colocarão ovos que originarão zangões.

Cinco dias após a constatação dos ovos nos núcleos (Figura 25), foi colocado um quadro contendo uma grande área de cria operculada e uma pequena área com ovos e larvas (Figura 26) de outros enxames existentes no apiário em um dos núcleos. Avaliou-se também se enxames dos núcleos, mesmo estando zanganeiros e com a presença da operária poedeira, seriam capazes ou não de desenvolver realeira.

Figura 25 - Quadro com posturas nas laterais, ovos múltiplos por célula de cria e postura em célula contendo alimento

Figura 26 - Quadro colocado em núcleos do experimento de avaliação de colônia zanganeira: a. destaque da grande área de cria operculada que o quadro continha; b. pequena área de ovos encontrados no quadro

O experimento teve duração de 30 dias, que começaram a ser computados a partir do momento em que os enxames contidos nos núcleos foram orfanados, com observações a cada cinco dias.

3.7 Avaliação do desenvolvimento das glândulas hipofaríngea e saliva cefálica em *Apis mellifera* Africanizada e Europeia

Para a realização dessa etapa, as glândulas salivar cefálica e hipofaríngea, que haviam sido extraídas conforme descrito no tópico 3.3, foram colocadas sobre lâmina de vidro, acrescidas de 50 µl de PBS e fotografadas utilizando câmera fotográfica e lupa Leica® com aumento de 5.0 vezes. As imagens das glândulas foram enviadas diretamente para o computador acoplado à lupa, que possui o programa Leica Application Suite 3.4.1.® que gera os arquivos necessários para possibilitar a realização da medição da área estudada.

As glândulas salivar cefálica e hipofaríngea de abelhas africanizadas coletadas no período de verão foram fotografadas nas idades recém-emergidas, cinco, 10, 15, 20, 25 e 30 dias.

Foram medidas em milímetro quadrado (mm²) (Figura 27) as áreas de 30 acinos por glândula/abelha tendo cada idade estudada sido composta por um grupo de 10 abelhas.

Figura 27 - Foto tirada com câmera Leica®, acoplada a microscópio estereoscópico com aumento de 5.0x da glândula salivar cefálica

Nas abelhas Europeias, as glândulas salivar cefálica e hipofaríngea foram extraídas conforme descrito no tópico 3.3, colocadas sobre lâmina de vidro, acrescidas de 50 µl de PBS e fotografadas utilizando câmera Canon EOS® acoplada à lupa Leica®. As glândulas foram fotografadas nas idades recém-emergidas, cinco, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade em abelhas que tiveram seu desenvolvimento em colônia normal na primavera, e cinco, 10, 15, 20 e 25 dias de idade em abelhas do núcleo NE1. Foram medidas as áreas de 30 acinos por glândula/abelha e cada idade estudada foi composta por um grupo de 10 abelhas. As medições realizadas em abelhas europeias foram feitas em pixels (x^2) utilizando o *software* Leica Application Suite 3.4.1.® e convertidas posteriormente para milímetro (mm^2), utilizando a equação:

$$\frac{Na}{Nmm}.$$

Onde: Na = ao número de pixels obtido em cada medição; e

Nmm = o número de pixels de uma área de 1 mm^2 , que é igual a 1000.000 pixels.

Para descobrir qual seria a relação entre os tamanhos das cabeças de abelhas africanizadas e europeias (28), foram fotografadas e medidas as áreas de 30 cabeças por subespécie. Para tanto, as cabeças foram separadas do tórax com tesoura cirúrgica, colocadas sobre lâmina de vidro; as cabeças de *A. m. scutellata* foram fotografadas no Brasil com câmera fotográfica acoplada à lupa Leica® e as cabeças de *A. m. ligustica* foram fotografadas na Inglaterra com câmera Canon EOS® acoplada à lupa Leica®, ambas as lupas com aumento de 2.0 vezes. As medições foram executadas utilizando-se o *software* Leica Application Suite 3.4.1.®, sendo em mm^2 em africanizadas e pixels (x^2) convertidos para mm^2 em europeias utilizando a mesma equação que foi usada na conversão das glândulas dessas mesmas abelhas.

Figura 28 - Cabeças de abelhas para a determinação de área, fotografadas com aumento de 2.0x: a. *Apis mellifera* Africanizada; b. *A. m.* Europeia

3.8 Teste de presença de vírus DWV em abelhas Africanizada e Europeia

Para detecção do vírus deformador de asas (DWV), foram realizados testes de PCR em tempo real em amostras de abelhas africanizada e europeia.

Foram coletadas 50 abelhas africanizadas de três diferentes colônias no apiário do Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP), que foram enviadas para o laboratório do *Department of Animal and Plant Sciences, The University of Sheffield*, Inglaterra, onde todas as análises foram realizadas. Em abelhas africanizadas, foi estudada a presença do vírus de maneira geral, uma vez que não existem muitos trabalhos que comprovem a ocorrência de DWV nessas abelhas.

Já em abelhas europeias, foi estudado se o vírus estaria presente nas glândulas salivares, mandibular e hipofaríngea e no cérebro em duas diferentes idades, em abelhas recém-emergidas e com 30 dias de idade. Nestas abelhas, as glândulas foram extraídas como descrito no item 3.3, porém com pinças e tesoura cirúrgica, sendo previamente imersas por um minuto em solução esterilizadora viral Clean Virkon tablets (Rely +On)® da marca Du Pont a cada troca de abelha. As amostras foram compostas por *pool* de 10 de abelhas, subdivididas em corpo, glândula salivar torácica, salivar cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro, que foram colocados em microtubos de 1,5 mL sem a adição de PBS.

As abelhas africanizadas foram separadas em grupos de 30 indivíduos por colônia, transferidos para cadinhos de porcelana, adicionando-se nitrogênio

líquido para a maceração utilizando pistilo, sendo em seguida pesados ± 30 mg do macerado resultante.

As glândulas, cérebros e corpos de abelhas europeias foram macerados diretamente nos respectivos microtubos, que foram presos com pinça, introduzidos no nitrogênio líquido e macerados com micropistilo.

A extração do ácido ribonucléico (RNA) e a síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) das amostras foram realizadas de acordo com os protocolos desenvolvidos por Saiki et al. (1985) Mullis et al. (1987), Doyle e Mark (1989) e patenteados pela Qiagen® Sample & Assay Technologies.

A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o mini kit RNeasy (Qiagen®) de acordo com o protocolo do fabricante, exceto que as amostras foram eluídas em 40 μ l de água livre de ribonuclease (RNase). Um micrograma de RNA isolado foi tratado com a enzima que tem a capacidade de digerir DNA genômico, DNase I (Promega®), seguido por quantificação em espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific®), para padronização da quantidade de RNA total em 25 ng/ μ l, antes do armazenamento a -80 °C.

A síntese do cDNA foi realizada por transcrição reversa utilizando o kit Omniscript (Qiagen®) com as amplificações feitas em termociclador StepOne (Applied Biosystems®), em triplicata para cada amostra, sendo que em cada uma foram adicionados os *primes*: Actin_F1 e Actin_R1, eIF1-alpha-f e eIF1-alpha-r e DWVQ_F1 e DWVQ_R1, na realização da amplificação do vírus deformador de asas de abelha (DWV). Para o controle negativo foi utilizada água livre de RNase.

O ciclo inicial de amplificação da amostra teve duração de 10 minutos a 95 °C, seguido de outro ciclo de 15 segundos a 95 °C e 30 ciclos com duração de um minuto a 60 °C. E em seguida foi iniciado um ciclo para a construção das curvas de dissociação, no qual a temperatura se eleva entre 60 °C a 95 °C.

Na amplificação foram utilizados os seguintes *primes*:

Actin_F1	CCTGGAATCGCAGATAGAATGC
Actin_R1	AAGAATTGACCCACCAATCCATAC
eIF1-alpha-f	GGAGATGCTGCCATCGTTAT
eIF1-alpha-r	CAGCAGCGTCCTTGAAAGTT
DWVQ_F1	TAGTGCTGGTTTTCTTTGTC
DWVQ_R1	CTGTGTCGTTGATAATTGAATCTC

3.9 Estudo da morfologia das glândulas e cérebro de abelhas com os sintomas do DWV

As abelhas *A. mellifera ligustica* que apresentavam os sintomas do vírus deformador das asas (DWV) foram separadas após a emergência, para avaliações morfológicas, quantificação de proteínas totais das glândulas salivar cefálica e torácica, hipofaríngea, mandibular e cérebro.

As extrações das glândulas e cérebros foram realizadas de acordo com o item 3.3 e a quantificação de proteínas totais pelo método Bradford (1976) conforme o item 3.4.

As abelhas, glândulas salivares, hipofaríngea, mandibular e cérebro foram fotografadas usando câmera Canon EOS® acoplada à lupa Leica®, com os aumentos utilizados de 1.0x para a abelha, 2.5x para o cérebro e 5.0x para as glândulas. As medições da área das glândulas estudadas em pixels (x^2) foram executadas utilizando o *software* Leica Application Suite 3.4.1.®, com os valores resultantes sendo convertidos posteriormente para milímetros.

Foi também realizada avaliação descritiva das abelhas, descrevendo as anomalias que foram observadas durante a realização das extrações.

3.10 Análise estatística

Os experimentos foram montados em um delineamento inteiramente casualizado num esquema fatorial, sendo cada amostra formada por um *pool* de 10 abelhas da mesma idade, subdivididas em cérebro e glândulas salivar torácica, salivar cefálica, mandibular e hipofaríngea, com as leituras espectrofotométricas realizadas em três repetições.

Para as abelhas africanizadas, o arranjo fatorial foi 3 x 7, ou seja, 21 tratamentos. Os tratamentos constituíram-se de dos níveis dos fatores Estações (outono, inverno e verão) e Idade (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias). Para as abelhas europeias, utilizou-se um arranjo fatorial com 2 níveis do fator Estações (primavera e verão) e 7 níveis do fator Idade.

Os experimentos com abelhas Africanizadas da mesma idade foram realizados no arranjo fatorial 3 x 6, com dois núcleos (NA1 e NA2) mais a Estação

verão em 6 diferentes Idades (5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias). Em núcleo de abelhas européias o arranjo fatorial foi 3 x 5 com dois núcleos (NE1 e NE2) mais a Estação primavera.

Nas medições das glândulas hipofaríngea e salivar cefálica, aplicou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Foram verificados os pressupostos da Análise da Variância (ANOVA) por meio da família de transformação ótima de Box-Cox (1964) e o teste de Hartley (1950) foi aplicado para verificar a homogeneidade de variâncias. Após a ANOVA, foi aplicado o teste F ($p < 0,05$) para verificar possíveis diferenças entre os níveis dos fatores e a interação, que, quando presentes, foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$), seguido de análise de regressão linear.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS (*Statistical Analysis System*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do desenvolvimento cerebral e glandular em abelhas *Apis mellifera*

4.1.1 *Apis mellifera scutellata* (Africanizada)

As abelhas Africanizadas apresentaram diferentes resultados nos teores de proteínas, de acordo com as estações e estruturas estudadas que foram estatisticamente significativos, quando comparados entre si nas diferentes idades e entre as estruturas na mesma estação (Tabela 2).

Tabela 2 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Africanizadas de 00 (3), 05, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade em diferentes estações do ano

(continua)

Idade (dias)	Parte estudada											
	Cérebro						Hipofaríngea					
	Inverno(4)	DP(5)	Primavera	DP	Verão	DP	Inverno	DP	Primavera	DP	Verão	DP
00	14,94 c D	±0,36	43,31 d A	±0,00	21,62 e B	±0,37	6,01 c F	±0,15	3,10 g H	±0,00	9,08 d E	±0,39
05	15,82 c G	±0,36	72,77 b A	±0,27	24,70 d E	±0,22	18,44 a F	±0,10	51,89 c B	±0,16	12,77 c H	±0,41
10	20,80 b E	±0,43	70,41 b A	±0,00	30,81 c B	±0,33	18,30 a F	±0,22	60,46 b B	±0,83	22,84 a E	±1,45
15	15,79 c F	±0,24	81,69 a A	±0,45	42,71 a C	±2,04	16,98 ab E	±0,18	65,61 a B	±1,20	18,50 b E	±0,00
20	17,73 c D	±0,13	70,20 b A	±1,09	29,20 c B	±1,72	17,30 a D	±0,49	22,98 e C	±0,00	12,53 c E	±0,27
25	49,41 a B	±0,37	55,87 c A	±2,63	35,72 b C	±1,11	14,54 b F	±0,96	32,16 d D	±0,47	12,32 c H	±0,90
30	19,99 b C	±0,24	78,61 a A	±2,39	21,87 e B	±0,44	15,22 b D	±0,11	13,45 f E	±0,48	11,07 c F	±0,24

Idade (dias)	Parte estudada											
	Mandibular						Salivar Cefálica					
	Inverno	DP	Primavera	DP	Verão	DP	Inverno	DP	Primavera	DP	Verão	DP
RE	3,62 ab H	±0,33	16,33 c C	±1,14	5,08 bc G	±0,35	0,06 d L	±0,02	1,99 e I	±0,14	1,35 cd J	±0,13
05	2,82 b M	±0,47	36,99 a C	±0,87	4,74 c L	±0,45	0,04 d O	±0,00	7,20 d J	±0,13	1,02 d N	±0,20
10	2,52 b I	±0,07	19,85 b EF	±0,41	5,14 bc I	±0,19	0,01 d M	±0,00	9,13 c H	±0,19	1,66 c L	±0,25
15	0,08 d J	±0,08	15,00 c F	±0,87	6,13 b H	±0,60	0,01 d L	±0,00	16,12 a EF	±0,26	3,43 b I	±0,22
20	0,98 c H	±0,27	11,72 d E	±0,00	4,98 bc G	±0,16	0,30 c I	±0,11	8,93 c F	±0,82	7,11 a FG	±0,15
25	3,77 a L	±0,17	12,62 d GH	±0,49	8,06 a I	±0,07	2,55 b M	±0,23	13,42 b G	±0,90	5,87 a J	±0,13
30	4,55 a HI	±0,18	19,08 b C	±0,00	4,98 bc H	±0,32	5,01 a H	±0,21	15,73 a D	±0,76	4,04 b I	±0,11

Tabela 2 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Africanizadas de 00 (3), 05, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade em diferentes estações do ano

(conclusão)

Idade (dias)	Parte estudada					
	Salivar Torácica					
	Inverno	DP	Primavera	DP	Verão	DP
RE	3,64 c H	±0,72	16,48 e C	±0,00	6,30 c F	±0,24
05	8,76 a I	±0,27	25,45 c D	±0,46	12,60 b H	±0,67
10	4,05 c I	±0,03	46,61 a C	±0,73	14,86 a G	±0,68
15	5,01 bc H	±0,32	31,58 b D	±0,16	13,70 ab I	±0,29
20	4,97 bc G	±0,49	27,42 c B	±0,56	14,84 a E	±0,32
25	5,19 b I	±0,32	20,82 d E	±0,27	13,21 ab G	±0,22
30	6,13 b G	±0,21	20,55 d B	±0,26	11,87 b E	±0,38

(1) Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

(2) Teores de proteínas em micrograma de proteína por glândula ($\mu\text{P/g}$)

(3) A idade zero se refere a abelhas recém-emergidas

(4) Estações do ano

(5) Desvio padrão

Na primavera, as glândulas e cérebro das abelhas tiveram maiores teores de proteínas que nas demais estações. Enquanto no inverno as abelhas apresentaram os menores teores.

As estruturas apresentaram alternância de teores de proteínas nas mesmas idades estudadas, podendo ser observadas similaridades entre os perfis dos teores proteicos nas mesmas idades em diferentes estações (Figura 29).

Figura 29 - Resultados médios de proteínas totais em ordem decrescente, nas estruturas estudadas nas diferentes idades e estações do ano em abelha Africanizada

Em abelhas recém-emergidas, o perfil proteico das estruturas estudadas foi similar nas estações inverno e primavera, diferindo do verão, em que a glândula salivar torácica teve maiores teores de proteínas que a hipofaríngea e mandibular.

Aos cinco dias de idade das abelhas, as estruturas estudadas nas estações inverno e verão apresentaram maiores similaridades, no entanto, no inverno, a glândula hipofaríngea teve mais destaque que o cérebro. Já a

glândula mandibular apresentou perfis de teores de proteínas semelhantes na primavera e verão. A alternância das glândulas pode indicar que no inverno a hipofaríngea é a maior responsável pela produção de geleia real, o que não ocorre nas demais estações, quando as glândulas hipofaríngea e mandibular são mais próximas.

A total similaridade entre as estruturas estudadas nas diferentes estações ocorreu unicamente aos 10 dias de idade dos insetos.

Aos 15 dias de idade, apenas a glândula salivar torácica foi similar nas diferentes estações. Nas idades de 20, 25 e 30 dias, apenas o cérebro apresentou os maiores teores de proteínas nas três estações do ano.

A glândula salivar cefálica apresentou comportamento de perfil de proteínas similar entre as estações nas abelhas recém-emergidas, com 5 e 10 dias de idade, estando sempre entre os menores teores de proteínas. Em abelhas com 15 dias, na primavera, a glândula salivar cefálica apresenta maior teor de proteína que a glândula mandibular. Essas similaridades são observadas nas outras estações, porém em abelhas com 20 dias no verão e somente nos indivíduos com 30 dias no inverno.

O cérebro das abelhas apresentou maior quantidade de proteínas entre todas as estruturas estudadas, quando foram comparadas as mesmas idades dentro das diferentes estações do ano, e em todas as idades os maiores teores foram na primavera.

Essa estrutura apresentou alternância de teores na mesma idade nas diferentes estações e, aos 25 dias de idade das operárias, os teores das três estações foram sequenciais.

Quando comparadas as diferentes idades por estação, observa-se uma alternância de picos no cérebro, que pode indicar maior atividade celular. Em todas as estações, para a idade recém-emergida, ocorrem os menores teores de proteínas.

No inverno, o maior teor de proteínas ocorreu quando as abelhas tinham 25 dias de idade, no entanto, em recém-emergida e aos 5 dias não se observam diferenças. Aos 10 dias, ocorre uma elevação nos teores de proteínas, que decrescem aos 15 dias, voltando a subir aos 20 e 25 dias e caindo novamente aos 30 dias.

Na primavera, diferentemente do inverno, as abelhas apresentam aumento do teor de proteínas dos 5 aos 15 dias de idade, decrescendo aos 20 e 25 dias e novamente subindo aos 30 dias. Os picos proteicos nessa estação coincidem com a atividade de forrageio desenvolvida pelas operárias e podem ser explicados pela quantidade de informações que as abelhas precisam processar para desenvolver essa atividade. No verão, semelhante à primavera, o aumento do teor de proteína começa aos 5 dias, com pico aos 15 dias, quando decresce.

Já a glândula hipofaríngea foi a segunda estrutura com maiores teores de proteínas, quando comparada com as demais, nas diferentes estações dentro das mesmas idades, tendo a primavera como a estação em que ocorreram os maiores teores de proteínas, diferindo das demais estações, em que os resultados foram bem inferiores e mais semelhantes entre si.

Essa glândula também apresentou um comportamento diferenciado de teores de proteínas, quando comparadas as diferentes idades dentro da mesma estação. Todos os picos nas três estações estudadas coincidiram com a fase nutriz das operárias, com baixos valores em abelhas recém-emergidas, no entanto, no inverno, as abelhas mantiveram valores de proteínas que não diferiram entre si estaticamente dos 5 aos 20 dias de idade, o que pode indicar um prolongamento da atividade nutriz nessa estação. Houve uma pequena queda dos teores e níveis de proteínas mais estáveis aos 25 e 30 dias de idade, sem grandes alternâncias entre as idades estudadas.

Na primavera, os valores de proteínas apresentaram uma ordem crescente até atingir o maior teor proteico aos 15 dias de idade das operárias, alternando os teores aos 20, 25 e 30 dias de idade. No verão, essa glândula apresentou o maior valor de proteínas totais no décimo dia de idade das abelhas, o segundo maior valor aos 15 dias, e, aos 20, 25 e 30 dias de idade, não apresentou teores de proteínas diferentes entre si. Os menores períodos dos picos de proteínas nestas estações podem indicar um menor tempo em que a operária desempenha a atividade nutriz, devido à maior quantidade de abelhas no enxame ou maior disponibilidade de pasto apícola, o que poderia antecipar a atividade de forrageio.

A glândula mandibular apresentou maiores picos na estação primavera, seguidos de verão e inverno. Essa glândula parece funcionar como

uma complementação dos produtos da glândula hipofaríngea no período em que a operária desempenha a atividade nutriz, uma vez que seus maiores teores proteicos precedem os da hipofaríngea na primavera e inverno. Porém, os produtos secretados por essa glândula podem ser importantes para as operárias durante o desenvolvimento da atividade de forrageio, uma vez que, em amostras de abelhas, no inverno, os maiores teores proteicos foram aos 25 e 30 dias e, na primavera, foi observada elevação dos valores de proteínas em abelhas com 30 dias de idade.

Porém, dentre as três estações estudadas, apenas no inverno foi possível ajustar os resultados da glândula mandibular para um modelo de regressão quadrática (Figura 30), devido ao comportamento mais homogêneo da glândula nessa estação. A idade afetou o conteúdo das proteínas obtidas ($p < 0,05$) nas glândulas, havendo decréscimo de 0,4063 a cada idade até os 15 dias, crescendo 0,0143 nas idades seguintes. O desenvolvimento da glândula mandibular ocorre nos primeiros dias de vida nessa estação, pois os teores de proteínas são mais altos em abelhas recém-emergidas, diminuindo nas idades de 5, 10 e 15 dias e voltando a se elevar a partir do vigésimo dia de idade das abelhas.

Figura 30 - Regressão quadrática do conteúdo de proteínas totais da glândula mandibular em diferentes idades de abelhas Africanizadas no inverno

A glândula salivar cefálica apresenta relação com a atividade de forrageio em todas as estações estudadas, pois os maiores resultados de proteínas foram observados aos 30 dias de idade das operárias no inverno, aos 15 e 30 dias de idade na primavera e aos 25 e 30 dias de idade das abelhas no verão. O pico aos 15 dias de idade das operárias na primavera pode indicar que nessa estação as abelhas iniciam a atividade de forrageio mais cedo que nas demais. No entanto, os resultados de proteínas obtidos dessa glândula nas estações primavera e verão não se enquadraram em nenhum modelo de regressão, provavelmente devido aos teores proteicos apresentarem mais de um pico em diferentes idades. No inverno, os teores de proteínas totais nas diferentes idades das abelhas apresentaram ascendência gradativa com o aumento da idade, e puderam ser avaliados pela regressão quadrática (Figura 31). A glândula salivar cefálica apresentou decrescimento no teor de proteínas no inverno nas idades iniciais e iniciou o aumento do conteúdo proteico a partir do vigésimo dia de idade das abelhas, mostrando que a idade influenciou o desenvolvimento da glândula ($p < 0,05$).

Figura 31 - Regressão quadrática do conteúdo de proteínas totais da glândula salivar cefálica em diferentes idades de abelhas Africanizadas no inverno

Já a glândula salivar torácica apresenta relação com as idades iniciais nas estações estudadas, provavelmente atuando para o desempenho de atividades no interior da colônia. No inverno, o maior teor de proteína nessa

glândula foi observado entre abelhas com cinco dias de idade, na primavera, aos 10 dias, e no verão provavelmente ocorreu um prolongamento da necessidade dos produtos secretados por essa glândula, uma vez que os maiores teores de proteínas foram encontrados nas operárias a partir dos 10 até os 25 dias de idade das abelhas, sendo a única estação em que os resultados de proteínas obtidos puderam se enquadrar em um modelo de regressão (Figura 32). A influência das idades sobre os teores de proteínas nesta estação foi significativa estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 32 - Regressão quadrática do conteúdo de proteínas totais da glândula salivar torácica em diferentes idades de abelhas Africanizadas no verão

4.1.1.1 Desenvolvimento das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea ao longo da fase adulta das abelhas Africanizadas

Os resultados encontrados nas medições de área dos acinos foram significativos estatisticamente quando comparados entre as glândulas nas diferentes idades e entre as diferentes idades na mesma glândula (Tabela 3).

Tabela 3 - Média (1) da área (2) dos acinos de glândulas salivar torácica e hipofaríngea em abelhas Africanizadas de 00 (3), 05, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade

Idade (Dias)	Parte Estudada	
	Salivar Cefálica	Hipofaríngea
00	0,0133 d A	0,0080 d B
05	0,0157 cd B	0,0194 ab A
10	0,0204 bcd A	0,0226 a A
15	0,0218 bc A	0,0196 ab A
20	0,0344 a A	0,0129 cd B
25	0,0337 a A	0,0145 bc B
30	0,0261 b A	0,0099 cd B

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

⁽²⁾ Área dos acinos glandulares em milímetro quadrado (mm^2)

⁽³⁾ A idade zero se refere às abelhas recém-emergidas

As glândulas salivar cefálica e hipofaríngea apresentam uma alternância no tamanho, provavelmente devido à proximidade das suas localizações na cabeça das abelhas. Enquanto a hipofaríngea fica enovelada no cérebro, a salivar cefálica fica na parte posterior do cérebro. Aparentemente, uma influencia no tamanho da outra, pois quando os acinos da glândula hipofaríngea são maiores, os da salivar cefálica são menores e vice-versa.

A glândula hipofaríngea em abelhas recém-nascidas apresenta menor área de acinos, devido ao início da fase adulta das abelhas. O desenvolvimento dos acinos ocorre nas idades de 5, 10 e 15 dias, diminuindo aos 20, 25 e 30 dias de idade das operárias.

Existe uma relação entre o tamanho dos acinos e o conteúdo de proteínas totais encontrados nesta glândula (Figura 33), pois as maiores áreas ocorrem na mesma idade em que foram encontrados os resultados mais significativos de proteínas totais.

Figura 33 - Comparação entre as médias da área de acinos e conteúdo de proteínas totais em glândula hipofaríngea de abelhas Africanizadas com diferentes idades

A glândula salivar cefálica apresenta menores áreas dos acinos nas idades iniciais das operárias. Os acinos vão se desenvolvendo gradativamente até os 20 dias de idade das abelhas, momento em que se encontram mais desenvolvidos, mantendo o tamanho aos 25 dias e começando a apresentar redução da área das unidades secretoras aos 30 dias. A área dos acinos nesta glândula, semelhantemente à hipofaríngea, também apresenta relação com o resultado dos teores de proteína encontrados (Figura 34), mostrando que ocorre um aumento de atividade dessa glândula quando as abelhas iniciam as atividades externas à colônia.

Figura 34 - Comparação entre as médias da área de acinos e conteúdo de proteínas totais em glândula salivar cefálica de abelhas Africanizadas com diferentes idades

4.1.2 *Apis mellifera ligustica* (Europeia)

Em abelhas Europeias também ocorreram diferentes resultados nos teores de proteínas nas duas estações e estruturas estudadas, sendo estatisticamente significativos quando comparados entre si nas diferentes idades e entre as estruturas na mesma estação (Tabela 4).

Tabela 4 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Europeias 00 (3), 05, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade na primavera e verão

(continua)

Idade (dias)	Parte Estudada							
	Cérebro				Hipofaríngea			
	Primavera	(4)DP	Verão	DP	Primavera	DP	Verão	DP
00	40,71 g B	±1,92	64,70 d A	±0,69	15,28 f G	±1,40	35,77 e C	±0,45
05	84,11 b B	±4,01	77,31 c C	±1,43	74,07 c D	±0,53	108,96 a A	±1,11
10	69,26 f D	±3,59	99,64 a C	±0,66	132,15 a A	±3,19	110,77 a B	±1,24
15	76,12 d C	±0,46	81,95 b B	±2,00	60,81 d E	±1,20	89,80 c A	±1,10
20	73,25 e D	±3,02	101,31 a A	±2,36	85,86 b B	±1,99	83,87 d C	±2,95
25	85,21 a B	±4,15	75,96 c C	±1,34	58,15 e D	±2,68	90,25 c A	±1,45
30	82,31 c B	±3,56	80,59 b C	±1,31	60,05 d D	±2,36	103,69 b A	±0,27

Idade (dias)	Parte Estudada							
	Mandibular				Salivar Cefálica			
	Primavera	DP	Verão	DP	Primavera	DP	Verão	DP
RE	16,75 d F	±0,81	34,71 a D	±0,80	5,92 e H	±0,60	3,10 g I	±0,57
05	21,12 a H	±0,24	22,10 b G	±0,17	11,80 d J	±0,57	13,70 e I	±0,18
10	19,86 b G	±0,32	15,80 c I	±0,20	11,57 d J	±0,09	18,14 d H	±0,80
15	17,99 c J	±0,24	12,98 d H	±0,49	13,14 c I	±0,35	26,67 b F	±0,54
20	9,14 e J	±0,38	21,72 b G	±0,82	13,65 c I	±0,23	30,04 a E	±0,43
25	6,81 f J	±0,64	9,24 e I	±1,26	17,63 b H	±0,80	26,31 c F	±1,77
30	7,64 g J	±0,88	12,34 d H	±0,71	20,84 a G	±1,22	11,22 f I	±0,08

Tabela 4 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Europeias 00 (3), 05, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade na primavera e verão

(conclusão)

Idade (dias)	Parte Estudada			
	Salivar Torácica			
	Primavera	DP	Verão	DP
RE	15,42 f G	±1,17	20,94 g E	±0,29
05	23,84 c F	±1,56	30,23 e E	±0,07
10	30,00 a F	±0,23	38,36 b E	±0,56
15	22,49 d G	±1,35	63,43 a D	±0,98
20	20,04 e H	±1,20	27,36 f E	±0,51
25	24,43 c G	±1,54	33,32 c E	±0,40
30	25,09 b F	±0,36	31,75 d E	±0,18

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

⁽²⁾ Teores de proteínas em micrograma de proteína por glândula ($\mu\text{P/g}$)

⁽³⁾ Zero se refere à idade recém-emergida

⁽⁴⁾ Desvio padrão (DP)

O cérebro e a glândula hipofaríngea foram as estruturas estudadas em que se observaram os maiores teores de proteínas totais nas diferentes estações e idades. Os resultados obtidos no cérebro e glândulas estudadas durante a primavera e verão foram distintos, apresentando no verão os teores de proteínas superiores em todas as estruturas.

As abelhas apresentaram diferenças e similaridades no perfil proteico das estruturas estudadas na primavera e verão (Figura 35).

Figura 35 - Resultados médios das proteínas totais em ordem decrescente, nas estruturas estudadas nas diferentes idades na primavera e no verão em abelha Europeia

Em abelhas recém-emergidas, o cérebro foi a estrutura com maior teor de proteína e a glândula salivar cefálica a última nas duas estações; as demais glândulas não apresentaram similaridade nessa idade nas estações estudadas. A glândula hipofaríngea já inicia o seu desenvolvimento nas abelhas recém-emergidas no verão, sendo a estrutura com maior teor proteico nessa estação, diferentemente

do que pode ser observado na primavera, onde o cérebro apresentou maior teor proteico que a hipofaríngea.

Aos 10 dias, a glândula hipofaríngea assume a primeira posição, seguida do cérebro e da glândula salivar cefálica em ambas as estações, no entanto, somente a salivar torácica foi similar nas duas estações aos 15 dias de idade das abelhas. Aos 20 e 25 dias, as glândulas salivar torácica, salivar cefálica e mandibular apresentaram colocação semelhante na primavera e no verão, porém, quando foi comparada a similaridade das estruturas em abelhas com 30 dias de idade, apenas a glândula salivar torácica foi semelhante nas duas estações estudadas.

A primavera é o momento em que as abelhas Europeias iniciam as suas atividades fora da colônia, depois de passar todo o inverno sem realizar voos ou atividades externas devido ao frio. Nesse momento, os recursos alimentares disponíveis são limitados, o que pode explicar a diferenciação dos resultados obtidos. Aparentemente, o desenvolvimento das estruturas estudadas é mais rápido no verão, o que pode ser uma estratégia da abelha para aproveitar mais rapidamente os recursos disponíveis no ambiente e acelerar o desenvolvimento da colônia. No verão, os resultados proteicos do cérebro das abelhas apresentaram menores diferenciações e os valores mais baixos de conteúdo proteico foram obtidos em abelhas recém-emergidas. Aos cinco dias de idade, essa estrutura inicia o aumento dos teores de proteínas, atingindo o primeiro pico proteico aos 10 dias de idade, que decresce aos 15 dias, atingindo o segundo maior teor de proteínas aos 20 dias de idade das operárias, e teores menores nas idades subsequentes.

A glândula hipofaríngea apresentou comportamento semelhante ao obtidos no cérebro, com significativas diferenças de acordo com o envelhecimento das abelhas nas duas estações estudadas e o maior conteúdo de proteínas totais na primavera.

Na primavera, as abelhas apresentaram aos 10 dias os maiores valores de proteínas na hipofaríngea, indicando que estão desenvolvendo a atividade nutriz na colônia. Dos 15 aos 30 dias de idade, os valores oscilam entre pequenos aumentos e diminuições.

No verão, foram observados os maiores teores de proteínas em abelhas de 5 e 10 dias, que não diferiram estatisticamente entre si, indicando que provavelmente nessa estação a atividade nutriz desenvolvida pelas operárias é

iniciada mais cedo e se prolonga mais que na primavera. Aos 15 e 20 dias, ocorreu redução dos teores de proteínas, que voltaram a se elevar aos 25 e 30 dias.

Apesar de o verão ter apresentado duas idades com maiores picos, os resultados são inferiores aos obtidos no maior pico da glândula na primavera. Além disso, enquanto os teores de proteína são quase cinco vezes maiores no intervalo entre a recém-emergida e os cinco dias de idade nesta estação, no verão os valores triplicam. Provavelmente devido à necessidade de mais operárias para a manutenção da colônia, no verão as abelhas apresentariam a glândula hipofaríngea com mudanças mais rápidas que na primavera, quando as condições ambientais podem não favorecer o crescimento do enxame no primeiro mês.

Os resultados obtidos na glândula mandibular também apresentaram comportamento diferenciado de acordo com as estações. Na primavera, o maior teor de proteínas foi observado em abelhas com cinco dias, e no verão em abelhas recém-emergidas. Em ambas as estações, os teores de proteínas foram mais homogêneos e puderam ser avaliados pela regressão linear (Figuras 36 e 37), que foi decrescente em ambas as estações, pois o teor de proteína foi maior nas idades iniciais das abelhas. Sendo assim, a idade influenciou negativamente os resultados de proteínas nessa glândula na primavera ($p < 0,05$) e no verão ($p > 0,05$). Em ambas as estações, abelhas com 25 dias de idade apresentaram os menores teores proteicos. Os resultados mostram que essa glândula é mais ativa nas idades iniciais das operárias adultas, quando desenvolvem atividade nutriz, no interior da colônia.

Figura 36 - Regressão linear do conteúdo de proteínas totais da glândula mandibular em diferentes idades de abelhas Europeias na primavera

Figura 37 - Regressão linear do conteúdo de proteínas totais da glândula mandibular em diferentes idades de abelhas Europeias no verão

A glândula salivar cefálica apresentou diferente comportamento nas estações estudadas, em relação aos teores de proteínas. Na primavera, os teores das proteínas totais obtidos dessa glândula tiveram crescimento significativamente progressivo ao longo das idades estudadas, com o resultado mais baixo encontrado em abelhas recém-emergidas e os mais altos em operárias com 30 dias de idade. O comportamento homogêneo foi enquadrado no modelo de regressão linear (Figura

38), através do qual pode ser observado que a idade influenciou positivamente os teores de proteínas ($p>0,05$).

Figura 38 - Regressão linear do conteúdo de proteínas totais da glândula salivar cefálica em diferentes idades de abelhas Europeias no verão

No verão, os teores de proteínas na glândula salivar cefálica foram menos homogêneos, com mais diferenças significativas estatisticamente que na primavera. Os menores teores de proteínas foram obtidos em abelhas recém-emergidas, seguidas das com 30 dias, e o maior, aos 20 dias de idade das operárias. O comportamento diferenciado dos resultados obtidos no verão foi avaliado pelo modelo de regressão quadrática (Figura 39), pois, ao contrário dos teores encontrados na primavera que tiveram crescimento linear, no verão os teores proteicos formam uma curva de crescimento na qual as diferentes idades influenciam positivamente o crescimento dos teores de proteínas ($p>0,05$) até o vigésimo dia de idades das abelhas e negativamente a partir do vigésimo quinto dia.

Figura 39 - Regressão quadrática do conteúdo de proteínas totais da glândula salivar cefálica em diferentes idades de abelhas Europeias no verão

O conteúdo proteico nas glândulas salivar torácica apresentou significativas alternâncias nas idades e estações estudadas. Os menores valores, tanto na primavera quanto no verão, foram obtidos em abelhas recém-emergidas e os maiores, aos 10 dias de idade das operárias na primavera e aos 15 dias no verão. O comportamento irregular dos resultados não permitiu a avaliação por nenhum modelo de regressão poligonal.

4.1.2.1 Desenvolvimento das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea ao longo da fase adulta das abelhas Europeias

As duas glândulas estudadas apresentam uma forte relação entre a área dos acinos, a qual na glândula salivar cefálica é maior em abelhas recém-emergidas que os acinos da hipofaríngea, provavelmente devido ao início do desenvolvimento dessa última glândula, pois aos 5, 10 e 15 dias de idade da abelha os acinos da glândula hipofaríngea são maiores que os da salivar cefálica. Somente quando as abelhas estavam com 20 dias de idade, a glândula salivar cefálica voltou a ser novamente maior que a hipofaríngea. Aos 25 dias após a emergência das operárias os acinos da hipofaríngea novamente foram maiores que os da salivar cefálica, e aos 30 dias de idade as glândulas não apresentaram diferença estatística entre o tamanho dos acinos (Tabela 05).

Tabela 5 - Média (1) da área (2) dos acinos de glândulas salivar cefálica e hipofaríngea em abelhas Europeias de 00 (3), 05, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade

Idade (Dias)	Parte Estudada	
	Salivar Cefálica	Hipofaríngea
00	0,0435 c A	0,0216 c B
05	0,0493 c B	0,0668 b A
10	0,0582 bc B	0,0770 ab A
15	0,0628 abc B	0,0807 ab A
20	0,0795 a A	0,0827 a B
25	0,0699 ab B	0,0850 a A
30	0,0753 a A	0,0883 a A

(1) Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

(2) Área dos acinos glandulares em milímetro quadrado (mm^2)

(3) A idade zero se refere a abelhas recém-emergida

Quando as glândulas são analisadas individualmente é possível, observar o seu desenvolvimento ao longo das idades estudadas.

A glândula salivar cefálica não apresentou diferenças estatísticas entre as áreas dos acinos em abelhas recém-emergidas e com cinco dias de idade. Aos 10 e 15 dias, um pequeno crescimento pode ser observado, tendo os acinos atingido seu tamanho máximo aos 20 dias de idade das operárias, e possuindo área similar aos 25 e 30 dias. O crescimento dos acinos da glândula salivar cefálica é gradativo e muito pequeno quando comparado com os da glândula hipofaríngea.

A maior área dos acinos na glândula salivar cefálica, que ocorreu aos 20 dias de idade das abelhas, coincide com o período em que foi observado o maior teor de proteínas na primavera (Figura 40).

Figura 40 - Comparação entre as médias da área de acinos e conteúdo de proteínas totais em glândula salivar cefálica de abelhas Europeias com diferentes idades

Os acinos da glândula hipofaríngea possuem um crescimento homogêneo, sendo menores em abelhas recém-emergidas e iniciando a expansão da área aos cinco dias. Aos 10 e 15 dias, os acinos são maiores, mas não diferem estatisticamente da área dos acinos encontrados em abelhas com 20, 25 e 30 dias.

O aumento da área dos acinos da hipofaríngea aos 10 dias após a emergência da operária coincide com o pico de teor proteico obtido dessa glândula durante a primavera (Figura 41). Embora os acinos não apresentassem variação na área, os teores de proteínas obtidos nessa glândula foram mais baixos após os 10 dias de idade das abelhas.

Figura 41 - Comparação entre as médias da área de acinos e conteúdo de proteínas totais em glândula hipofaríngea de abelhas Europeias com diferentes idades

4.1.3 Africanizada x Europeia

As duas subespécies de abelhas apresentaram resultados diferentes; os valores de proteínas obtidos em abelhas Europeias foram superiores aos encontrados em Africanizadas. Essa diferenciação dos teores proteicos pode ser devida à diferença de tamanho das abelhas, pois a abelha Africanizada é menor que a Europeia.

Os teores de proteínas também sofreram influência das condições ambientais, podendo as mudanças climáticas afetar as abelhas em vários diferentes níveis. O clima pode ter uma influência direta sobre o comportamento e fisiologia da abelha, e/ou pode alterar a qualidade do ambiente, reduzindo ou aumentando a flora de uma região, afetando consequentemente a capacidade de colheita e o desenvolvimento das colônias (CONTE; NAVAJAS, 2008).

Em abelhas Africanizadas, os maiores valores de proteínas nas estruturas estudadas foram obtidos na primavera, e outro fator que contribuiu para a obtenção desses resultados foi o tamanho do enxame em que as abelhas se encontravam, pois no inverno e primavera foram utilizados núcleos e no verão uma colméia normal. Evidenciando que o tamanho da população das abelhas num enxame contribui para a melhor nutrição das abelhas. Além disso, as colônias com

poucas operárias tendem a antecipar o amadurecimento glandular, variando assim o ritmo de desenvolvimento dos enxames (CRUZ-LANDIM, 2008).

Nas abelhas Europeias, os maiores resultados foram obtidos no verão. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os enxames de *Apis mellifera* Europeias reduzirem suas populações no inverno (FARRAR, 1963), reiniciando o crescimento lentamente a partir da metade do inverno (SEELEY; VISSCHER, 1985) e aumentando o tamanho do enxame mais rapidamente no verão (WRAY; MATTILA; SEELEY, 2011). Isso justificaria os teores proteicos das estruturas estudadas serem maiores nas abelhas nessa estação climática. Já as abelhas Africanizadas não são muito tolerantes a baixas temperaturas (SOUTHWICK; ROUBIK; WILLIAMS, 1990), o que pode ter causado os menores teores de proteínas encontrados no inverno para estas abelhas.

Assim, o aumento ou diminuição dos teores de proteínas nas glândulas e no cérebro das abelhas estudadas também pode estar relacionado ao balanço nutricional dos enxames, pois toda fonte de proteínas obtidas pela colônia é derivada de pólen vegetal (OTIS et al., 2004) e a variedade de fontes polínicas coletadas pelas forrageias é um reflexo direto da disponibilidade de pólen no meio ambiente e não um inerente traço comportamental da colônia (WRAY; MATTILA; SEELEY, 2011).

Em abelhas Africanizadas, foi observado que os picos de proteínas ocorreram aos 25 dias de idade das abelhas no inverno, e aos 15 dias de idade das operárias na primavera e verão. Essas idades correspondem ao período em que as abelhas desenvolvem ou estão iniciando as atividades externas à colônia. As abelhas Europeias apresentaram os maiores resultados de proteínas no cérebro em períodos semelhantes aos observados em Africanizadas, aos 25 dias de idade na primavera e aos 10 e 20 dias de idade desses insetos no verão.

O aumento ou diminuição do teor proteico observado nos cérebros das abelhas pode estar associado a uma variação do volume dessa estrutura. Essa variação do volume cerebral em abelhas é devida às mudanças que ocorrem nos neurônios (FAHRBACH et al., 2003), pois a plasticidade dos corpos de cogumelos nas operárias de *A. mellifera* está relacionada às atividades desempenhadas por essas abelhas na colônia (DURST; EICHMULLER; MENZEL, 1994; FARRIS et al., 2001). As operárias possuem um extenso desenvolvimento comportamental e iniciam a fase adulta desempenhando atividades no interior da colônia, se tornando

campeiras nas idades finais da vida adulta (WINSTON, 1991; ROBINSON, 1992); o maior volume de neurópilas, ou células Kenyon, nos corpos de cogumelo é observado em abelhas que desempenham a atividade de forrageio (FARRIS et al., 2001). Nesse período, as abelhas precisam ter a integração das informações sensoriais, capacidade de navegação e de obtenção do alimento de forma eficiente, além de necessitarem lembrar quais plantas oferecem os melhores recursos alimentares (FAHRBACH et al., 2003).

A glândula hipofaríngea de ambas as subespécies apresentaram maior teor proteico entre 05 e 15 dias de idade das abelhas, coincidindo com os picos de desenvolvimento dessa glândula, que ocorrem entre 6 e 16 dias, o que corresponde ao período em que as abelhas desenvolvem a atividade de alimentação das larvas (WINSTON, 1991), secretando geléia real (WANG; MOELLER, 1971).

As áreas dos acinos da glândula hipofaríngea em abelhas Africanizadas e Europeias apresentam diferenças. Porém, o diâmetro dos acinos das glândulas das abelhas pode variar de acordo com a idade e a quantidade de cria que a colônia possui (HRASSNIGG; CRAILSHEIM, 1998). A hipofaríngea em Africanizadas possui um desenvolvimento crescente até os 15 dias de idade das abelhas, quando começa a reduzir novamente o tamanho da área dos acinos e, aos 30 dias de idade, a glândula hipofaríngea apresenta os acinos com área semelhante aos observados nas abelhas recém-emergidas. Já em abelhas Europeias, os acinos dessa glândula também apresentam desenvolvimento da área aos 10 dias de idade das operárias, no entanto, ele estabiliza e não apresenta reduções da área nas demais idades estudadas, sendo observada nessa última idade a maior área de acinos da hipofaríngea.

Normalmente, os acinos das abelhas são mais desenvolvidos durante a fase nutriz das operárias, degenerando quando as abelhas se tornam campeiras, embora, no início da execução da atividade de forrageio, as operárias ainda possam apresentar a glândula hipofaríngea bem desenvolvida. É a idade em que as abelhas podem apresentar a degeneração da hipofaríngea bastante flexível, pois sofre influência das condições da colônia e do ambiente em que esta colônia se encontra (HRASSNIGG; CRAILSHEIM, 1998). É possível que operárias de uma mesma idade apresentem diferenças no tamanho dos acinos de acordo com a atividade que estão desenvolvendo na colônia (HUANG et al., 1994).

Em Africanizadas, a maior área dos acinos da hipofaríngea foi de $0,0226 \text{ mm}^2$, enquanto que em Europeias foi de $0,0883 \text{ mm}^2$. Ou seja, os acinos dessa glândula são mais de três vezes maiores nas abelhas Europeias que nas Africanizadas. Os diferentes tamanhos dos acinos da hipofaríngea entre as subespécies estudadas têm relação com o tamanho das abelhas: a área média da cabeça das abelhas Africanizadas é de $0,88 \text{ mm}^2$, enquanto a da Europeia estudada é de $1,47 \text{ mm}^2$.

O aspecto morfológico dos acinos também apresenta diferenças entre as duas subespécies. Em Africanizadas, os acinos das glândulas de abelhas recém-emergidas são menores e com coloração mais clara. Os acinos da glândula de operárias com 10 dias de idade são maiores, com aspecto inflado, ficando sobrepostos uns sobre os outros e a coloração é branco-leitosa. Aos 30 dias, os acinos dessa glândula são muito reduzidos e desgastados, voltando a apresentar coloração semelhante à observada nos acinos de abelhas recém-emergidas. Até os 10 dias de idade, os acinos da hipofaríngea em abelhas Europeias apresentaram aspectos semelhantes aos observados nas Africanizadas, porém não são observadas redução da área ou mudanças no aspecto dos acinos aos 30 dias de idade (Figura 42).

Figura 42 - Aspecto da glândula hipofaríngea de *Apis mellifera* em diferentes idades: a,b,c. acinos da glândula de operárias Africanizadas recém-emergida; com 10 e 30 dias de idade, respectivamente; d,e,f. acinos da glândula de operárias Europeias recém-emergida; com 10 e 30 dias de idade, respectivamente. Fotomacrografia com lupa Leica® em aumento de 5.0x

A glândula hipofaríngea em abelhas recém-emergidas não é funcional, ocorrendo o desenvolvimento nos primeiros dias após a emergência. Na fase nutridora, a hipofaríngea está no auge do seu desenvolvimento e quando a secreção produzida nas células glandulares é liberada, formam-se bolsões de secreção. Quando ocorre o processo de degeneração da glândula nas operárias mais velhas, a mudança do aspecto dos acinos é devida ao colapso das microvilosidades ao redor do canal coletor em razão do esvaziamento do espaço secretor (CRUZ-LANDIM, 2008) e, após ocorrer a degeneração, os acinos dessa glândula podem não retornar a ser ativos (DADE, 1962). Em campeiras de até 40 dias essa reversão do estado degenerativo da glândula é possível, porém em abelhas que se encontram em transição entre a função nutriz e forrageia, o que, dependendo das condições da colônia, pode ocorrer em uma faixa variável de idade das operárias (CRUZ-LANDIM, 2008).

Portanto, pelo aspecto da glândula hipofaríngea observado nas duas subespécies, as abelhas Europeias possuem um período de vida mais longo que as Africanizadas nas estações estudadas.

A glândula salivar cefálica das abelhas Africanizadas e Europeias apresentaram maiores teores de proteínas nas idades em que as abelhas desenvolvem atividades externas à colônia, ocorrendo variações das idades de acordo com a estação do ano em que as abelhas foram estudadas. Essa glândula é responsável pela fixação e preservação dos hidrocarbonetos de reconhecimento de colônia nas operárias (KATZAV-GOZANSKY et al., 2001), o que pode justificar esse maior teor de proteínas nessas idades.

Os acinos dessa glândula crescem lentamente nas abelhas Africanizadas e mais rapidamente nas Europeias. Além disso, os maiores teores de proteínas encontrados em ambas possuem relação com as maiores áreas de acinos encontrados na glândula salivar cefálica. As abelhas Africanizadas e Europeias possuem maior área de acino da salivar cefálica aos 20 dias, sendo a área destes em Africanizadas de $0,0261 \text{ mm}^2$ e em Europeias de $0,0795 \text{ mm}^2$.

A glândula salivar cefálica em ambas as subespécies apresentou aspectos semelhantes nas idades estudadas, com os acinos menores, aparentando não possuir secreção em abelhas recém-emergidas e com os acinos grandes e inflados nas operárias que possuem 20 dias de idade. Os acinos apresentam

aspecto colapsado (POIANI; CRUZ-LANDIM, 2010) e tamanho reduzido nas idades iniciais devido à pouca secreção citoplasmática que as células glandulares apresentam nessas idades; essa secreção aumenta à medida que as operárias envelhecem, acumulando-se no interior das células e depois nos acinos, que se tornam túrgidos (CRUZ-LANDIM, 2008) (Figura 43).

Figura 43 - Aspecto da glândula Salivar cefálica de *Apis mellifera* em diferentes idades: a,b. acinos da glândula de operárias Africanizadas recém-emergida e com 20 dias de idade, respectivamente; c,d. acinos da glândula de operárias Europeias recém-emergida e com 20 dias de idade, respectivamente. Fotomacrografia com lupa Leica® em aumento de 5.0x

A glândula salivar torácica também apresentou maiores teores de proteínas em abelhas que desempenhavam atividade no interior da colônia em ambas as subespécies. Os acinos dessa glândula atingem tamanho máximo aos 15 dias da idade adulta das operárias (CRUZ-LANDIM, 2008). A secreção da salivar

torácica é responsável pela síntese e produção do fator quatro de crescimento do disco imaginal (IDGF4) que é secretado na geleia real e no mel, o que afetaria o crescimento das larvas e a fisiologia dos adultos (FUJITA et al., 2010), justificando os maiores teores de proteínas encontrados em operárias internas à colônia.

Foi observado que a glândula mandibular das abelhas estudadas apresentou diferenciação nos picos de proteínas. Em abelhas Africanizadas, foram observados maiores teores de proteínas nas idades em que as abelhas desempenhavam atividade no interior da colônia no inverno e na primavera e no exterior da colônia novamente no inverno e no verão. Já em abelhas Europeias, nessa glândula os maiores teores proteicos foram encontrados somente nas idades iniciais de desenvolvimento das operárias. Essa glândula é responsável pela produção de feromônios que são importantes para a comunicação química entre os membros da colônia (SALLES; CRUZ-LANDIM, 2004), além de produzir o ácido 10-hidroxidecenoico que é adicionado à geleia real pelas operárias nutrízes (CRUZ-LANDIM, 2008). A glândula mandibular também é responsável pela produção de feromônio de marcação de trilha (VALLET; CASSIER; LENSKEY, 1991), o que pode explicar o pico de proteínas nas abelhas Africanizadas no período em que as abelhas estariam desenvolvendo atividades externas à colônia.

4.2 Polietismo em abelhas *Apis mellifera* com a mesma idade

4.2.1 Africanizadas

Os enxames apresentaram comportamentos diferentes de acordo com a população e a presença ou não do alimento na colônia. As abelhas que não possuíam alimento no núcleo permaneceram os 10 primeiros dias após a introdução dentro da colônia sem apresentar nenhuma alteração de comportamento, apenas permanecendo agrupadas. Essa inatividade provavelmente ocorreu devido à ausência de alimento nos núcleos, uma vez que no núcleo onde as abelhas eram alimentadas, o início da execução das atividades externas pelas abelhas ocorreu com cinco dias de idade.

O comportamento defensivo, caracterizado pelo levantamento do abdômen e exposição da glândula de Nasonov, foi observado nas abelhas do núcleo Africanizado (NA1 e NA3) quando as abelhas tinham 10 dias de idade; enquanto que

as operárias em NA2 não apresentaram alteração no comportamento (Figura 44). Como em NA3 havia alimento, as abelhas desempenhavam diferentes funções na colônia, sendo observada a presença de ovos de operárias poedeiras, favos puxados e pólen estocado no favo (Figura 45).

Figura 44 – Núcleos de abelhas Africanizadas de mesma idade aos 10 dias de idade: a. agrupamento das abelhas no interior do núcleo; b. comportamento defensivo

Figura 45 – Atividades das abelhas com 10 dias em NA3: a. favo puxado na tampa do núcleo; b. ovos de operária poedeira; c. operária campeira retornando para o núcleo após coleta de pólen; d. operária campeira no interior do núcleo com pólen coletado na corbícula

Aos 15 dias, as abelhas de NA1 puxaram uma pequena área de favo na cera alveolada, indicando que a atividade de forrageio foi iniciada, uma vez que as abelhas necessitavam de mel para produzir cera. Também foi encontrado depósito de pólen no favo e as abelhas estavam ativas na entrada do núcleo (Figura 46). As abelhas de NA2 não apresentaram mudança em seu comportamento e os ovos colocados haviam sumido (Figura 47). Já as operárias de NA3 estavam estocando pólen no núcleo, produzindo geleia real e alimentando as larvas oriundas dos ovos de operária. No entanto, as abelhas de NA3 não alimentaram os ovos diplóides colocados no núcleo, não sendo vistas larvas oriundas desses ovos (Figura 48).

Figura 46 – Atividades desempenhadas pelas abelhas em NA1 aos 15 dias de idade: a. favo puxado de cera alveolada com depósito de pólen; b. operárias campeiras retornando e abelhas com comportamento defensivo em frente ao núcleo

Figura 47 - Atividades desempenhadas pelas abelhas em NA2 aos 15 dias de idade: a. abelhas agrupadas no núcleo; b. pedaço de favo que continha ovos, sem a presença destes

Figura 48 - Atividades desempenhadas pelas abelhas em NA3 aos 15 dias de idade: a. larvas oriundas de ovos de operárias poedeiras alimentadas; b. pólen estocado no núcleo

Aos 20 dias, foi observado em NA1 ovos de operária poedeira e, apesar de as abelhas encontrarem-se ativamente no favo onde os ovos estavam depositados, não foi constatada a presença de larvas ou geleia real, não havendo desenvolvimento de larvas oriundas do favo com ovos diplóides colocados (Figura 49). Nessa idade, as abelhas de NA2 iniciaram a atividade de forrageio, no entanto não foram encontrados alimentos depositados no núcleo, bem como não foram encontrados sinais dos ovos colocados anteriormente. Em NA3, as abelhas continuavam o desenvolvimento de suas atividades normalmente; as operárias se dividiram em grupos que desempenhavam diferentes funções no núcleo.

Figura 49 – Abelhas de NA1 aos 20 dias de idade: a. abelhas sobre o pedaço do favo que foi puxado; b. pedaço de favo colocado sem os ovos; c. óvulos de operária poedeira e abelhas realizando vistoria dos alvéolos

Com 25 dias de idade, as abelhas do NA1 desempenhavam ativamente suas tarefas dentro e fora do núcleo, tendo sido vistos mais ovos de operária poedeira, mas sem a presença de larvas (Figura 50). Nas operárias de NA2 não foram observadas alterações, nem ovos de operárias poedeiras. Em NA3, foram encontradas células de cria operculada e muitas larvas em diversos estádios de desenvolvimento (Figura 51).

Figura 50 – Ovos de operária poadeira sem a presença de larvas, observados aos 25 dias em NA1

Figura 51 - Abelhas de NA3 aos 25 dias de idade: a. células de cria operculada; b. larvas em diferentes estádios de desenvolvimento; c. ovos de operária poadeira

Aos 30 dias, as abelhas nos três núcleos não apresentaram atividades diferentes das que foram observadas aos 25 dias de idade.

Os teores de proteínas das abelhas de NA1 e NA2 apresentaram diferentes resultados entre eles e quando comparados com os resultados obtidos nas abelhas no verão (Tabela 6).

Tabela 6 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Africanizadas em experimento de plasticidade com abelhas de 05, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade em núcleos (3) e na estação verão (4)

(continua)

Idade (dias)	Parte estudada											
	Cérebro						Hipofaríngea					
	NA1(5)	DP(6)	NA2 (7)	DP	Verão	DP	NA1	DP	NA2	DP	Verão	DP
05	23,32 d A	±1,66	17,30 c B	±0,28	24,70 d A	±0,22	13,54 c C	±0,80	6,61 c F	±0,52	12,77 c CD	±0,41
10	19,99 e B	±0,62	19,47 c C	±0,29	30,81 c A	±0,33	22,41 a B	±0,50	4,32 d G	±0,20	22,84 a B	±1,50
15	18,26 e B	±0,81	08,01 d E	±0,56	42,71 a A	±2,04	13,01 c C	±0,09	4,17 d G	±0,04	18,50 b B	±0,00
20	30,92 c A	±0,25	28,63 b A	±0,30	29,20 c A	±1,72	12,28 c C	±0,33	9,15 b D	±0,54	12,53 c BC	±0,27
25	42,54 b A	±0,18	45,91 a A	±2,64	35,72 b B	±1,11	15,96 b C	±0,79	11,02 a E	±0,36	12,32 c DE	±0,90
30	48,98 a A	±1,99	50,37 a A	±0,37	21,87 d B	±0,44	22,40 a B	±0,38	11,21 a C	±0,77	11,07 c C	±0,24

Idade (dias)	Parte estudada											
	Mandibular						Salivar Cefálica					
	NA1	DP	NA2	DP	Verão	DP	NA1	DP	NA2	DP	Verão	DP
05	11,42 a D	±1,04	9,45 a E	±0,95	9,65 a D	±0,00	2,93 bc H	±0,23	0,89 c I	±0,11	1,02 d I	±0,17
10	3,44 c H	±0,16	3,94 c GH	±0,25	5,14 cd G	±0,19	2,68 bc I	±0,04	0,52 d L	±0,05	1,66 c J	±0,25
15	3,24 c I	±0,22	1,69 e L	±0,00	6,13 c F	±0,60	2,53 c J	±0,16	0,01 e M	±0,00	3,43 b HI	±0,22
20	4,38 b F	±0,23	2,87 d GH	±0,23	4,98 d F	±0,16	3,19 bc G	±0,16	2,48 b H	±0,07	7,12 a E	±0,15
25	4,98 b G	±0,05	5,67 b G	±0,11	8,06 b F	±0,07	8,51 a F	±0,39	2,93 b H	±0,22	5,87 a G	±0,13
30	4,69 b F	±0,23	3,43 c G	±0,97	4,98 d F	±0,32	3,38 b G	±0,26	5,96 a E	±0,37	4,04 b FG	±0,12

Tabela 6 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Africanizadas em experimento de plasticidade com abelhas de 05, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade em núcleos (3) e na estação verão (4)

(conclusão)

Idade (dias)	Parte estudada					
	Salivar Torácica					
	NA1	DP	NA2	DP	Verão	DP
05	11,97 b CD	±0,31	5,08 c G	±0,64	12,60 b CD	±0,66
10	10,51 bc E	±0,27	7,66 b F	±0,17	14,86 a D	±0,68
15	10,13 c D	±0,43	3,79 d H	±0,24	13,70 ab C	±0,29
20	14,35 a B	±0,25	12,22 a C	±0,39	14,84 a B	±0,32
25	11,13 bc E	±0,13	11,55 a DE	±0,44	13,21 ab D	±0,22
30	10,69 bc C	±0,38	7,94 b D	±0,47	11,87 b C	±0,39

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

⁽²⁾ Teores de proteínas em micrograma de proteína por glândula ($\mu\text{P/g}$)

⁽³⁾ Núcleo de abelhas Africanizada 1 (NA1) e núcleo de abelhas Africanizada 2 (NA2)

⁽⁴⁾ Estação verão representa as abelhas de uma mesma idade que se desenvolveram em colônia juntamente com outras abelhas de diferente idade e com condições normais de população e alimento.

⁽⁵⁾ Núcleo de abelhas Africanizada 1 (NA1)

⁽⁶⁾ Desvio padrão

⁽⁷⁾ Núcleo de abelhas Africanizada 2 (NA2)

Aos cinco dias, as estruturas de abelhas de NA1 e NA2 apresentaram resultados semelhantes ou maiores que os observados nas abelhas no verão. Nesse período, as abelhas ainda tinham alimento no favo que foi deixado, o que pode explicar os resultados obtidos. Os teores de proteínas no cérebro, na glândula hipofaríngea e na salivar torácica de NA1 não diferiram dos obtidos no verão. Já as glândulas mandibular e salivar cefálica apresentaram maiores teores proteicos que as abelhas de NA2 e no verão.

Nos resultados obtidos em abelhas com 10 dias, os teores de proteínas das estruturas estudadas apresentaram decréscimo, com exceção da glândula mandibular que foi maior em NA1 e a hipofaríngea que não teve resultado diferente entre as operárias de NA1 e do verão. Com 15 dias de idade, NA1 e NA2 apresentaram resultados de proteínas menores que os obtidos no verão para todas as estruturas estudadas.

Com 20 dias e a entrada de alimento pelo início da atividade de forrageio nos experimentos, ocorreram mudanças nos teores proteicos obtidos. As operárias em NA1 apresentaram teores maiores de proteínas das estruturas que os encontrados em abelhas NA2 e não diferiram dos resultados observados nas abelhas no verão para o cérebro, glândulas mandibular e salivar torácica.

Aos 25 dias, foram observadas maiores similaridades entre os teores de proteínas obtidos nos experimentos. O cérebro, as glândulas mandibular e salivar torácica apresentaram resultados estatisticamente iguais em NA1 e NA2; e as glândulas hipofaríngea e salivar cefálica tiveram teores proteicos maiores em NA1 quando comparados com NA2 e no verão.

Com 30 dias, quando as abelhas dos experimentos estavam mais estáveis, pois desempenhavam atividade de forrageio e havia alimento nos núcleos, os teores de proteínas obtidos das operárias em NA1 e NA2 foram maiores ou iguais aos obtidos no verão, com exceção dos teores de proteínas observados no cérebro das abelhas, que foram maiores no verão, mas não diferiram entre os das operárias de NA1 e NA2. As abelhas em NA1 apresentaram maior teor proteico da hipofaríngea, no entanto, em NA2 e no verão os resultados foram iguais. As abelhas no verão e de NA1 apresentaram resultados proteicos iguais para as glândulas mandibular e salivar cefálica, porém nesta última glândula a quantidade de proteína nos indivíduos em NA2 foi maior. Já na glândula salivar cefálica não foram observados teores de proteínas diferentes entre as abelhas de NA1 e no verão.

O cérebro das abelhas de NA1 apresentou teores proteicos crescentes com pico aos 30 dias de idade. Para as operárias em NA2, este pico ocorreu entre 25 e 30 dias e no verão o pico proteico ocorreu aos 15 dias. As idades precedem a atividade de forrageio desempenhada pelas operárias, o que justificaria o aumento de células no cérebro das abelhas.

A glândula hipofaríngea teve maiores teores proteicos nas abelhas de NA1 aos 10 e 30 dias, mostrando que a glândula iniciou o seu desenvolvimento, porém, sem a alimentação proteica necessária para isso, apresentou decréscimo nas idades seguintes, subindo novamente após a entrada de pólen na colônia. Já as operárias de NA2 apresentaram maiores teores proteicos aos 25 e 30 dias, enquanto no verão o pico de proteína foi observado quando as operárias tinham 10 dias, idade em que a abelha desempenharia a atividade nutriz na colmeia.

Os maiores teores de proteínas na glândula mandibular foram observados quando as abelhas tinham cinco dias em NA1, decrescendo aos 10 e 15 dias e apresentando o segundo maior valor de proteínas aos 20 dias, quando não diferiram de 25 e 30 dias. As abelhas desse núcleo apresentaram teores de proteínas mais estáveis para essa glândula, sendo enquadrados no modelo de regressão poligonal quadrática, com significância estatística ($p > 0,05$) para o fator idade (Figura 52), podendo-se observar que essa glândula apresentou decréscimo dos teores de proteínas totais após os cinco dias, subindo aos 20 dias.

Figura 52 - Regressão quadrática dos resultados de proteínas para a glândula mandibular das abelhas de NA1.

As abelhas de NA2 apresentaram resultados significativamente diferentes, com constantes oscilações dos resultados, porém com maior teor de proteínas aos 20 e 25 dias. Já nas abelhas do verão, o maior teor de proteínas para essa glândula foi obtido aos cinco dias de idade.

Na glândula salivar cefálica, foram observados picos de proteínas em idades aproximadas para todas as abelhas dos grupos estudados. Em NA1, o maior teor de proteínas totais ocorreu quando as abelhas tinham 25 dias; em NA2 aos 30 dias e no verão aos 20 e 25 dias de idade.

A glândula salivar torácica apresentou teores proteicos diferentes entre as abelhas de NA1, NA2 e no verão. Enquanto os valores obtidos neste último não diferiram entre as abelhas com 10 e 25 dias de idade; as de NA1 apresentaram pico aos 20 dias e as abelhas em NA2 aos 25 e 30 dias.

4.2.2. Europeias

As abelhas apresentaram atividade de voo e comportamento defensivo aos cinco dias de idade (Figura 53).

Figura 53 - Observação de NE1 aos cinco dias de idade: a. abelha em atividade de voo, retornando para o núcleo; b. comportamento defensivo apresentado pelas abelhas

Aos 10 dias, as abelhas iniciaram a coleta de pólen, estando muito ativas e realizando tarefas no interior do ninho. Não foi observada nesta idade a presença de ovos de operária poedeira ou de desenvolvimento do favo de cera alveolada colocado (Figura 54).

Figura 54 - Observação de NE1 aos 10 dias de idade: a. abelha em atividade no favo de mel; b. abelhas campeiras retornando com pólen

Aos 15 dias de idade foi observado que as abelhas não alimentaram as larvas dos ovos diplóides colocados. Continuavam suas atividades de forrageio, não puxando favo de cera alveolada e apresentando ampla atividade de estocagem de alimento. Com 20 dias de idade das abelhas, foi observada a presença de ovos de operária poedeira, no entanto sem a presença de geleia real ou larvas. Com 25 dias, não foram observadas alterações no núcleo; havia ovos, porém sem geleia real ou larvas (Figura 55).

Figura 55 - Observação de NE1 aos 20 dias de idade: a. favo de ovos diplóides colocado, porém retirados; b. ovos de operária poedeira

Os resultados dos teores de proteínas do cérebro e glândulas salivar torácica, salivar cefálica, mandibular e hipofaríngea apresentaram diferenças entre os núcleos e quando comparados estes núcleos com os resultados obtidos na primavera (Tabela 7).

Tabela 7 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Europeia em experimento com abelhas de 05, 10, 15, 20 e 25 dias de idade em núcleos (3) e na primavera (4)

(continua)

Idade (dias)	Parte estudada											
	Cérebro						Hipofaríngea					
	NE1(5)	DP(6)	NE2(7)	DP	PRIM(8)	DP	NE1	DP	NE2	DP	PRIM	DP
05	47,47 c D	±1,73	112,06 a A	±3,65	84,11 a B	±4,00	25,64 b F	±0,46	52,13 b D	±0,40	74,07 c C	±0,53
10	55,66 b D	±0,75	87,35 c B	±2,68	69,26 b C	±3,59	27,47 b F	±0,73	83,04 a B	±0,97	132,15 a A	±3,19
15	46,11 c D	±2,68	96,24 b A	±1,78	78,58 ab B	±4,28	48,73 a D	±2,85	74,85 a B	±3,35	60,86 d C	±1,20
20	60,39 ab D	±2,53	75,25 d A	±1,86	73,25 b C	±3,02	29,18 b G	±0,16	52,60 b E	±2,63	85,86 b B	±1,99
25	64,13 a B	±3,65	62,26 e B	±1,60	85,21 a A	±4,15	40,03 a C	±1,20	45,34 c C	±0,40	58,15 d B	±2,68

Idade (dias)	Parte estudada											
	Mandibular						Salivar Cefálica					
	NE1	DP	NE2	DP	PRIM	DP	NE1	DP	NE2	DP	PRIM	DP
05	21,03 b G	±0,90	25,96 a F	±0,17	21,12 a G	±0,24	15,82 ab H	±0,59	12,92 cd I	±0,58	11,80 bc I	±0,57
10	19,92 b FG	±0,99	18,13 b G	±0,20	19,86 ab G	±0,32	18,55 a G	±0,25	11,66 d H	±0,47	11,57 c H	±0,09
15	25,01 a E	±0,50	18,73 b F	±0,46	17,99 b FG	±0,24	15,37 b G	±0,07	13,82 c G	±0,85	13,14 bc G	±0,35
20	1,88 d M	±0,21	6,00 d L	±0,22	9,14 c J	±0,38	7,39 c J	±0,35	22,47 a H	±0,67	13,65 b I	±0,23
25	6,25 c G	±0,08	12,45 c F	±0,16	6,46 d G	±0,30	6,56 c G	±0,39	16,74 b E	±0,30	17,63 a E	±0,80

Tabela 7 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Europeia em experimento com abelhas de 05, 10, 15, 20 e 25 dias de idade em núcleos (3) e na primavera (4)

(conclusão)

Idade (dias)	Parte estudada					
	Salivar Torácica					
	NE1	DP	NE2	DP	PRIM	DP
05	21,03 c G	±0,90	33,75 ab E	±0,03	23,84 b G	±1,56
10	19,92 c FG	±0,99	34,46 a E	±0,35	30,00 a F	±0,23
15	25,10 b E	±0,50	30,31 b E	±0,40	22,49 bc F	±1,35
20	35,49 a F	±1,17	29,82 b G	±0,26	20,03 c H	±1,12
25	27,89 b D	±1,49	27,53 c D	±0,21	24,43 b D	±1,54

(1) Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

(2) Teores de proteínas em micrograma de proteína por glândula ($\mu\text{P/g}$)

(3) Núcleo de abelhas Europeia 1 (NE1) e núcleo de abelhas Europeia 2 (NE2)

(4) Estação primavera representa as abelhas de uma mesma idade que se desenvolveram em colônia juntamente com outras abelhas de diferente idade e com condições normais de população e alimento.

(5) Núcleo de abelhas Europeia 1 (NE1)

(6) Desvio padrão

(7) Núcleo de abelhas Europeia 2 (NE2)

(8) Estação primavera (PRIM)

Quando são comparados o cérebro e as glândulas estudadas numa mesma idade, o cérebro apresentou maiores teores de proteínas totais aos cinco dias de idade das abelhas, sendo as abelhas de NE2 as que apresentaram os maiores teores de proteínas nessa idade, seguidas das da primavera e das do NE1. Já a glândula hipofaríngea apresentou maiores teores proteicos nas abelhas da primavera, seguidas das abelhas de NE2 e por último do NE1.

Os maiores valores de proteínas da glândula mandibular em abelhas com cinco dias foram observados em NE2, sendo que as operárias de NE1 e primavera não apresentaram diferenciação estatística para os resultados obtidos nessa glândula. A glândula salivar cefálica teve maior teor de proteínas entre as abelhas de NE1 e não diferiu estatisticamente entre as abelhas de NE2 e da primavera. Já para a glândula salivar torácica, os maiores teores de proteínas foram encontrados nas abelhas de NE2, porém apresentando resultados semelhantes entre NE1 e primavera.

Aos 10 dias, a glândula hipofaríngea das abelhas estudadas na primavera foi a estrutura que apresentou maior teor proteico, seguido dos teores obtidos nas operárias de NE2 e por último as de NE1. No cérebro, foi observado o segundo maior teor de proteínas nessa idade, nas abelhas de NE2, cujos resultados de proteínas totais foram maiores que os obtidos das abelhas da primavera e NE1. A glândula mandibular das abelhas de NE1 apresentaram teores proteicos maiores ou iguais aos encontrados em NE2 e na primavera. Na glândula salivar cefálica, os maiores teores de proteínas foram obtidos nas abelhas de NE1, seguidas das de NE2 e das da primavera que não diferiram estatisticamente. Na glândula salivar torácica, as abelhas de NE2 apresentaram maiores teores de proteínas que as da primavera, sendo que as abelhas desta última apresentaram resultados proteicos maiores ou iguais que as operárias de NE1.

Em abelhas com 15 dias de idade, o cérebro foi novamente a estrutura com maior teor proteico, quando comparado com as demais estruturas. O maior teor de proteínas foi observado em abelhas do NE2 em comparação aos resultados obtidos nas abelhas da primavera e do NE1. Para a glândula hipofaríngea, os maiores resultados de proteínas foram observados nessa idade entre as abelhas de NE2, seguidas das abelhas da primavera e por fim, das abelhas de NE1. No entanto, as abelhas de NE1 apresentaram maiores teores proteicos para a glândula

mandibular que as demais, sendo que no NE2 e na primavera não houve teores proteicos significativamente diferentes para esta glândula. A glândula salivar cefálica nesta idade não apresentou teores de proteínas diferentes entre as abelhas estudadas. Já na glândula salivar torácica, foram observados valores de proteínas semelhantes estatisticamente entre as abelhas de NE1 e NE2, que foram maiores que os obtidos das operárias coletadas na primavera.

Aos 20 e 25 dias, o cérebro das abelhas estudadas foi a estrutura que apresentou maior teor de proteínas. Aos 20 dias de idade, foi observado que as abelhas da primavera tiveram maiores resultados de proteínas que as de NE2 e NE1 para as glândulas hipofaríngea e mandibular. Na glândula salivar cefálica, os maiores teores de proteínas foram encontrados entre as abelhas de NE2, que foram maiores que as abelhas da primavera e de NE1. Já na glândula salivar torácica, as operárias de NE1 apresentaram resultados proteicos superiores às de NE2 e da primavera.

Com 25 dias, as abelhas da primavera apresentaram maiores teores de proteínas no cérebro e na glândula hipofaríngea que as operárias de NE1 e NE2. Já para as glândulas mandibulares e salivar cefálica, foram observados maiores teores proteicos em NE2, e na salivar torácica não foram obtidos teores de proteínas diferentes estatisticamente entre as abelhas de NE1, NE2 e na primavera.

Os cérebros das abelhas de NE1 apresentaram maiores teores de proteínas nas idades de 20 e 25 dias. Enquanto que no NE2 foi observado maior teor de proteínas em abelhas com cinco dias de idade, diminuindo progressivamente nas idades seguintes. Esse resultado mais estável possibilitou a análise de regressão linear decrescente dos resultados de proteínas obtidos nas abelhas de NE2 (Figura 56). Já na primavera, os maiores resultados de proteínas foram obtidos em abelhas com 10 dias.

Figura 56 - Regressão linear dos resultados de proteínas obtidos no cérebro das abelhas de NE2

Os resultados de proteínas obtidos com as glândulas hipofaríngea foram diferentes de acordo com o grupo de abelhas estudado. As abelhas de NE1 apresentaram picos de proteínas para essa glândula nas idades finais estudadas, ou seja, aos 20 e 25 dias. Em NE2, foi observado pico proteico para a hipofaríngea quando as abelhas tinham 10 dias, diminuindo até os 25 dias, apresentando um resultado em curva que foi explicado pelo modelo de regressão quadrático (Figura 57). As abelhas coletadas na primavera apresentaram maiores teores de proteínas para a hipofaríngea aos 5 e 10 dias de idade.

Figura 57 - Regressão quadrática dos resultados de proteínas obtidos na glândula hipofaríngea das abelhas de NE2

As abelhas de NE1 apresentaram maior teor de proteínas para a glândula mandibular aos 15 dias de idade. Já em NE2, as abelhas apresentaram pico de proteínas totais aos 5 dias de idade. As abelhas na primavera apresentaram pico proteico aos 5 e 10 dias, diminuindo até os 25 dias, sendo mais estáveis que os resultados obtidos nas abelhas de NE1 e NE2, enquadrando-se no modelo de regressão linear decrescente (Figura 58).

Figura 58 - Regressão quadrática dos resultados de proteínas obtidos na glândula mandibular das abelhas de NE2

Na glândula salivar cefálica, os grupos de abelhas estudados apresentaram picos de proteínas em idades diferentes. Em abelhas de NE1, ocorreram dois picos de proteínas totais aos 5 e 10 dias, reduzindo gradativamente nas demais idades avaliadas, sendo os resultados enquadrados no modelo de regressão linear decrescente (Figura 59). Já as abelhas de NE2 tiveram pico de proteínas na glândula salivar cefálica aos 20 dias de idade das operárias. Em abelhas na primavera, o maior valor de proteína foi encontrado quando as operárias tinham 25 dias de idade.

Figura 59 - Regressão linear decrescente dos resultados de proteínas obtidos na glândula salivar cefálica das abelhas de NE1

A glândula salivar torácica também apresentou diferenças de picos de proteínas entre os grupos de abelhas estudados. Em abelhas de NE1, o maior teor proteico foi observado quando as operárias tinham 20 dias de idade. Nas abelhas de NE2, ocorreram picos aos 5 e 10 dias de idade, quando os teores diminuem gradativamente. Esse comportamento regressivo dos teores de proteínas encontrados nesse grupo de abelhas se enquadrou no modelo de regressão linear decrescente (Figura 60). Já as abelhas na primavera apresentaram apenas um pico proteico, quando as abelhas tinham 10 dias de idade.

Figura 60 - Regressão linear decrescente dos resultados de proteínas obtidos na glândula salivar torácica das abelhas de NE2

As áreas dos acinos das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea nas abelhas apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) quando foram comparadas entre os grupos de abelhas numa mesma idade; porém foram estatisticamente iguais ($p < 0,05$) quando comparadas as diferentes idades dentro de uma mesma estrutura nos grupos de abelhas estudados (Tabela 8).

Tabela 8 - Médias (1) da área (2) dos acinos de glândulas salivar torácica e hipofaríngea em abelhas Europeias de 05, 10, 15, 20 e 25 dias de idade, em núcleo de abelhas de mesma idade (3) e na primavera (4)

Parte Estudada				
Idade (dias)	SC(5)NE1(6)	SC P(7)	H(8) NE1	H P
05	0,0923 a A	0,0530 b BC	0,0394 a B	0,0652 b C
10	0,0816 a A	0,0606 ab A	0,0288 a B	0,0726 ab A
15	0,1030 a A	0,0650 ab BC	0,0458 a C	0,0804 ab AB
20	0,0968 a A	0,0782 a A	0,0360 a B	0,0816 ab A
25	0,0780 a A	0,0702 ab A	0,0428 a B	0,0880 a A

(1) Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p>0,05$)

(2) Área dos acinos glandulares em milímetro quadrado (mm^2)

(3) Núcleo de abelhas Europeias um

(4) Estação primavera representa as abelhas de uma mesma idade que se desenvolveram em colônia juntamente com outras abelhas de diferente idade e com condições normais de população e alimento.

(5) Glândula salivar cefálica (SC)

(6) Núcleo de abelhas Europeias um (NE1)

(7) Estação primavera (P)

(8) Glândula hipofaríngea (H)

A glândula salivar cefálica das abelhas do NE1 apresentou maior área de acinos; sendo maior, ou igual, quando comparada com as áreas das glândulas hipofaríngea e salivar cefálica de abelhas na primavera em todas as idades estudadas.

Aos cinco dias de idade das abelhas, a área dos acinos da glândula salivar cefálica foi maior que a dos acinos de hipofaríngea e salivar cefálica de abelhas da primavera. Porém, a área dos acinos da glândula salivar cefálica não diferiu estatisticamente da área dos acinos da glândula hipofaríngea e salivar cefálica nas abelhas da primavera com 10 dias.

Em abelhas com 15 dias, a área dos acinos da glândula salivar cefálica de abelhas do NE1 não diferiu estatisticamente da área dos acinos da hipofaríngea de abelhas da primavera. Além disso, a área dos acinos da glândula hipofaríngea das abelhas de NE1 não diferiu da área dos acinos da salivar cefálica de operárias da primavera. Aos 20 e 25 dias, a área dos acinos da salivar cefálica das abelhas de NE1 não apresentou diferença estatística quando comparada com a área dos acinos das glândulas hipofaríngea e salivar cefálica de abelhas da primavera.

Quando se separou a área dos acinos das glândulas das abelhas, estas não apresentaram diferenças estatísticas entre as idades estudadas. No entanto, é possível observar que a glândula salivar cefálica nas abelhas do NE1 apresentou a área dos acinos muito desenvolvida a partir dos cinco dias de idade das operárias, fato não observado nos acinos da mesma glândula de abelhas na primavera. O aspecto dos acinos desta glândula nas operárias de NE1 assemelha-se ao observados em abelhas com 20 dias na primavera (Figura 61).

Figura 61 - Aspecto dos acinos da glândula salivar cefálica de abelhas de NE1 com 5 (a), (b) e 20 dias (c); abelhas na primavera com 5 (d), 10 (e) e 20 dias (f)

Quando comparadas as áreas dos acinos das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea de abelhas do NE1 com o seus respectivos teores de proteínas (Figuras 62 e 63), pode-se perceber que a quantidade de proteínas totais encontradas na glândula hipofaríngea tem relação com a área dos acinos da glândula. Já na salivar cefálica, essa relação não é tão evidente, uma vez que a área dos acinos glandulares e o teor de proteínas não apresentaram os picos conjuntos em todas as idades estudadas.

Figura 62 - Comparação dos teores de proteínas com a área dos acinos em glândula hipofaríngea de abelhas do NE1

Figura 63 - Comparação dos teores de proteínas com a área dos acinos em glândula salivar cefálica de abelhas do NE1

4.2.3 Africanizada x Europeia

As abelhas são insetos altamente sociais, que apresentam divisão reprodutiva e cuidado cooperativo da cria. Entre as operárias, as tarefas são divididas em dois subgrupos, as abelhas campeiras, que coletam os recursos alimentares, e as abelhas que desempenham atividades no interior da colônia

(PETERS; ZHU-SALZMAN; PANKIW, 2010). Segundo Makela et al. (1993), em abelhas, somente as atividades nutriz e de limpeza são restritas à idade, sendo que as demais atividades desempenhadas pelas operárias possuem idades temporais flexíveis de acordo com a necessidade da colônia. O desempenho das atividades nas abelhas *Apis mellifera* é relacionado a uma determinada idade, sem, no entanto, ser restrito a essa idade (SEELEY, 1985; WINSTON, 1991). Porém, a execução ou mudança da realização de uma atividade desempenhada pelas abelhas operárias depende do desenvolvimento e das mudanças fisiológicas que ocorrem em suas glândulas (WINSTON, 1991).

As abelhas Africanizadas nos núcleos sem alimento conseguiram sobreviver aproximadamente 10 dias antes de iniciarem a atividade de forrageio. No entanto, essa restrição alimentar pode ter prejudicado o desenvolvimento das atividades e das estruturas observadas, uma vez que as abelhas de NA1 e NA2 apresentaram teores de proteínas das glândulas e cérebro inferiores aos das abelhas no verão, observando-se que os teores de proteínas foram maiores após as operárias dos núcleos iniciarem a atividade de forrageio. As abelhas obtêm no pólen lipídios, esteróis, vitaminas, minerais e alguns carboidratos (TODD; BETHERICK, 1942) e no néctar a principal fonte de carboidratos, porém o néctar pode conter alguns aminoácidos e lipídios (BAKER; BAKER, 1975). A ingestão de pólen é responsável pelo desenvolvimento da glândula hipofaríngea e aumento do peso seco nas abelhas (CRAILSHEIM et al., 1992).

A ausência de alimento em NA1 e NA2 também causou atrasos nos desempenhos das atividades das abelhas, prejudicando a glândula hipofaríngea, pois, quando foi detectada a presença dos ovos de operária poedeira, as abelhas em NA1 não conseguiram produzir geleia real para alimentar as larvas. A produção de geleia real pela glândula hipofaríngea está diretamente relacionada com os nutrientes encontrados no pólen (HRASSNIGG; CRAILSHEIM, 1998), com o desenvolvimento dos acinos dessa glândula ocorrendo com aproximadamente 24 horas após as abelhas iniciarem a ingestão de proteínas (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2010). Isso pode explicar o fato de os teores de proteínas na glândula hipofaríngea das abelhas estudadas serem maiores após as operárias terem iniciado a atividade de forrageio. Além disso, a ausência de larvas na colônia também prejudica o desenvolvimento dos acinos da glândula hipofaríngea (DEGRANDI-

HOFFMAN et al., 2010), pois as larvas enviam sinais químicos para as operárias que induzem a produção de geleia real (HUANG; OTIS; TEAL, 1989).

A glândula mandibular das abelhas estudadas apresentou maior teor de proteínas aos cinco dias de idade. Essa glândula também é importante para a alimentação das larvas das abelhas, uma vez que as larvas de até dois dias de idade são alimentadas com uma mistura de secreções das glândulas hipofaríngea e mandibular na proporção 1:1 (BEETSMA, 1979; BROUWERS; EBERT; BEETSMA, 1987).

As abelhas Africanizadas de NA3 e Europeias de NE1 conseguiram iniciar a realização das diferentes atividades para manutenção da colônia com cinco dias após a introdução das operárias no núcleo, no entanto, esses núcleos possuíam favo de mel, o que possibilitou que as abelhas tivessem energia para o desempenho dessas atividades. O mel fornece carboidratos, que são fontes de energia para as abelhas (WINSTON, 1991), porém a presença somente de alimentação energética no núcleo NE1 afetou o seu conteúdo proteico, como evidenciado pelos resultados de proteínas inferiores aos observados nos demais grupos de abelhas Europeias estudados. Essa redução do teor de proteínas em abelhas de NE1 pode ter ocorrido devido à ausência de alimento proteico nos primeiros dias após a emergência dos adultos, pois as abelhas necessitam iniciar a ingestão de proteínas imediatamente após a emergência (DIETZ, 1969; HAGEDORN; MOELLER, 1967).

Porém, tanto as abelhas Africanizadas nos três núcleos quanto as Europeias de NE1 não alimentaram as larvas dos ovos fecundados colocados nos núcleos. Uma explicação poderia ser a qualidade da geleia real produzida pelas operárias, que poderia não ser suficiente para o desenvolvimento das larvas de ovos fecundados, somente dos zangões, pois as larvas de zangões recebem alimento de qualidade proteica inferior à das larvas de operárias (BROUWERS; EBERT; BEETSMA, 1987; WINSTON, 1991). Segundo Jay (1970), as operárias diferenciam ovos de rainha dos de operária através dos voláteis presentes, sendo que os ovos de operárias possuem apenas 40 diferentes tipos enquanto que os de rainhas possuem entre 80 e 82 (KATZAV-GOZANSKY et al., 2003).

As abelhas Europeias de mesma idade apresentaram comportamento defensivo, levantando o abdômen, o que indica a exposição da glândula de Nasonov

(KOENIGER et al., 1996), e atividade de voo, assim que foram introduzidas no núcleo, diferenciando-se das abelhas Africanizadas, que apresentaram estes comportamentos após cinco dias de idade nas operárias em NA3 e aos 10 dias de idade em NA1. A exposição da glândula de Nasonov está associada ao recrutamento de operárias (FERNÁNDEZ; FARINA, 2001; FERNÁNDEZ et al., 2003; FREE, 1987) para a execução de atividades no interior (AL-KAHTANI; BIENEFELD, 2012) e no exterior da colônia (FERNÁNDEZ; FARINA, 2001; FERNÁNDEZ et al., 2003). Segundo Al-Kahtani; Bienefeld (2012), a glândula de Nasonov é importante para o recrutamento de abelhas a curta distância.

O crescimento da glândula salivar cefálica a partir dos cinco dias de idade nas abelhas de NE1 pode ter prejudicado o crescimento e funcionamento da glândula hipofaríngea, uma vez que as abelhas de NE1 tiveram maiores teores de proteínas da glândula salivar cefálica que as de NE2. No entanto, os teores proteicos na glândula hipofaríngea das operárias de NE2 foram superiores aos das abelhas de NE1. Essa diferença pode ter ocorrido pelo fato de as abelhas em NE2 terem sido transferidas para colônia com pólen e mel aos 10 dias de idade, e melhor nutrição dessas abelhas devido à presença de pólen estocado no favo, onde elas ficaram aprisionadas até o momento da introdução no núcleo. As abelhas diminuem a ingestão de proteínas quando iniciam a atividade de forrageio (CRAILSHEIM et al., 1992) e, conseqüentemente, ocorre a redução do tamanho da glândula hipofaríngea (MORITZ; CRAILSHEIM, 1987; CRAILSHEIM; STOLBERG, 1989; JIMENEZ; GILLIAM, 1989).

4.3 Controle de enxame zanganeiro em *Apis mellifera scutellata* (Africanizada)

No experimento, a oviposição pelas operárias foi observada aos 10 dias no núcleo 1 e 2 e aos 15 dias no núcleo 3. O tempo médio para o início da oviposição foi de $\pm 11,6$ dias após a retirada das rainhas. Em operárias de *A. mellifera* esse tempo pode variar entre 6 e 30 dias, de acordo com a subespécie (RUTTNER; HESSE, 1981; PAGE; ERICKSON, 1988; ROBINSON et al., 1990; WINSTON, 1999). O tempo necessário para a ativação do ovário das operárias depende dos estímulos recebidos por elas (BARRON; OLDROYD, 2001), e que são enviados pela colmeia, como ausência de feromônios produzidos pela cria

(WINSTON; HIGO; SLESSOR, 1998) e fatores nutricionais (JAY; NELSON 1973; LIN et al., 1999).

Após a introdução do quadro com pupas e ovos de rainha nas colônias zanganeiras, não houve rejeição dessas crias. As operárias são capazes de diferenciar ovos de rainha dos óvulos de operária através dos voláteis presentes nestes (JAY, 1970), os ovos e óvulos são marcados por voláteis oriundos da glândula de Dufour (RATNIEKS, 1995; MARTIN et al., 2002), havendo 82 diferentes voláteis nos ovos diplóides e 80 em haplóides nas posturas de rainha, em contraste com os óvulos de operárias que possuem apenas 40 diferentes tipos de voláteis (KATZAV-GOZANSKY et al., 2003).

Nos quadros introduzidos com ovos e crias operculadas, foi observada a formação de apenas uma realeira por colônia (Figura 64) e não foi observado desenvolvimento de larvas dos demais ovos existentes nestes quadros ou dos ovos das operárias poedeiras. Normalmente, se a colônia possui operárias em idade nutriz e perde a sua rainha, poderá ser observada uma grande quantidade de realeiras num período de 12-48 horas (WINSTON, 1991). Quanto menor o tempo que o enxame está órfão, maior será o número de realeiras encontradas (FELL; MORSE, 1984), pois a maior quantidade de realeiras aumenta as chances de sucesso na formação de uma nova rainha (HATCH; TARPY; FLETCHER, 1999). No entanto, para que ocorra a formação de novas rainhas, o enxame precisa ter ovos e/ou larvas com até três dias (FELL; MORSE, 1984; WINSTON, 1991). Essa idade máxima das larvas é devido ao fato de que, até os três dias de idade, tanto as larvas de rainhas quanto as de operárias recebem a mesma alimentação. Após esse período, as larvas que serão rainhas continuarão a receber geleia real, enquanto as que serão operárias receberão uma mistura de geleia real, pólen e mel (TOWNSEND; LUCAS, 1940). Assim, a alimentação diferenciada determina qual abelha será rainha e qual será operária (SCHMITZOVÁ et al., 1998).

Figura 64 - a e b. Realeiras em formação nos quadros introduzidos com ovos diplóides; c. células com óvulos que foram encontrados em outros quadros existentes nos enxames, durante o desenvolvimento das realeiras, porém sem a presença de larvas

As abelhas formaram a célula real no centro superior do quadro, provavelmente devido à disponibilidade de ovos viáveis existentes nos quadros introduzidos somente nessa área. Segundo Hatch; Tarpy; Fletcher (1999) as abelhas preferem construir as células de rainhas em ovos encontrados na periferia do quadro, devido ao maior espaço para a formação das realeiras; e em quadros localizados no centro da colônia, devido à melhor regulação térmica dessa área (FUKUDA; SAKAGAMI, 1968).

No entanto, nesse experimento, as operárias haviam passado da fase nutriz e todos os quadros que pudessem conter crias em diferentes estágios de desenvolvimento e a rainha haviam sido retirados, ficando apenas alimento nas colônias. A fase nutriz corresponde ao período em que a glândula hipofaríngea das abelhas possui maior desenvolvimento (KNECHT; KAATS, 1990) e produzem a maior parte de geleia real para a manutenção da colônia (CRAILSHEIM, 1991).

Provavelmente, como não havia grande disponibilidade desse alimento na colônia, as operárias concentraram a produção de geleia real no desenvolvimento de apenas uma rainha. A execução das atividades desenvolvidas pelas operárias é regulada pela necessidade da colônia, podendo uma abelha, independente da idade, acelerar, atrasar ou retornar a uma determinada tarefa (HUANG; ROBINSON, 1996). Porém, abelhas que desenvolvem a atividade de forrageio e possuem o atrofiamento da glândula hipofaríngea, ao desempenharem novamente a atividade de nutriz, não apresentam o mesmo cuidado com as larvas em comparação ao período que tinham o desenvolvimento glandular favorecendo a realização dessa tarefa (WINSTON, 1991).

No 10º dia após a retirada das rainhas, ainda não havia sido observado desenvolvimento das crias de operária, observando-se somente o desenvolvimento da realeira. As operárias que realizavam atividade de forrageio voltaram a desenvolver atividade como nutriz, isso foi possível devido à introdução dos ovos diplóides na colônia. Os feromônios contidos na postura de rainha podem incentivar a mudança fisiológica nas abelhas, fazendo com que retornem à atividade nutriz (HUANG; ROBINSON, 1996). A partir do 15º dia de observação, com a emergência de novas operárias, oriundas dos quadros que foram introduzidos nas colônias órfãs, foi constatada a presença de larvas oriundas de postura de operárias (Figura 65)

Figura 65 - Presença de larvas oriundas de postura de operárias

Com 30 dias após a retirada da rainha, as realeiras formadas já estavam operculadas (Figura 66), abrigando a pupa da nova rainha. Foi observado que, com a evolução do desenvolvimento das larvas nas realeiras, a postura de ovos

de operárias nas colônias foi sendo reduzida naturalmente. Essa redução pode ter ocorrido devido ao policiamento realizado pelas abelhas para controlar a oviposição das operárias na colônia (VISSCHER, 1996; WHITFIELD, 2002). As operárias responsáveis pelo policiamento localizam e destroem os óvulos postos por outras operárias, porque esses óvulos são menos relacionados geneticamente a elas em comparação com os ovos da rainha. Este comportamento é expresso em toda a colônia levando à supressão de auto-reprodução por operárias (FOSTER; RATNIEKS, 2000; 2001).

Figura 66 - Realeiras: a. com larva sendo alimentada e ainda não operculada; b. realeira operculada com abelha em fase de pupa

O surgimento de colônias zanganeiras é normalmente resultado da negligência e/ou do manejo inadequado do apicultor (ELBASSIOUNY, 2005). O manejo corretivo para esses casos envolve o deslocamento das abelhas para uma distância mínima de 100 metros do apiário, seguido da retirada de todas as abelhas da colmeia e a relocação desta no seu local no apiário. Desta maneira, as operárias não poedeiras conseguiriam retornar à colmeia, no entanto as poedeiras, devido ao peso do desenvolvimento do ovário, não conseguiriam retornar (WIESE, 2006; COUTO; COUTO, 2006). Os resultados obtidos nesse experimento nos permitem inferir que não são necessários manejos adicionais para o controle da oviposição das operárias, bastando a introdução dos ovos de rainha oriundas de outra colméia.

Essa aceitação, no entanto, está sujeita às condições do enxame, ou seja, de acordo com a diversidade de operárias de diferentes idades que compõem a colônia.

A introdução do quadro contendo pupas e pequena área de ovos é necessária para garantir a renovação das operárias e, conseqüentemente, a produção de geleia real para nutrir a nova rainha e larvas. O fato de as abelhas terem apenas puxado uma realeira por quadro/enxame enfatiza a necessidade da colônia ter indivíduos jovens que possam produzir alimento. Como o manejo normalmente utilizado para a recuperação de colônias zanganeiras é trabalhoso, normalmente os apicultores descartam os enxames nessas condições, aproveitando apenas as operárias não poedeiras, por meio de união de enxames, cera e alimentos que podem estar contidos na colmeia (WIESE, 2006).

4.4 Detecção do Vírus deformador de asas em *Apis mellifera* utilizando a técnica de PCR em tempo real

4.4.1 *Apis mellifera* scutellata (Africanizada)

O vírus deformador de asas de abelhas (DWV) foi detectado nas três amostras de abelhas Africanizadas oriundas do apiário em Piracicaba, São Paulo. A temperatura em que ocorreu a amplificação do fragmento do vírus DWV nas abelhas Africanizadas foi de 74,12 °C na colmeia 1, 78 °C na colmeia 2 e 74,42 °C para a colmeia 3 (Figura 67). No entanto, devido à degradação do DNA, causada durante o transporte das amostras do Brasil para o laboratório da Inglaterra, onde foi realizada a análise, não foi possível realizar a quantificação do vírus.

Figura 67 - Resultado positivo demonstrado pela curva de amplificação do fragmento do vírus DWV nas de abelhas Africanizadas

Piracicaba fica localizada na região Sudeste do Brasil, que, juntamente com a região Sul, possui as temperaturas mais baixas do país durante o inverno.

O DWV foi detectado previamente em abelhas de apiários localizados na cidade de Altinópolis, São Paulo (TEIXEIRA et al., 2008) e de Minas Gerais (ALMEIDA et al., 2009). A presença do vírus pode estar relacionada às condições ambientais, em lugares em que as abelhas estejam expostas a temperaturas mais frias, uma vez que o período em que os níveis deste vírus são mais altos em abelhas Europeias é durante o inverno, quando o enxame está mais vulnerável (HIGHFIELD et al., 2009).

Embora a presença do DWV tenha sido detectada em colônias de abelhas Africanizadas, até o momento não foram relatados casos de colônias que apresentem abelhas com as deformações causadas pelo vírus. Essa provável resistência das abelhas Africanizadas ao vírus pode ser devida à diversidade de

pasto apícola de que essas abelhas dispõem em regiões tropicais, uma vez que a disponibilidade de nutrientes no ambiente é um fator determinante do crescimento e sobrevivência do organismo (ALAUX et al., 2011), desempenhando papel fundamental no desenvolvimento de uma melhor resposta imune (FIELD; JOHNSON; SCHLEY, 2002). A qualidade e quantidade do pólen são responsáveis pelo aumento da resposta imune nas abelhas (ALAUX et al., 2010), além de ser a única fonte proteica desses insetos (ROUBIK, 1989).

A diversidade de pasto apícola de que as abelhas Africanizadas dispõem pode ser evidenciada por trabalhos de identificação de fontes polínicas onde foram encontrados entre 68 (SILVEIRA et al., 2012) e 81 (MODRO, 2011) diferentes tipos polínicos em amostras de pólen apícola somente no entorno do apiário onde foram coletadas as amostras de abelhas deste estudo.

Outro fator que pode contribuir para o não surgimento da doença em abelhas Africanizadas é o modo de transmissão do vírus nessas populações, já que o vírus está diretamente associado ao ácaro *Varroa destructor* (MARTIN, 2001; SUMPTER; MARTIN, 2004) e abelhas Africanizadas têm alta tolerância a infestações desse ácaro, provavelmente devida ao resultado de características de resistência pré-existentes que fortuitamente se juntaram na sua hibridação (MARTIN; MEDINA, 2004). O controle desse ectoparasita nas colônias de abelhas Africanizadas é favorecido pelo comportamento higiênico ou atratividade das crias ao ácaro (GUZMA'N-NOVOA; VANDAME; ARECHAVALETA, 1999). Chen; Pettis; Feldlaufer (2005) sugerem que a transmissão do vírus pode ocorrer por contaminação das rainhas para as crias; pois a presença do vírus nos espermatozoides torna possível a sua transmissão, durante o acasalamento, para as rainhas (FIEVET et al., 2006), porém essa rota de transmissão do patógeno não causa nenhum sintoma da infecção aguda viral (MIRANDA; GENERSCH, 2010). Já a transmissão por meio do ácaro lança o vírus diretamente na hemolinfa da abelha causando infecção aguda (MIRANDA; GENERSCH, 2010), provavelmente devido à maior incidência de diferentes cargas e estirpes de DWV (MARTIN et al., 2012). Além disso, o parasitismo de *V. destructor* às pupas de abelhas danifica o seu sistema imunológico, favorecendo a proliferação do vírus (GENERSCH; AUBERT, 2010). Sendo assim, a resistência das abelhas Africanizadas a esse ácaro pode favorecer o controle dos níveis de DWV, impedindo a manifestação da doença.

4.4.2 *Apis mellifera ligustica* (Europeia)

Os resultados do teste para detecção do DWV foram positivos nas abelhas com 0 e 30 dias, com amplificação do fragmento do vírus ocorrendo na temperatura de 80,08 °C e 80,23 °C respectivamente nas amostras (Figura 68), mostrando que o vírus estava presente nas duas amostras de abelhas. Esse vírus pode infectar as abelhas em diferentes estágios de desenvolvimento (CHEN; HIGGINS; FELDLAUFER, 2005) e, mesmo sem sintomas da doença, o vírus pode estar presente na população de abelhas (GAUTHIER et al., 2007).

Figura 68 - Resultado positivo demonstrado pela curva de amplificação do fragmento do DWV nas abelhas Europeias: a. resultados das abelhas recém-emergidas; b. resultado das abelhas com 30 dias de idade

Nas abelhas recém-emergidas foi ainda detectada a presença do vírus nas glândulas mandibular e salivar torácica (Figura 69), indicando que esse vírus pode ter afinidade com essas glândulas, que podem servir de rota de transmissão do vírus entre as abelhas e para larvas por meio de trofalaxia, pois o DWV pode ser transmitido para outras abelhas através do alimento contaminado (CHEN; EVANS; FELDLAUFER, 2006). A glândula mandibular, nas idades iniciais das operárias, está

envolvida na alimentação das crias (PLETTNER et al., 1990; WINSTON, 1999) e a glândula salivar torácica está envolvida na maturação e síntese do alimento (MAURIZIO, 1975) e secreções de umedecimento (SIMPSON, 1963). Um aspecto importante da dinâmica de infecções virais é a evolução da interação do patógeno com o hospedeiro, bem como o seu modo de transmissão, que pode determinar a disseminação e a persistência desse vírus em uma população, sendo a transmissão de vírus pela alimentação considerada uma via horizontal de disseminação desses seres (CHEN; EVANS; FELDLAUFER, 2006).

Figura 69 - Resultado positivo demonstrado pela curva de amplificação do fragmento do vírus DWV nas glândulas de abelhas Europeias recém-emergidas: a. resultado da glândula mandibular; b. resultado da glândula salivar torácica

Essa é a primeira detecção da presença do DWV em glândulas salivar cefálica e mandibular de abelhas Europeias, no entanto, essa detecção é suportada pela presença desse vírus em alimentos como mel e pólen (CHEN; EVANS; FELDLAUFER, 2006), uma vez que a glândula salivar torácica está diretamente relacionada com o processamento desses dois alimentos. O vírus foi detectado também em geleia real (SHEN et al., 2005; CHEN; EVANS; FELDLAUFER, 2006),

que é composta por secreções da glândula mandibular e hipofaríngea. A presença do DWV foi detectada anteriormente em tecidos digestivos e reprodutivos de rainhas e zangões (FIEVET et al., 2006) e em cérebro de operárias (SHAH; EVANS; PIZZORNO, 2009), mostrando assim que esse vírus tem um considerável grau de especificidade com determinados tecidos do corpo das abelhas (FIEVET et al., 2006).

As glândulas salivar cefálica, hipofaríngea e o cérebro apresentaram resultado negativo para a presença do vírus em abelhas recém-emergidas e, apesar de o DWV ter sido detectado na amostra de abelhas com 30 dias de idade, não foi detectada a sua presença nas glândulas e cérebro das abelhas.

A presença ou ausência do vírus nas partes estudadas pode estar relacionada à maneira como a abelha pode ter adquirido o vírus, bem como a carga e cepa viral adquirida por estas. No entanto, a relação entre o vírus e a doença que ele causa ainda não é bem conhecida, pois, normalmente, o DWV está associado a outras viroses (LANZI et al., 2006).

O DWV já foi detectado em abelhas forrageiras, bolotas de pólen, pólen armazenado na colônia e em mel, sugerindo que a rota primária de aquisição desse vírus seria por meio do pólen, contido no ambiente, que é transportado pelas abelhas campeiras para as colônias e, assim, contaminando as demais abelhas (SINGH et al., 2010), também podendo disseminar o vírus entre as plantas visitadas pelas abelhas durante a atividade de forrageio (CHILDRESS; RAMSDELL, 1987; BRISTOW e MARTIN, 1999).

A carga viral é baixa em abelhas que adquirem o patógeno via alimentação (CHEN et al., 2004) e maior quando a transmissão ocorre via ácaro *V. destructor* (BOWEN-WALKER; MARTIN e GUNN, 1999). Como as abelhas com 30 dias estariam desenvolvendo a atividade de forrageio, o meio de aquisição do vírus poderia ser a alimentação polínica e/ou do mel, o que poderia explicar a ausência do vírus nas glândulas e no cérebro.

4.5 Morfologia das glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro de abelhas Europeias sintomáticas para o vírus deformador de asas (DWV)

As abelhas coletadas apresentavam diferentes níveis de deformações das asas (Figura 70), que são características de abelhas que possuem infecção aguda causada pelo vírus deformador de asas (DWV) (MIRANDA; GENERSCH, 2010). Normalmente, os enxames apresentam os sintomas causados pelo DWV após colapso da colônia causado pela infestação do ácaro *V. destructor* (SUMPTER; MARTIN, 2004; TENTCHEVA et al., 2004), e na ausência do ácaro, o vírus persiste nas colônias de abelhas, porém com baixos níveis, com nenhum efeito prejudicial para a colônia (CHEN et al., 2005, 2006; YUE e GENERSCH, 2005).

Figura 70 - Abelhas *Apis mellifera ligustica* com deformações nas asas causadas pelo vírus DWV

Foi observado que as abelhas coletadas com os sintomas do DWV, ou seja, as deformações nas asas, possuem alterações morfológicas nas glândulas salivar torácica, salivar cefálica, hipofaríngea e mandibular, quando comparadas com abelhas que possuem o vírus, mas não a infecção (Figura 71).

Figura 71 - Glândulas do tórax e cabeça das abelhas sintomáticas (a-d) e assintomáticas (e-h) para infecções pelo DWV: a. salivar torácica; b. salivar cefálica; c. mandibular; d. hipofaríngea; e. salivar torácica; f. salivar cefálica; g. mandibular; h. hipofaríngea

As glândulas possuem um aspecto desuniforme, com os dutos captadores das glândulas e os acinos danificados. As unidades secretoras da glândula salivar torácica, os acinos das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea e o reservatório da glândula mandibular apresentaram rompimento dos tecidos, formando uma massa disforme, observando-se poucas estruturas intactas. A coloração também foi diferenciada, apresentando tom amarelado opaco e não o branco translúcido e vítreo que se observa em abelhas sadias. O cérebro das abelhas sintomáticas para DWV não apresentou aspecto diferente, quando comparado ao de abelhas assintomáticas (Figura 73), no entanto, o cérebro das sintomáticas possuía coloração amarelada e aspecto mais frágil, rompendo-se facilmente.

Figura 72 - Cérebro de abelhas *Apis mellifera ligustica* com deformação causada pelos vírus (a) e em abelhas sem deformações na asa (b)

Os acinos da glândula hipofaríngea tiveram área média de $0,0009 \text{ mm}^2$, muito reduzida quando comparada com as dos acinos de abelhas assintomáticas da mesma idade que apresentaram área média de $0,0216 \text{ mm}^2$. Os acinos da glândula salivar cefálica também apresentaram área reduzida, sendo a média de $0,001 \text{ mm}^2$, enquanto que em abelhas sem a doença com a mesma idade a média foi de $0,043 \text{ mm}^2$.

A deformação das glândulas prejudica a sobrevivência das abelhas e as impede de desenvolver as atividades necessárias para a manutenção da colmeia, pois estas atividades dependem do funcionamento do cérebro e das glândulas.

As glândulas e o cérebro das abelhas com os sintomas do vírus apresentaram alterações no teor de proteínas totais (Tabela 9) quando comparadas com os resultados de abelhas assintomáticas de mesma idade.

Tabela 9 - Média (1) dos teores de proteínas totais (2) de glândulas salivar torácica, cefálica, mandibular, hipofaríngea e cérebro em abelhas Europeia recém-emergidas sintomática a assintomática para o vírus deformador de asas

Abelhas	Parte estudada (3)				
	Cer	Mand	Sal. Cef	Sal. Tor.	Hipo
Sintomática	55,56 b	18,87 b	3,44 a	24,61 a	14,71 b
Assintomática	64,70 a	34,71 a	3,10 a	20,94 b	35,76 a

(1) Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

(2) Teores de proteínas em micrograma de proteína por glândula ($\mu\text{P/g}$)

(3) Parte estudada das abelhas: cérebro (Cer), glândula mandibular (Mand), glândula salivar cefálica (Sal. Cef), glândula salivar torácica (Sal. Tor), glândula Hipofaríngea (Hipo)

O cérebro em abelhas com infecção aguda possui teor de proteínas totais inferior ao de abelhas assintomáticas. No cérebro, o vírus se concentra nas neurópilas dos lobos ópticos, antenais e corpos de cogumelo (SHAH; EVANS; PIZZORNO, 2009). As infecções agudas causadas por DWV alteram a capacidade de resposta sensorial e o aprendizado olfativo das abelhas (IQBAL; MUELLER, 2007), causando déficit de aprendizado e aumento da agressividade (IQBAL; MUELLER, 2007; YUE; GENERSCH, 2005).

As glândulas mandibular, salivar torácica e hipofaríngea de abelhas sintomáticas apresentaram menores teores de proteínas, quando comparadas com as abelhas sem sintomas, ao passo que, na glândula salivar cefálica, não foi observada diferença estatística. O baixo teor de proteínas pode ter ocorrido devido ao rompimento dos reservatórios de secreção glandular e dos acinos dessas glândulas. Alguns tipos virais causam lise celular, possibilitando a sua disseminação pelo corpo do hospedeiro, gerando o comprometimento do hospedeiro, podendo causar a sua morte (PALLANCH; ROOS, 2001).

As abelhas com infecções agudas causadas por DWV não são viáveis e normalmente morrem em menos de 67 horas após a emergência (YANG; COX-FOSTER, 2007). A perda prematura de operárias impacta negativamente a colônia, pois essas abelhas deixam de contribuir para o crescimento do enxame (MIRANDA; GENERSCH, 2010). Além disso, a perda de abelhas operárias diminui a resistência da colônia frente às doenças, devido ao fato de as abelhas nutrizas não serem tão competentes imunologicamente para combater o aumento da exposição a

patógenos como as campeiras (WILSON-RICH; DRES; STARKS, 2008), sendo mais susceptíveis aos patógenos, causando um impacto negativo à sanidade da colônia, podendo causar sérios problemas, tais como o colapso de desordem da colônia (OLDROYD, 2007).

5 CONCLUSÕES

A avaliação do polietismo em abelhas *Apis mellifera*, subespécies Africanizada e Europeia, pelo teor de proteínas totais, apontou maior teor de proteínas no cérebro e glândulas salivar torácica, salivar cefálica, mandibular e hipofaríngea, compatíveis com a faixa etária em que as operárias encontram-se na idade que corresponde às fases nutriz e campeira.

As diferenças entre os picos de proteínas nas estruturas estudadas em abelhas Africanizadas e Europeias nas diferentes estações evidenciam a plasticidade na execução das atividades necessárias para o desenvolvimento da colônia.

A área dos acinos está diretamente relacionada com o conteúdo proteico obtido nas glândulas salivar cefálica e hipofaríngea em abelhas Africanizadas e Europeias.

As abelhas de mesma idade apresentaram capacidade de desempenho das diferentes atividades necessárias para o desenvolvimento de uma colônia. A nutrição das abelhas é um fator limitante para o desempenho de atividades, como a nutriz, que depende principalmente da produção de geleia real pelas glândulas hipofaríngea e mandibular.

O impacto que a ausência de alimento causa nas abelhas é evidenciado pelos baixos teores de proteínas totais obtidos no cérebro e glândulas salivar torácica, salivar cefálica, mandibular e hipofaríngea nos experimentos em que as abelhas sofreram restrição alimentar.

Em abelhas Europeias, além dos baixos teores de proteínas obtidos no cérebro e glândulas estudadas, devido à ausência de pólen nas idades iniciais das operárias, ocorreu alteração da área dos acinos das glândulas salivar cefálica e hipofaríngea. O não desenvolvimento dos acinos da glândula hipofaríngea, nos cinco primeiros dias de idade da abelha, possibilitou o desenvolvimento precoce dos acinos da glândula salivar cefálica.

O estado zanganeiro de uma colônia pode ser controlado pelas operárias, bastando ser introduzido um quadro com crias de rainha, retirado de outro enxame.

As abelhas Africanizadas testadas para o vírus deformador de asas de abelhas apresentaram resultados positivos, porém não foram observados sintomas causados pela infecção aguda desse vírus.

Apis mellifera ligustica mostrou susceptibilidade ao vírus deformador de asas.

REFERÊNCIAS

ABOITIZ, F. Does bigger mean better? Evolutionary determinants of brain size and structure. **Brain Behavior and Evolution**, Basel, v. 47, p. 225–245, May 1996.

AL-KAHTANI, S.N.; BIENEFELD, K. The nasonov gland pheromone is involved in recruiting honeybee workers for individual larvae to be reared as queens. **Journal Insect Behavior**, Columbia, v. 25, p. 392-400, July 2012.

ALIPPI, A.M.; LÓPEZ, A.C.; AGUILAR, O.M.A. PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 25–33, Sept. 2004.

ALMEIDA, F.C.; ALMEIDA, L.O.; AMARAL, I.M.R.; LUIZ, D.P.; JACOB, G.C.O.R.P.; SILVA, R.P.; BORGES, N.A.; KERR, W.E.; UEIRA-VIEIRA, C.; BONNETI, A.M.. Epidemiologia molecular em abelhas *Apis mellifera*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 56., 2010. Guarujá. **Anais...** Guarujá. 2010. Disponível em: < www.sbg.org.br> Acesso em: 5 Jun. 2012.

ALAUZ, C.; DUCLOZ, F.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology Letters**, London, v. 6, p. 562-565, Jan. 2010.

ARIAS, M.C.; SHEPPARD, W.S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 5, n. 3, p. 557-566, June 1996.

ARIAS, M.C.; SHEPPARD, W.S. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 37, n. 1, p. 25-35, Apr. 2005.

BAKER, H.G.; BAKER, I. Studies of nectar constitution and pollinator-plant coevolution. In: GILBERT, L.E.; RAVEN, P.H. (Ed.). **coevolution of animals and plants**. Austin, Texas: University of Texas Press, Sept. 1975. p. 100–140.

BAILEY, L.; CARPENTER, J.M.; WOODS, R D. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. **Journal of General Virology**, London, v. 43, p. 641–647, 1979.

BAILEY, L.; BALL, B.V. **Honey bee pathology**. London:Academic Press, Dec. 1991. 124p.

BARRON, A.B.; OLDROYD, B.P.; RATNIEKS, F.L.W. Worker reproduction in honey bees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 50, p. 199-208, Mar. 2001.

BEETSMA, J. Process of queen-worker differentiation in the honeybee. **Bee World**, Bucks, v. 60, p. 24–39, Sept. 1979.

BECARD, J.M.; CRAUSER, D.; SLESSOR, K.N.; ROBINSON, G.E. Regulation of behavioural maturation by a primer pheromone produced by adult worker honeybee. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, n.50 p. 17559–17564 Ago. 2004.

BOWEN-WALKER, P.L.; MAETIN, S.J.; GUNN, A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. **Journal of Invertebrate Pathology**, California, v. 73, p. 101–106, Jan. 1999.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An Analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, London, v. 26, n. 2, p. 211–252, Mar. 1964.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248–254, June 1976.

BRISTOW, P.R.; MARTIN, R.R. Transmission and the role of honeybees in field spread of blueberry shockilar virus, a pollen-borne virus of highbush blueberry. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 89, p. 124–130, Feb. 1999.

BROUWERS, E.V.M.; EBERT, R.; BEETSMA, J. Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 26, p. 11–23, June 1987.

CALATAYUD, F. **Historia de la apicultura**. Córdoba. Disponível em: <www.culturaapicola.com.ar>. Acesso em: 05 jun. 2005.

CARVALHO, C.M.S. **Diagnóstico mercadológico consolidado Projeto APIS – Sergipe**. Aracaju:SEBRAE-SE, dez 2005. 61p.

CHEN, Y.P.; SMITH, I.B.; COLLINS, A.M.; PETTIS, J.S.; FELDLAUFER, M.F. Detection of deformed wing virus infection in honey bees, *Apis mellifera* L., in the United States. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 144, p. 557–559, June 2004.

CHEN, Y.P.; HIGGINS, J.A.; FELDLAUFER, M.F. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 436–441, Jan. 2005.

CHEN, Y.P.; PETTIS, J.S.; FEUDLAUFER, M.F. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. **Journal of Invertebrate Pathology**, California, v. 90, p. 118–121, Oct. 2005.

CHEN, Y.P.; EVANS, J.; FELDLAUFER, M.F. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, California, v. 92, p. 152–159, July 2006.

CHEN, Y.P.; PETTIS, J.S.; COLLINS, A.; FELDLAUFER, M.F. Prevalence and transmission of honeybee viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 606–611, Jan. 2006.

CHILDRESS, A.M.; RAMSDELL, D.C. Bee mediated transmission of blueberry leaf mottle virus via infected pollen in highbush blueberry. **Journal of Invertebrate Pathology**, California, v. 77, p. 167–172, June 1987.

COLLET, T. **Estruturas genéticas das populações de abelhas Africanizadas (*Apis mellifera* L.) do Brasil e Uruguai determinada por meio de polimorfismos do DNA mitocondrial**. 2004. 66p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: Manejo e produtos**. 3. ed. Jaboticabal:FUNEP, 2006. 193p.

CRAILSHEIM, K.; STOLBERG, E. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 35, p. 595-602, June 1989.

CRAILSHEIM, K. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Comparative Physiology**, Oxford, v.161, p. 55-60, Mar. 1991.

CRAILSHEIM, K.; SCHNEIDER, H.W.; HRASSNIGG, N.; BÜHLMANN, G.; BROSCHE, U.; GMEINBAUER, R.; SCHÜFFMANN, P. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 40-19, June 1992.

CRAILSHEIM, K. Protein synthesis in the honeybee (*Apis mellifera* L.) and trophallactic distribution of jelly among imagos in laboratory experiments. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v.94, p. 303-312, June 2001.

CRUZ-LANDIM, C.; AKAHIRA, Y. Influências da alimentação no desenvolvimento de algumas glândulas do *Trigona* (*Scaptotrigona*) *postica* Latr. (Hymenoptera, Apoidea). **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 19, n.25, p. 63-78, Ago.1966.

CRUZ-LANDIM, C. Polimorfismo na ocorrência de glândulas exócrinas nas abelhas (Hymenoptera, Apoidea). In: ENCONTRO DE ABELHAS, 1., 1994. Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, Mar 1994. p.118.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: Morfologia e função de sistemas**. São Paulo:Editora UNESP, 2008. 408p

DADE, H.A. **Anatomy and Dissection of the Honeybee**. London:International Bee Research Association, 1962, 158p.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; HUANG, E.; HUANG, M.H. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, p. 1184–1191, Mar. 2010.

DE GRAAF, D.C.; ALIPPI, A.M.; BROWN, M.; EVANS, J.D.; FELDLAUFER, M.F.; GREGORC, A.; HORNITZKY, M.; PERNAL, S.F.; SCHUCH, D.M.T.; TITERA, D.; TOMKIES, V.; RITTER, W. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 43, p. 583–590, Dec. 2006.

DE GRAAF, D.C.; BRUNAIN, M.; IMBERECHTS, H.; JACOBS, F. First molecular confirmation of deformed wing virus infections of honeybees from a Belgian apiary reveals the presence of black queen cell virus and *Varroa destructor* virus 1. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, Vlaams Diergen, v. 78, p.101-105, June 2008.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, Bucks, v. 77, p. 67-70, Feb. 1996.

DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the thoracic labial gland of *Apis mellifera carnica* Pollm. workers (Hymenoptera, Apidae). **Belgian Journal of Zoology**, Belgica, n. 134 (supplement 1) p. 55-59, Mar. 2004.

DEVILLERS, J. The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. In: Devillers, J. **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. (Ed.). Minh-Hà Pham-Delègue, Sept. 2002., p. 1-11.

DIETZ, A. Initiation of pollen consumption and pollen movement through the alimentary canal of newly emerged honey bees. **Annals of the Entomological Society of America**, Maryland, v. 62, p. 43-46, Jan. 1969.

DURST, C.; EICHMULLER, S.; MENZEL, R. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. **Behavioral and Neural Biology**, New York, v. 62, p. 259 –263, Nov. 1994.

ELBASSIOUNY, A.M. Occurrence of laying workers at different honey bees colonies status. Arab Universities. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 13, p. 513-519, Abr. 2005.

FAHRBACH, S.E.; FARRIS, S.M.; SULLIVAN, J.P.; ROBINSON, G.E. Limits on volume changes in the mushroom bodies of the honey bee brain. **Journal of Neurobiology**, New York, v. 57, n. 2, p.141-151, Nov. 2003.

FARRAR, C.L. The overwintering of productive colonies. In: _____ **The Hire and the Honey Bee**. Hamilton; Dadant, 1963. p. 341.

FARRIS, S.M.; ROBINSON, G.E.; FAHRBACH, S.E. Experience and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 21, p. 6395– 6404, Aug. 2001.

FERNÁNDEZ, P.C.; FARINA, W.M. Changes in food source profitability affect Nasonov gland exposure in honeybee foragers *Apis mellifera* L. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 48, p. 366-371, 2001.

FERNÁNDEZ P.C.; GIL, M. FARINA, W.M. Reward rate and forager activation in honeybees: recruiting mechanisms and temporal distribution of arrivals. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 54, p. 80-87, 2003.

FIELD, C.J.; JOHNSON, I.R.; SCHLEY, P.D. Nutrients and their role in host resistance to infection. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 71, p. 16-32, Jan. 2002.

FIEVET, J.; TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; MIRANDA, J.; COUSSERANS, F.; COLIN, M.E.; BERGOIN, M. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. **Virology Journal**, Washington, v. 3, n. 16, p.1-5, Mar. 2006.

FOSTER, K.; RATNIEKS, F. Facultative worker policing in a wasp. **Nature**, Paris, v. 407, p. 692-693, Oct. 2000.

FOSTER, K.; RATNIEKS, F. Convergent evolution of worker policing by egg eating in the honeybee and common wasp. **Proceedings of the Royal Society London B**, London, v. 268, p. 169-174, Jan. 2001.

FREE, J. B. **Pheromones of social bees**. London, UK, :Chapman & Hall, feb 1987. 236p.

FUJITA, T.; KOZUKA-HATA, H.; UNO, Y.; NISHIKORI, K.; MORIOKA, M.; OYAMA, M.; KUBO, T. Functional analysis of the honeybee (*Apis mellifera* L.) salivary system using proteomics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, n. 397, p. 740–744, June 2010.

FUKUDA, H.; SAKAGAMI, S.F. Worker brood survival in honey-bees. **Reseraches on Population Ecology**, Soporó, v.10, p. 31–39, June 1968.

GAUTHIER, L.; TENTCHEVA, D.; TOURNAIRE, M.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; COLIN, M.E.; BERGOIN, M. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. **Apidologie**, Versailles, v. 38, p. 426–435, Sept. 2007.

GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 42, p. 611–643, Jan. 1997.

GIURFA, M.; MENZEL, R. Insect visual perception: complex abilities of simple nervous systems. **Current Opinion in Neurobiology**, London, v. 7, p. 505-513, July 1997.

GIURFA, M. Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. **Current Opinion in Neurobiology**, London, v. 13, p. 726-735, Dec. 2003.

GONÇALVES, L.S. Africanização das abelhas nas Américas, impactos e perspectivas de aproveitamento do material genético. **Naturalia**, São Paulo, p. 126-134, Mar. 1992.

GONÇALVES, L.S. 50 Anos de Abelhas Africanizadas no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 16., 2006, Aracaju. **Anais...** Aracaju. 1CD-ROM, 2006.

GOVAN, V.A.; ALLSOPP, M.H.; DAVISON, S.A. PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2243–2245, May 1999.

GRONENBERG, W.; COUVILLON, M.J. Brain composition and olfactory learning in honey bees. **Neurobiology of Learning and Memory**, Orlando, v. 93, p. 435–443, Mar. 2010.

GUZMA'N-NOVOA, E.; VANDAME, R.; ARECHAVALETA, M.E. Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera*) to *Varroa destructor* in Mexico. **Apidologie**, Versailles, v. 30, p. 173–182, Feb. 1999.

HAGEDORN, H.H.; MOELLER, F.E. The rate of pollen consumption by newly emerged honeybees. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 6, p. 159-162, Jan. 1967.

HARTLEY, H.O. The use of range in analysis of variance, **Biometrika**, Oxford, v. 37, p.271–280, Nov. 1950.

HATCH, S.; TARPY, D.R.; FLETCHER, D.J.C. Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality **Insectes Sociaux**, Basel, v. 46, p. 372 – 377, Mar. 1999.

HIGHFIELD, A.C.; EL NAGAR, A.; MACKINDER, L.C.M.; NOE, L.M.L.J.; HALL, M.J.; MARTIN, S.J.; SCHROEDER, D.C. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. **Applied and Environmental Microbiology**, London, v. 75, n. 22, p. 7212–7220, Nov. 2009.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies**. New York:W.W. Norton & Company, 2008. 544p.

HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 44, p. 929–939, Oct. 1998.

HUANG, Z.Y.; OTIS, G.M.; TEAL, P.E.A. Nature of brood signal activating of protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera). **Apidologie**, Versailles, v. 20, p. 455-464, June 1989.

HUANG, Z.Y.; ROBINSON, G.E.; BORST, D.W. Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 174, p. 731–739, Dec. 1994.

HUANG, Z.Y.; ROBINSON, G.E. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 39, p. 147–158, May 1996.

HUANG, Z.Y.; ROBINSON, G.E. Social control of division of labor in honey bee colonies. In: DETRAIN, C.; DENEUBOURG, J.L.; PASTEELS, J.M. **Information processing in social insects**. Birkhäuser, Basel, 1999. p. 165–186.

IQBAL, J.; MULLER, U. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. **Proceedings of the Royal Society B**, Edinburgh, v. 274, p. 1517–1521, June 2007.

JAWLOWSKI, H. Nerve tracts in bees (*Apis mellifera*) running from the sight and antennal organs to the brain. **Annalis Universitatis Mariae Curie-Sklodowska**, Lublin - Polônia, v.12, p. 307–323, section D, Dec 1957.

JAY, S.C. The effect of various combinations of immature queen and worker bees on the ovary development of worker honeybees in colonies with and without queens. **Canadian Journal of Zoology**, Quebec, v. 48, p. 169–173, Jan. 1970.

JAY, S.C.; NELSON, E.V. The effects of laying worker honeybees (*Apis mellifera* L.) and their brood on the ovary development of other worker honeybees. **Canadian Journal of Zoology**, Quebec, v. 51, p. 629–632, June 1973.

JIMENEZ, D.R.; GILLIAM, M. Age-related changes in midgut ultrastructure and trypsin in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, Versailles, v. 20, p. 287–303, May 1989.

KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V.; IONESCU, A.; ROBINSON, G.E.; HEFETZ, A. Task related chemical analysis of labial gland volatile secretion in worker honeybees (*Apis mellifera* Ligustica), **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, n. 5, p. 919–926, Jan. 2001.

KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V.; KAMER, J.; SCHULZ, C.M.; FRANCKE, W.; HEFETZ, A. Ultrastructural and chemical characterization of egg surface of honeybee worker and queen-laid eggs. **Chemoecology**, Basel, v. 13, p. 129–134, Jan. 2003.

KERR, W.E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, Modderfontein, v. 2, p. 3–5, Oct. 1967.

KNECHT, D.; KAATZ, H.H. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. **Apidologie**, Versailles, v. 21, p. 457–468, Sept. 1990.

KOENIGER, N.; KOENIGER, G.; GRIES, M.; TINGEK, S.; KELITU, A. Observations on colony defense of *Apis nuluensis* Tingek, Koeniger and Koeniger, and predatory behavior of the hornet, *Vespa multimaculata* Pérez. **Apidologie**, Versailles, v. 27, p. 341-352, Nov. 1996.

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantitation. In: **The protein protocols handbook**. 2. ed. Totowa, NJ.:Humana Press, 2002. p.15-21.

KUCHARSKI, R.; MALESZKA, R. A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. **Naturwissenschaften**, Chief Lake, v. 85, p. 343–346, July 1998.

LANZI, G.; MIRANDA, J.R.; BOMIOTTI, M.B.; CAMERON, C.E.; LAVAZZA, A.; CAPUCCI, L.; CAMAZINE, S.M.; ROSSI, C. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 10, p. 4998–5009, May 2006.

LAURO, F.M.; FAVARETTO, M.; COVOLO, L.; RASSU, M.; BERTOLONI, G. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, p.195–201, Mar. 2003.

LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, Paris, v. 27, n. 2, p. 499-510, Feb. 2008.

LIN, H.; WINSTON, M.L.; HAUNERLAND, N.H.; SLESSOR, K.N. Influence of age and population size on ovarian development, and of trophallaxis on ovarian development and vitellogenin titres of queenless worker honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Canadian Entomology**, Quebec, v. 131, p. 695–706, Abr. 1999.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔT} method. **Methods**, Foster City, v. 25, p. 402–408, Dec. 2001.

MAKELA, M.E.; ROWELL, G.A.; SAMES IV, J.W.; WILSON, L.T. An object-oriented intracolony and population level model of honey bees based on behaviors of European and Africanized subspecies. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 67, p. 259-284, June 1993.

MATIS, J.H. The spread of the Africanized honey (or 'killer') bee. **Biomedical Bulletin**, Victoria, v.8, n.4, p.8-9, July 1991.

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

MARTIN, S.J. The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: a modelling approach. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 38, p. 1082–1093, Mar. 2001.

MARTIN, S.J.; JONES, G.R.; CHALINE, N.; MIDDLETON, H.; RATNIEKS, F.L.W. Reassessing the role of the honeybee (*Apis mellifera*) Dufour's gland in egg marking. **Naturwissenschaften**, Chief Lake, v.89, p. 528–532, Apr. 2002.

MARTIN, S.J.; MEDINA, L.M. Africanized honeybees have unique tolerance to varroa mites. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 112-114, Mar. 2004.

MARTIN, S.J.; HIGHFIELD, A.C.; BRETTEL, L.; VILLALOBOS, E.M.; BUDGE, G.E.; POWELL, M.; NIKAIIDO, S.; SCHROEDER, D.C. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. **Science**, Washington, v. 336, p. 1304-1306, June 2012.

MATTILA, H.R.; H. REEVE, H.K.; SMITH, M.L. Promiscuous honey bee queens increase colony productivity by suppressing worker selfishness. **Current Biology**, London, v.22, p. 2027-2031, Sept. 2012.

MENZEL, R.; GEIGER, K.; CHITTKA, L. ;JOERGES, J.; KUNZE, J.; MULLER, U. The knowledge base of bee navigation. **Journal of Experimental Biology**, Berlin, v.199, p. 141-146, June 1996.

MENZEL, R.; LABOULLE, G.; EISENHARDT, D. Small brains, bright minds. **Biology of the Cell**, Paris, v. 124, p. 237-239, Jan. 2006.

MIRANDA, J.R.; GENERSCH, E. Deformed wing virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, p. 48–61, Aug. 2010

MODRO, A.F.H.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C. Origem botânica de cargas de pólen de colmeias de abelhas africanizadas em Piracicaba, SP. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p.1944-1951, Nov. 2011.

MORITZ, B.; CRAILSHEIM, K. Physiology of protein digestion in the mid gut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, Graz, v. 33, p. 923-993, May 1987.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335–350, Feb. 1987.

NAKAMURA, M.; TADA, Y.; AKAISHI, T.; NAKATA, K.; M3 muscarinic receptor mediates regulation of protein secretion in rabbit lacrimal gland. **Current Eye Research**. Zug, v. 16, p. 614–619, Feb. 1997.

NOGUEIRA-NETO, P. The spread of a fierce of African bee in Brazil. **Bee World**, Bucks, v.45, p.119-121, Oct. 1964.

OLDROYD, B.P. What's killing American honey bees? **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, p. 1195–1199, June 2007.

OLIVEIRA, M.C.S; REGITANO, L.C.A.; ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M.M.; SCAGLIUSI, S.M.M.; TIMÓTEO, W.H.B.; JARDIM, S.N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de ampliação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase**. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2007. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacaogratis/e-books/LVFund.DNA.pdf>> Acesso em: 10 set 2011.

OTIS, G.W.; WHEELER, D.E.; BUCK, N.; MATTILA, H.R. Storage proteins in winter honey bees. **Apiacta**, Bucarest, n.38, p.352-357, Oct. 2004.

PAGE, R.E.; ERICKSON, E.H. Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 23, p. 117-126, May 1988.

PALLANCH, M.; ROOS, R. Enteroviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIP, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields virology**. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, v.1, June 2001. p. 589-631.

PEGORARO, A.; ZILLER, S.R. Valor apícola das espécies vegetais de duas fases sucessionais da floresta ombrófila mista, em União da Vitória Paraná – Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.47, p.69-82, jul 2003.

PETERS, L.; ZU-SALMAN, K.; PANKIW, T. Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.5, p. 132–137, Oct. 2010.

PLETTNER, E.; OTIS, G.W.; WIMALARATNE, P.D.C.; WINSTON, M.L.; SLESSOR, K.N.; PANKIW, T.; PUNCHIHEWA, P.W.K. Species and caste determined mandibular gland signals in honeybees (*Apis*). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 2, p. 363-377, Feb. 1997.

PEREIRA, F.M.; VILELA, S.L.O. **Estudo da cadeia produtiva do mel do Estado de Alagoas**. Maceió:SEBRAE-AL, abr 2003. 49p.

POIANI, S.B.; CRUZ-LANDIM, C. Morphological changes in the cephalic salivary glands of females and males of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 35 p.249–255, June 2010.

PORTUGAL-ARAÚJO, V. The Central African bee in South America. **Bee World**, Bucks, v.52, p.116-121, Fev. 1971.

RATNIEKS, F.L.W. Evidence for a queen-produced egg-marking pheromone and its use in worker policing in the honey bee. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 34, p. 31-37, Jan. 1995.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RIBIÉRE, M.; BALL, B.V.; AUBERT, M. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In: AUBERT, M. todos et al. (Ed.). **Virology and the honey bee**. Luxembourg:European Communities, may 2008. p. 15–84.

ROBINSON, G.E. Regulation of division of labor in insect societies. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 637– 665, Jan. 1999.

ROCHA, T.; CAETANO, F.H. Ultrastruture of the thoracic salivary glands of *Polistes versicolor* (OLIVIER, 1791) (Hymenoptera, Vespidae). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 59-64, Oct. 2004.

ROTH, C. **Coomassie brilliant blue and mechanisms of protein staining and Bradford-assay**. Disponível em: < http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/Coomassie_E.pdf >. Acesso em: set 2012.

RYBA S.; TITERA D.; HAKLOVA M.; STOPKA P. A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 1-2, p. 193-196, Sept. 2009

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARMHEIM, N. **Science**, Washington, v. 230, p. 1350–1354, Dec. 1985.

SALLES, H.C.; CRUZ-LANDIM, C. Effect of the Juvenile Hormone on the Development the mandibular gland in workers' pupae of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 64, n. 3B, p. 691-695, Aug. 2004.

SAPAN, C.V.; LUNDBLAD, R.L.; PRICE, N.C. Colorimetric protein assay techniques. **Biotechnology Application in Biochemical**, Chief Lake, v. 29, p. 99–108, Apr. 1999.

SCHMITZOVÁ, J.; KLAUDINYA, J.; ALBERTA, S.; SCHRÖDERB, W.; SCHRECKENGOSTC, W.; HANESA, J.; JÚDOVÁ, J.; SIMÚTH, J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 54, p. 1020–1030, Sept. 1998.

SCHÖNITZER, K.; SEIFERT, P. Anatomy and ultrastructure of the salivary gland in the thorax of the honeybee worker, *Apis mellifera* (Insecta, Hymenoptera). **Zoomorphology**, Berlin, n. 109, p. 211- 222, Mar. 1990.

SCHULZ, D.J.; ROBINSON, G.E. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the anten-nal lobes and age related changes in the mush-room bodies. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 184, p. 481– 488, June 1999.

SEELEY, T.D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v.11, n. 4, p.287-293, Oct. 1982

SEELEY, T.D.; VISSCHER, P.K. Survival of honey bees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction. **Ecological Entomology**, London, v. 10, p. 81-88, Mar. 1985.

SHAH, K.S.; EVANS, E.C.; PIZZORNO, M.C. Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus. **Virology Journal**, London, v. 6, n. 182, p.1-7, Oct. 2009.

SHEN, M.; COX-FOSTER, D.; CUI, L. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. **Virology**, London, v. 342, p.141–149, Nov. 2005.

SHEN, M.; CUI, L.; OSTIGUY, N.; COX-FOSTER, D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. **Journal of General Virology**, London, v. 86, p. 2281–2289, Aug 2005.

SILVA, W.P. **Manual de comercialização apícola**. Maceió:SEBRAE-AL, abr 2001. 83p.

SILVEIRA, T.A.; CORREIA-OLIVEIRA, M.E.; MORETI, A.C.C.C.; OTSUK, I.P.; MARCHINI, L.C. Botanical origin of protein sources used by honeybees (*Apis mellifera* L.) in Atlantic Forest. **Sociobiology**, California, v. 59, n. 4, p. 1-10, Apr. 2012.

SIMPSON, J. The functions of the salivary glands of *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 4, p.107-121, Jan. 1960.

SIMPSON, J. The source of the saliva honeybees use to moisten materials they chew with their mandibles. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 2, p. 115-116, Apr. 1963.

SINGH, R.; LEVITT, A.L.; RAJOTTE, E.G.; HOLMES, E.C.; OSTIGUY, N.; VAN ENGELSDORP, D.; LIPKIN, W.I.; PAMPHILIS, C.W.; TOTH, A.L.; COX-FOSTER, D. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. **Plos One**, San Francisco, v. 5 n. 12, p. 1-16, Dec. 2010.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the honey bee**. New York:Comstock Publishing Associates, May 1956. 334p.

SOUTHWICK, E.E.; ROUBIK, D.W.; WILLIAMS, J.M. Comparative energy balance in groups of Africanized and European boneybees: ecological implications. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, New York, v. 97, n. 1, p. 1-7, Oct. 1990.

SULLIVAN, J.P.; JASSIM, O.; FAHRBACH, S.E.; ROBINSON, G.E. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. **Hormones and Behavior**, New York, v. 37, p. 1–14, Mar. 2000.

SUMPTER, D.; MARTIN, S.J. The dynamics of virus epidemics in Varroa infested honey bee colonies. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 73, p. 51–63, Jan. 2004.

TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; ZAPPULLA, N.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; COLIN, M.E.; BERGOIN, M. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 70, p. 7185–7191, Dec. 2004.

TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; BAGNY, L.; FIEVET, J.; DAINAT, B. COUSSERANS, F.; COLIN, M.E.; BALL, B.V.; BERGOIN, M. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor* 1. **Apidologie**, Versailles, v. 37, p. 41–50, Dec. 2006.

TODD, F.E.; BETHERICK, O. The composition of pollens. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.35, p. 312–317, Sept. 1942.

TOFILSKY, A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminant three honeybee subspecies. **Apidologie**, Versailles, v.38, p. 538-563, Sept–Oct. 2008.

TOWNSEND, G.F.; LUCAS, C.C. The chemical nature of royal jelly. **Biochemical Journal**, London, v. 34, n. 8/9, p. 1155–1162, May 1940.

TRINDADE, M.S.A.; SOUZA, A.H.; VASCONCELOS, W.E.; FREITAS, R.S.; SILVA, A.M.A.; PEREIRA, D.S.; MARACAJÁ, P.B. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Mossoró, v.4, n.1, p. 1-10, Jan. 2004.

VALLET, A. CASSIER, P. LENSKEY, Y. Ontogeny of the fine structure of the mandibular glands of the honeybees (*Apis mellifera* L.) workers and the pheromonal activity of 2-heptanone. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.37, p.789-804, Feb. 1991.

VELTHUIS, H.H.W. Observations on the transmission of queen substances in the honey bee colony by the attendants of the queen. **Behaviour**, London, v. 41, p. 2-22, Oct. 1972,

VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações. Disponível em:< www.etall.hpg.com.br>. Acesso em: 25 Jul. 2011.

VILELA, S.L.O. **Cadeia Produtiva do Mel no Estado do Piauí**. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2000. 121p.

VISSCHER, P.K. Reproductive conflict in honey bees: a stalemate of worker egg-laying and policing. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 39, p. 237-244, May. 1996.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 4th.ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2011. 1.515p.

WANG, D.I.; MOELLER, F.E. Ultrastructural changes in hypopharyngeal glands of honey bees infected by *Nosema apis*. **Journal of invertebrate Pathology**, Chief Lake, n.17, p.308-320, May 1971.

WANG, A.M.; DOYLE, M.V.; MARK, D. F. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Washington, v. 86, p. 9717-9721, Dec. 1989.

WRAY, M.K.; MATTILA, H.R.; SEELEY, T.D. Collective personalities in honeybee colonies are linked to colony fitness. **Animal Behaviour**, London, v. 81, p. 559-568, Mar. 2011.

WEI, C.A.; RAFALKO, S.L.; DYER, F.C. Deciding to learn: modulation of learning flights in honeybees, *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v.188, p. 725–737, Sept. 2002.

WITHERS, G.S.; FAHRBACH, S.E.; ROBINSON, G.E. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. **Nature**, Paris, v. 364, p. 238–240, Apr. 1993.

WHITFIELD, J. Social insects: the police state. **Nature**, Paris, v. 416, p. 782-784, Apr. 2002.

WIESE, H. **Apicultura – Novos Tempos**. 2 ed. Guaíba, RS: Agrolivros, 2005. 378p.

WILLIAMS, I.H.; CORBET, S.A.; OSBORNE, J.L. Beekeeping, wild bees and pollination in the European community. **Bee World**, Cardiff, v. 72, p. 170-180, Aug. 1991.

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

WINSTON, M.L.; HIGO, H.A.; SLESSOR, K.N. Effect of various dosages of queen mandibular gland pheromone on the inhibition of queen rearing in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 83, p. 234–238, Dec. 1990.

WINSTON, M.L. **The biology of the honey bee**. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1991. 281p.

WINSTON, M.L. The Biology and Management of Africanized Honeybees. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.37, p.173-193, Jan. 1992.

WINSTON, M.L.; SLESSOR, K.N. Honey bee primer pheromones and colony organization: gaps in our knowledge. **Apidologie**, Versailles, 29, p. 81-95, Sept. 1998.

YANG, X.; COX-FOSTER, D. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge, **Parasitology**, London, v. 134, p. 405–412, Nov. 2007.

YUE, C.; GENERSCH, E. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). **Journal of General Virology**, Basingstoke, v. 86, p. 3419–3424, Dec. 2005.

YUE, C.; SCHRODER, M.; GISDER, S.; GENERSCH, E. Vertical transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of General Virology**, Basingstoke, v. 88, p. 2329–2336, Aug. 2007.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, Jun. 1998.

ZHANG, S.; SHWARZ, S.; PAHL, M.; ZHU, H.; TAUTZ, J. Honeybee memory: a honeybee knows what to do and when. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, p. 4420-4428, Nov. 2006.

APÊNDICES

Dados das análises estatísticas realizadas para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de 0 (recém-emergidas) a 30 dias nas estações Inverno, Primavera e Verão.

Análise de variância para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de 0 (recém-emergidas) a 30 dias nas estações Inverno, Primavera e Verão

Fonte de Variação	GL	SM	MQ	Valor de F	Pr>F
Parte estudada	14	83582.80285	5970.20020	17267.5	<.0001
Idade	6	4469.54567	744.92428	2154.53	<.0001
Parte estudada*Idade	84	17583.25727	209.32449	605.43	<.0001
Erro		0.999317			
CV		3.303245			

Análise de variância para os resultados transformados (1) de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de 0 (recém-emergidas) a 30 dias nas estações Inverno, Primavera e Verão

Fonte de Variação	GL	SM	MQ	Valor de F	Pr>F
Parte estudada	14	1042.987987	74.499142	14765.4	<0.0001
Idade	6	52.520963	8.753494	1734.91	<0.0001
Parte estudada*Idade	84	181.946300	2.166027	429.30	<0.0001
Erro		0.999178			
CV		1.917674			

(1) $T_{prot} = \sqrt{prot}$

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de 0 (recém-emergidas) até 30 dias nas estações Inverno, Primavera e Verão

(continua)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Cérebro Inverno	00	3.8646088	0.0468890	3.8105118	3.8935845
	05	3.9776881	0.0446727	3.9344631	4.0236799
	10	4.5605348	0.0477906	4.5066617	4.5978256
	15	3.9735849	0.0305803	3.9382737	3.9912404
	20	4.2106818	0.0154370	4.1952354	4.2261093
	25	7.0289548	0.0263129	6.9985713	7.0441465
	30	4.4713367	0.0268622	4.4452222	4.4988888
Cérebro Primavera	00	6.5810334	0	6.5810334	6.5810334
	05	8.5307189	0.0158677	8.5129313	8.5434185
	10	8.3910667	0	8.3910667	8.3910667
	15	9.0384134	0.0249993	9.0122139	9.0620086
	20	8.3783762	0.0649557	8.3300660	8.4522186
	25	7.4732296	0.1767991	7.2739260	7.6111760
	30	8.8657158	0.1347901	8.7704048	8.9610267
Cérebro Verão	00	4.6499756	0.0398838	4.6119410	4.6914816
	05	4.9702132	0.0216996	4.9457052	4.9869831
	10	5.5509217	0.0300361	5.5172457	5.5749439
	15	6.5339707	0.1563780	6.4233947	6.6445466
	20	5.4021139	0.1604624	5.2239832	5.5353410
	25	5.9764118	0.0935575	5.8685603	6.0357270
	30	4.6767354	0.0471063	4.6260134	4.7191101
Hipofaríngea Inverno	00	2.4514106	0.0296468	2.4207437	2.4799194
	05	4.2941716	0.0116437	4.2825226	4.3058100
	10	4.2777996	0.0254091	4.2485292	4.2941821
	15	4.1210432	0.0224510	4.0951190	4.1340053
	20	4.1594496	0.0588904	4.0951190	4.2107007
	25	3.8126842	0.0125962	3.8013156	3.8262253
	30	3.9016922	0.0140430	3.8935845	3.9179076

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de 0 (recém-emergidas) até 30 dias nas estações Inverno, Primavera e Verão

(continuação)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Hipofaríngea Primavera	00	1.7606817	0	1.7606817	1.7606817
	05	7.2034656	0.0111691	7.1930522	7.2152616
	10	7.7756955	0.0532828	7.7369245	7.8364533
	15	8.0997762	0.0737470	8.0386566	8.1816869
	20	4.7937459	0	4.7937459	4.7937459
	25	5.6711702	0.0417507	5.6391489	5.7183914
	30	3.6670348	0.0654523	3.6013886	3.7322915
Hipofaríngea Verão	00	3.0128429	0.0645509	2.9698485	3.0870698
	05	3.5732061	0.0574241	3.5071356	3.6110940
	10	4.7770301	0.1580354	4.5945620	4.8703183
	15	4.3011626	0	4.3011626	4.3011626
	20	3.5396390	0.0378669	3.5156792	3.5832946
	25	3.5079275	0.1291022	3.3615473	3.6055513
	30	3.3275300	0.0362834	3.2939338	3.3660065
Mandibular Inverno	00	1.9021749	0.0871538	1.8055470	1.9748418
	05	1.6772469	0.1423522	1.5132746	1.7691806
	10	1.5894525	0.0214788	1.5652476	1.6062378
	15	0.2707702	0.1225776	0.2000000	0.4123106
	20	0.9848248	0.1420573	0.8246211	1.0954451
	25	1.9413230	0.0435574	1.8920888	1.9748418
	30	2.1335755	0.0422267	2.0928450	2.1771541
Mandibular Primavera	00	4.0393956	0.1411561	3.8897301	4.1701319
	05	6.0813851	0.0716391	6.0249481	6.1619802
	10	4.4555487	0.0461388	4.4022721	4.4821870
	15	3.8723187	0.1127892	3.7549967	3.9799497
	20	3.4234486	0	3.4234486	3.4234486
	25	3.5524918	0.0685752	3.4885527	3.6249138
	30	4.3680659	0	4.3680659	4.3680659

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de 0 (recém-emergidas) até 30 dias nas estações Inverno, Primavera e Verão

(continuação)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Mandibular Verão	00	2.2530088	0.0769870	2.1977261	2.3409400
	05	2.1755143	0.1034726	2.0712315	2.2781571
	10	2.2676204	0.0429717	2.2203603	2.3043437
	15	2.4745248	0.1228445	2.3409400	2.5826343
	20	2.2313977	0.0360099	2.1977261	2.2693611
	25	2.8395805	0.0131982	2.8319605	2.8548205
	30	2.2315364	0.0732640	2.1470911	2.2781571
Salivar Cefálica Inverno	00	0.2430501	0.0372825	0.2000000	0.2645751
	05	0.2000000	0	0.2000000	0.2000000
	10	0.1000000	0	0.1000000	0.1000000
	15	0.1000000	0	0.1000000	0.1000000
	20	0.5476701	0.1004302	0.4472136	0.6480741
	25	1.5947062	0.0732683	1.5132746	1.6552945
	30	2.2387296	0.0461989	2.2045408	2.2912878
Salivar Cefálica Primavera	00	1.4089479	0.0479460	1.3711309	1.4628739
	05	2.6832038	0.0250229	2.6627054	2.7110883
	10	3.0214767	0.0319103	2.9933259	3.0561414
	15	4.0148855	0.0322806	3.9962482	4.0521599
	20	2.9867122	0.1390149	2.8266588	3.0773365
	25	3.6619518	0.1231425	3.5355339	3.7815341
	30	3.9649141	0.0958356	3.8704005	4.0620192
Salivar Cefálica Verão	00	1.1609885	0.0562013	1.1090537	1.2206556
	05	1.0085229	0.0965518	0.9165151	1.1090537
	10	1.2846596	0.0973374	1.2041595	1.3928388
	15	1.8505240	0.0578058	1.8055470	1.9157244
	20	2.6676118	0.0277720	2.6438608	2.6981475
	25	2.4227072	0.0271010	2.3937418	2.4474477
	30	2.0098389	0.0286650	1.9824228	2.0396078

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de 0 (recém-emergidas) até 30 dias nas estações Inverno, Primavera e Verão

(conclusão)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Salivar Torácica Inverno	00	1.9015231	0.1905649	1.7117243	2.0928450
	05	2.9589396	0.0448864	2.9206164	3.0083218
	10	2.0124489	0.0085961	2.0074860	2.0223748
	15	2.2382688	0.0723133	2.1610183	2.3043437
	20	2.2275358	0.1101213	2.1307276	2.3473389
	25	2.2766789	0.0714106	2.2045408	2.3473389
	30	2.4756393	0.0426061	2.4269322	2.5059928
Salivar Torácica Primavera	00	4.0595566	0	4.0595566	4.0595566
	05	5.0446560	0.0465685	4.9909919	5.0744458
	10	6.8275016	0.0532155	6.7690472	6.8731361
	15	5.6195964	0.0143224	5.6044625	5.6329388
	20	5.2365483	0.0533165	5.2057660	5.2981129
	25	4.5624645	0.0296155	4.5387223	4.5956501
	30	4.5331492	0.0289463	4.5122057	4.5661800
Salivar Torácica Verão	00	2.5096620	0.0489364	2.4535688	2.5436195
	05	3.5483613	0.0932635	3.4828150	3.6551334
	10	3.8537715	0.0875691	3.7669616	3.9420807
	15	3.7012125	0.0392257	3.6633318	3.7416574
	20	3.8521228	0.0415365	3.8105118	3.8935845
	25	3.6340090	0.0311030	3.6013886	3.6633318
	30	3.4445005	0.0558991	3.3896903	3.5014283

(1) Transformação realizada: $T_{prot} = \sqrt{prot}$.

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas no Inverno, Primavera e Verão

Parte Estudada	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Cérebro Inverno	4.5839128	1.0531526	3.8105118	7.0441465
Cérebro Primavera	8.1454973	0.8274079	6.5810334	9.0620086
Cérebro Verão	5.3373528	0.6271615	4.6119410	6.6445466
Hipofaríngea Inverno	3.8597502	0.6139586	2.4207437	4.3058100
Hipofaríngea Primavera	5.5673671	2.2143045	1.7606817	8.1816869
Hipofaríngea Verão	3.7199054	0.5800161	2.9698485	4.8703183
Mandibular Inverno	1.4999097	0.6267252	0.2000000	2.1771541
Mandibular Primavera	4.2560935	0.8482049	3.4234486	6.1619802
Mandibular Verão	2.3533118	0.2313431	2.0712315	2.8548205
Salivar cefálica Inverno	0.7177366	0.8106152	0.1000000	2.2912878
Salivar cefálica Primavera	3.1060131	0.8647639	1.3711309	4.0620192
Salivar cefálica Verão	1.7721218	0.6124242	0.9165151	2.6981475
Salivar Torácica Inverno	2.2987192	0.3371714	1.7117243	3.0083218
Salivar Torácica Primavera	5.1262104	0.8634614	4.0595566	6.8731361
Salivar Torácica Verão	3.5062342	0.4434384	2.4535688	3.9420807

(1) Transformação realizada: $T_{prot} = \sqrt{prot}$

Apêndice B - Dados das análises estatísticas realizadas para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias, de 0 (recém-emergidas) a 30 dias nas estações Primavera e Verão.

Análise de variância para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias, de 0 (recém-emergidas) a 30 dias nas estações Primavera e Verão

Fonte de Variação	GL	SM	MQ	Valor de F	Pr>F
Parte estudada	9	175710.9452	19523.4384	8515.57	<0.0001
Idade	6	14436.7866	2406.1311	1049.49	<0.0001
Parte estudada*Idade	54	34720.0772	642.9644	280.44	<0.0001
Erro		0.998606			
CV		3.516971			

Análise de variância para os resultados transformados (1) de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias, de 0 (recém-emergidas) a 30 dias nas estações Primavera e Verão

Fonte de Variação	GL	SM	MQ	Valor de F	Pr>F
Parte estudada	9	1019.783178	113.31	9486.84	<0.0001
Idade	6	81.536550	13.589425	1137.78	<0.0001
Parte estudada*Idade	54	175.143891	3.243405	271.55	<0.0001
Erro		0.998721			
CV		1.799829			

⁽¹⁾ Transformação realizada: $T_{prot} = \sqrt{prot}$

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias, de 0 (recém-emergidas) até 30 dias nas estações Primavera e Verão

(continua)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Cérebro Primavera	00	6.3795090	0.1509881	6.2144992	6.5107603
	05	9.1695976	0.2184479	8.9565618	9.3930826
	10	8.3204160	0.2145171	8.1424812	8.5586214
	15	8.7243712	0.0263411	8.7057452	8.7429972
	20	8.5572017	0.1773369	8.3528438	8.6706401
	25	9.2289382	0.2237162	9.0371456	9.4747032
	30	9.0710596	0.1970178	8.8588938	9.2482431
Cérebro Verão	00	8.0435536	0.0432320	7.9956238	8.0796040
	05	8.7925494	0.0813243	8.7005747	8.8549421
	10	9.9817798	0.0332903	9.9433395	10.0010000
	15	9.0519885	0.1107124	8.9632583	9.1760558
	20	10.0648345	0.1168712	9.9624294	10.1921538
	25	8.7153421	0.0649402	8.6671795	8.7891979
	30	8.9769951	0.0730591	8.9196412	9.0592494
Hipofaríngea Primavera	00	3.9062233	0.1792463	3.7336309	4.0914545
	05	8.6065493	0.0310255	8.5708809	8.6272823
	10	11.4949493	0.1386090	11.3736538	11.6460294
	15	7.7976127	0.0765123	7.7453212	7.8854296
	20	9.2654716	0.1074947	9.1613318	9.3760333
	25	7.6242509	0.1766294	7.4249579	7.7614432
	30	7.7481883	0.1528606	7.5729783	7.8542982
Hipofaríngea Verão	00	5.9804445	0.0377561	5.9447456	6.0199668
	05	10.4384596	0.0532955	10.4076895	10.5000000
	10	10.5244651	0.0587611	10.4818891	10.5915060
	15	9.4759341	0.0578315	9.4350411	9.5168272
	20	9.1573004	0.1605399	9.0166513	9.3322023
	25	9.4996214	0.0760981	9.4556861	9.5874919
	30	10.1828244	0.0131938	10.1734950	10.1921538

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias, de 0 (recém-emergidas) até 30 dias nas estações Primavera e Verão

(continuação)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Mandibular Primavera	00	4.0914672	0.0992169	3.9786933	4.1653331
	05	4.5955990	0.0265424	4.5771170	4.6260134
	10	4.4567324	0.0361159	4.4158804	4.4844175
	15	4.2410048	0.0285984	4.2083251	4.2614552
	20	3.0228042	0.0631009	2.9529646	3.0757113
	25	2.6070824	0.1211705	2.5000000	2.7386128
	30	2.7616897	0.1568607	2.6683328	2.9427878
Mandibular Verão	00	5.8915394	0.0681532	5.8129167	5.9338015
	05	4.7013961	0.0176723	4.6850827	4.7201695
	10	3.9744496	0.0250065	3.9471509	3.9962482
	15	3.6028218	0.0671775	3.5552778	3.6796739
	20	4.6595670	0.0874805	4.6021734	4.7602521
	25	3.0342513	0.2120806	2.7928480	3.1906112
	30	3.5123518	0.1003873	3.4146742	3.6152455
Salivar Cefálica Primavera	00	2.4303876	0.1217558	2.3409400	2.5690465
	05	3.4349378	0.0824838	3.3808283	3.5298725
	10	3.4009621	0.0135966	3.3852622	3.4088121
	15	3.6251566	0.0485692	3.5930488	3.6810325
	20	3.6940558	0.0304601	3.6633318	3.7242449
	25	4.1977024	0.0945602	4.1303753	4.3058100
	30	4.5641316	0.1343648	4.4090815	4.6465041
Salivar Cefálica Verão	00	1.7567486	0.1604721	1.6278821	1.9364917
	05	3.7008449	0.0249124	3.6864617	3.7296112
	10	4.2580337	0.0934004	4.2000000	4.3657760
	15	5.1641262	0.0519732	5.1058790	5.2057660
	20	5.4807798	0.0397369	5.4359912	5.5118055
	25	5.1270654	0.1726269	4.9588305	5.3037722
	30	3.3501101	0.0119736	3.3376639	3.3615473

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias, de 0 (recém-emergidas) até 30 dias nas estações Primavera e Verão

(conclusão)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Salivar Torácica Primavera	00	3.9245454	0.1480381	3.7841776	4.0792156
	05	4.8812198	0.1598118	4.7254629	5.0447993
	10	5.4781106	0.0213622	5.4644304	5.5027266
	15	4.7405846	0.1424287	4.6021734	4.8867167
	20	4.4750514	0.1259867	4.3312816	4.5661800
	25	4.9413545	0.1566008	4.7696960	5.0764161
	30	5.0089084	0.0354335	4.9809638	5.0487622
Salivar Torácica Verão	00	4.5766793	0.0317679	4.5464272	4.6097722
	05	5.4984818	0.0068227	5.4945427	5.5063600
	10	6.1931660	0.0451961	6.1619802	6.2449980
	15	7.9639270	0.0616459	7.9101201	8.0311892
	20	5.2302089	0.0487097	5.1749396	5.2668776
	25	5.7719998	0.0320597	5.7349804	5.7905095
	30	5.6349937	0.0164071	5.6160484	5.6444663

⁽¹⁾ Transformação realizada: $T_{prot} = \sqrt{prot}$

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeia na Primavera e Verão

Parte Estudada	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Cérebro Primavera	8.4814454	0.9755340	6.2144992	9.4747032
Cérebro Verão	9.0895776	0.6834169	7.9956238	10.1921538
Hipofaríngea Primavera	8.0633208	2.1648328	3.7336309	11.6460294
Hipofaríngea Verão	9.2693890	1.5511670	5.9447456	10.5915060
Mandibular Primavera	3.6823400	0.8114130	2.5000000	4.6260134
Mandibular Verão	4.1966253	0.9174710	2.7928480	5.9338015
Salivar cefálica Primavera	3.6210477	0.6437501	2.3409400	4.6465041
Salivar cefálica Verão	4.1196727	1.2474822	1.6278821	5.5118055
Salivar Torácica Primavera	4.7785392	0.4704688	3.7841776	5.5027266
Salivar Torácica Verão	5.8384938	1.0080128	4.5464272	8.0311892

⁽¹⁾ Transformação realizada: $T_{prot} = \sqrt{prot}$

Apêndice C - Dados das análises estatísticas realizadas para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NA1, NA2) e Verão com abelhas Africanizadas com idades de 5 a 30 dias.

Análise de variância para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de a 30 dias de idade em NA1, NA2 e Verão

Fonte de Variação	GL	SM	MQ	Valor de F	Pr>F
Parte estudada	14	23933.82953	1709.55925	4324.43	<0.0001
Idade	5	1148.12657	229.62531	580.85	<0.0001
Parte estudada*Idade	70	7543.36123	107.76230	272.59	<0.0001
Erro		0.997839			
CV		5.079876			

Análise de variância para os resultados transformados (1) de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizadas, de 5 a 30 dias de idade em NA1, NA2 e Verão

Fonte de Variação	GL	SM	MQ	Valor de F	Pr>F
Parte estudada	14	63.7740374	4.5552884	5583.15	<0.0001
Idade	5	3.93737459	0.787475	965.16	<0.0001
Parte estudada*Idade	70	13.36474352	0.190925	234.01	<0.0001
Erro		0.998229			
CV		1.457168			

⁽¹⁾ Transformação realizada: $TProt_Total = (Prot_Total)^{0.3}$

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NA1, NA2) e Verão, com abelhas Africanizadas com idade de 5 a 30 dias.

(continua)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Cérebro NA1	05	2.5713898	0.0541765	2.5359485	2.6337538
	10	2.4560460	0.0227647	2.4378691	2.4815792
	15	2.3898305	0.0316505	2.3628248	2.4246588
	20	2.7995218	0.0068687	2.7942726	2.8072955
	25	3.0806249	0.0039941	3.0778006	3.0834492
	30	3.2132647	0.0391931	3.1751766	3.2534765
Cérebro NA2	05	2.3519667	0.0112833	2.3391497	2.3604013
	10	2.4367044	0.0110452	2.4269354	2.4486896
	15	1.8658724	0.0398890	1.8207078	1.8962812
	20	2.7354443	0.0086249	2.7254852	2.7404239
	25	3.1510861	0.0550137	3.0875617	3.1828483
	30	3.2407186	0.0071431	3.2324704	3.2448427
Cérebro Verão	05	2.6171243	0.0068585	2.6093776	2.6224229
	10	2.7965207	0.0090835	2.7863354	2.8037824
	15	3.0838368	0.0442861	3.0525218	3.1151518
	20	2.7511066	0.0491511	2.6965039	2.7918149
	25	2.9231813	0.0275066	2.8914717	2.9406122
	30	2.5232609	0.0152575	2.5068257	2.5369743
Hipofaríngea NA1	05	2.1846313	0.0390613	2.1395272	2.2071833
	10	2.5416341	0.0017125	2.5400458	2.5434484
	15	2.1619625	0.0042264	2.1571582	2.1651073
	20	2.1217876	0.0172021	2.1079626	2.1410517
	25	2.2952722	0.0344156	2.2560436	2.3203882
	30	2.5412436	0.0129192	2.5270178	2.5522458

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NA1, NA2) e Verão, com abelhas Africanizadas com idade de 5 a 30 dias.

(continua)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Hipofaríngea NA2	05	1.7614448	0.0420044	1.7160369	1.7989122
	10	1.5505296	0.0214622	1.5258681	1.5649772
	15	1.5343829	0.0044737	1.5292172	1.5369658
	20	1.9425151	0.0350397	1.9023250	1.9666536
	25	2.0541063	0.0198322	2.0407304	2.0768918
	30	2.0641152	0.0432842	2.0147914	2.0957698
Hipofaríngea Verão	05	2.1469693	0.0207402	2.1231053	2.1606443
	10	2.5553854	0.0509263	2.4965857	2.5854397
	15	2.3996700	0	2.3996700	2.3996700
	20	2.1348699	0.0136868	2.1262070	2.1506489
	25	2.1231608	0.0470621	2.0697769	2.1586538
	30	2.0571647	0.0134533	2.0446968	2.0714239
Mandibular NA1	05	2.0749318	0.0575015	2.0112735	2.1231053
	10	1.4484488	0.0200340	1.4254936	1.4624078
	15	1.4228705	0.0281041	1.3986738	1.4536966
	20	1.5576230	0.0237829	1.5402589	1.5847304
	25	1.6190225	0.0049092	1.6138162	1.6235677
	30	1.5898945	0.0238339	1.5712778	1.6167561
Mandibular NA2	05	1.9605316	0.0584428	1.9149390	2.0264156
	10	1.5088128	0.0289200	1.4770657	1.5336561
	15	1.1704854	0	1.1704854	1.1704854
	20	1.3709157	0.0336449	1.3334973	1.3986738
	25	1.6826230	0.0098110	1.6712943	1.6882874
	30	1.4468949	0.0123475	1.4333143	1.4574449
Mandibular Verão	05	1.9740502	0	1.9740502	1.9740502
	10	1.6342922	0.0186076	1.6138162	1.6501687
	15	1.7219035	0.0514634	1.6658434	1.7670049
	20	1.6185911	0.0156641	1.6039253	1.6350919
	25	1.8704744	0.0052135	1.8674643	1.8764944
	30	1.6185443	0.0320082	1.5816496	1.6388915

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NA1, NA2) e Verão, com abelhas Africanizadas com idade de 5 a 30 dias.

(continua)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Salivar Cefálica NA1	05	1.3795091	0.0325550	1.3441274	1.4081966
	10	1.3436094	0.0052923	1.3380772	1.3486237
	15	1.3207242	0.0253362	1.2938192	1.3441274
	20	1.4159915	0.0213220	1.3945458	1.4371875
	25	1.9009353	0.0258590	1.8764944	1.9280108
	30	1.4400150	0.0332475	1.4041338	1.4697794
Salivar Cefálica NA2	05	0.9648221	0.0368851	0.9387404	0.9909039
	10	0.8212704	0.0251875	0.7921863	0.8358124
	15	0.2511886	0	0.2511886	0.2511886
	20	1.3125990	0.0120096	1.2987315	1.3195327
	25	1.3795501	0.0314373	1.3441274	1.4041338
	30	1.7078630	0.0323735	1.6712943	1.7328621
Salivar Cefálica Verão	05	1.0043706	0.0576418	0.9490384	1.0640733
	10	1.1616513	0.0525490	1.1179192	1.2199458
	15	1.4465823	0.0270392	1.4254936	1.4770657
	20	1.8016475	0.0112461	1.7920212	1.8140089
	25	1.7004983	0.0114194	1.6882874	1.7109135
	30	1.5201613	0.0130046	1.5077098	1.5336561
Salivar Torácica NA1	05	2.1059304	0.0164075	2.0904166	2.1231053
	10	2.0253570	0.0158083	2.0071510	2.0356041
	15	2.0027587	0.0254016	1.9746637	2.0241032
	20	2.2237000	0.0118858	2.2100169	2.2314645
	25	2.0601808	0.0072630	2.0520158	2.0659220
	30	2.0352334	0.0217390	2.0112735	2.0536962
Salivar Torácica NA2	05	1.6262920	0.0608268	1.5775199	1.6944486
	10	1.8420894	0.0121289	1.8280841	1.8490920
	15	1.4909487	0.0292199	1.4574449	1.5111534
	20	2.1185803	0.0202389	2.1042692	2.1328913
	25	2.0830129	0.0240845	2.0553734	2.0994982
	30	1.8616320	0.0331224	1.8302836	1.8962812

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NA1, NA2) e Verão, com abelhas Africanizadas com idade de 5 a 30 dias.

(conclusão)					
Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Salivar Torácica Verão	05	2.1379269	0.0336248	2.1142593	2.1764161
	10	2.2465373	0.0306281	2.2161274	2.2773790
	15	2.1928176	0.0139412	2.1793438	2.2071833
	20	2.2460325	0.0145315	2.2314645	2.2605273
	25	2.1688477	0.0111409	2.1571582	2.1793438
	30	2.1002288	0.0204474	2.0801565	2.1210316

⁽¹⁾ Transformação realizada: $TProt_Total = (Prot_Total)^{0.3}$

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Africanizada em experimento de plasticidade (NA1, NA) e Verão

Parte Estudada	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Cérebro NA1	2.7324358	0.3182738	2.3628248	3.2534765
Cérebro NA2	2.6302987	0.4894494	1.8207078	3.2448427
Cérebro Verão	2.7647797	0.1823257	2.5068257	3.1151518
Hipofaríngea NA1	2.3077552	0.1794600	2.1079626	2.5522458
Hipofaríngea NA2	1.8178490	0.2265444	1.5258681	2.0957698
Hipofaríngea Verão	2.2362033	0.1856947	2.0446968	2.5854397
Mandibular NA1	1.6187985	0.2237958	1.3986738	2.1231053
Mandibular NA2	1.5233772	0.2569243	1.1704854	2.0264156
Mandibular Verão	1.7396426	0.1428636	1.5816496	1.9740502
Salivar Cefálica NA1	1.4667974	0.2051736	1.2938192	1.9280108
Salivar Cefálica NA2	1.0792387	0.4942958	0.2511886	1.7328621
Salivar Cefálica Verão	1.4391519	0.2901901	0.9490384	1.8140089
Salivar Torácica NA1	2.0755267	0.0771990	1.9746637	2.2314645
Salivar Torácica NA2	1.8205344	0.2295436	1.4574449	2.1328913
Salivar Torácica Verão	2.1820651	0.0582012	2.0801565	2.2773790

⁽¹⁾ Transformação realizada: $TProt_Total = (Prot_Total)^{0.3}$

Apêndice D - Dados das análises estatísticas realizadas para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NE1, NE2) e Primavera, com abelhas Europeias com idades de 5 a 25 dias.

Análise de variância para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias, com idades de 5 a 25 dias em NE1, NE2 e Primavera

Fonte de Variação	GL	SM	MQ	Valor de F	Pr>F
Parte estudada	14	152295.9119	10878.2794	4041.93	<0.0001
Idade	4	2299.8018	574.9504	213.63	<0.0001
Parte estudada*Idade	56	21994.0611	392.7511	145.93	<0.0001
Erro		0.997828			
CV		4.284374			

Análise de variância para os resultados transformados (1) de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em abelhas Europeias, com idade de 5 a 25 dias em NE1, NE2 e Primavera

Fonte de Variação	GL	SM	MQ	Valor de F	Pr>F
Parte estudada	14	81.04668884	5.78905	6317.20	<0.0001
Idade	4	1.96544670	0.491362	536.19	<0.0001
Parte estudada*Idade	56	10.98238956	0.1961141	214.01	<0.0001
Erro		0.998593			
CV		1.075354			

⁽¹⁾ Transformação realizada: TProt_Total=(Prot_Total)^0.3

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NE1, NE2) e Primavera, com abelhas Europeias com idade de 5 a 25 dias

(continua)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Cérebro NE1	05	3.1833523	0.0351485	3.1430127	3.2073890
	10	3.3393261	0.0134909	3.3297866	3.3488655
	15	3.1559053	0.0042110	3.1529277	3.1588829
	20	3.4216083	0.0452590	3.3833156	3.4715545
	25	3.4838897	0.0411623	3.4460186	3.5276983
Cérebro NE2	05	4.1190664	0.0404572	4.0733781	4.1503495
	10	3.8225232	0.0352878	3.7834439	3.8520543
	15	3.9354677	0.0217546	3.9186698	3.9600418
	20	3.6554369	0.0269956	3.6310141	3.6844235
	25	3.4533093	0.0267816	3.4232644	3.4746748
Cérebro Primavera	05	3.7791181	0.0540052	3.7263599	3.8342894
	10	3.5650369	0.0550444	3.5192819	3.6261210
	15	3.7025830	0.0599243	3.6633935	3.7715646
	20	3.6256348	0.0451913	3.5735562	3.6545230
	25	3.7937674	0.0550928	3.7464399	3.8542454
Hipofaríngea NE1	05	2.6463596	0.0141051	2.6337538	2.6615941
	10	2.7016916	0.0217364	2.6770733	2.7182346
	15	3.2079367	0.0563681	3.1508680	3.2635771
	20	2.7512158	0.0045505	2.7469712	2.7560204
	25	3.0248191	0.0271004	2.9983641	3.0525218
Hipofaríngea NE2	05	3.2742855	0.0067733	3.2669909	3.2803762
	10	3.7651030	0.0131275	3.7519352	3.7781899
	15	3.6491481	0.0486596	3.6174834	3.7051771
	20	3.2826810	0.0489308	3.2490703	3.3388178
	25	3.1400203	0.0084069	3.1332331	3.1494244
Hipofaríngea Primavera	05	3.6382873	0.0078725	3.6292366	3.6435472
	10	4.3281190	0.0312913	4.3007084	4.3622116
	15	3.4290488	0.0201667	3.4152591	3.4521942
	20	3.8029082	0.0264672	3.7772451	3.8301121
	25	3.3829810	0.0471289	3.3297866	3.4195227

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NE1, NE2) e Primavera, com abelhas Europeias com idade de 5 a 25 dias

(continua)

Parte Estudada	Idade				
		Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Mandibular NE1	05	2.4935375	0.0322788	2.4593997	2.5235633
	10	2.4530739	0.0369052	2.4108935	2.4794181
	15	2.6296020	0.0157247	2.6205233	2.6477593
	20	1.2094572	0.0040833	1.2065699	1.2123446
	25	1.7324320	0.0064734	1.7278546	1.7370094
Mandibular NE2	05	2.6564821	0.0051002	2.6517733	2.6618996
	10	2.3852816	0.0078273	2.3784384	2.3938163
	15	2.4083514	0.0177066	2.3938163	2.4280718
	20	1.7113260	0.0186508	1.7005579	1.7328621
	25	2.1308149	0.0082567	2.1231053	2.1395272
Mandibular Primavera	05	2.4969171	0.0086474	2.4908938	2.5068257
	10	2.4513631	0.0119283	2.4378691	2.4605014
	15	2.3794669	0.0096342	2.3684573	2.3863534
	20	1.9419177	0.0243623	1.9149390	1.9623088
	25	1.7499335	0.0241426	1.7328621	1.7670049
Salivar Cefálica NE1	05	2.2895405	0.0252796	2.2605273	2.3068282
	10	2.4017856	0.0096108	2.3949897	2.4085814
	15	2.2698736	0.0031328	2.2676584	2.2720889
	20	1.8221478	0.0259052	1.8049863	1.8519463
	25	1.7574992	0.0317319	1.7228130	1.7850678
Salivar Cefálica NE12	05	2.1545291	0.0286720	2.1364705	2.1875895
	10	2.0891036	0.0253417	2.0609410	2.1100664
	15	2.1982151	0.0402936	2.1611413	2.2410979
	20	2.5436312	0.0226275	2.5283966	2.5696314
	25	2.3288583	0.0123640	2.3153249	2.33956260
Salivar Cefálica Primavera	05	2.0966764	0.0301304	2.0768918	2.1313531
	10	2.0843014	0.0050020	2.0785256	2.0871893
	15	2.1656579	0.0173836	2.1541596	2.1856559
	20	2.1902804	0.0108368	2.1793438	2.2010147
	25	2.3647730	0.0318892	2.3420368	2.4012253

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NE1, NE2) e Primavera, com abelhas Europeias com idade de 5 a 25 dias

(conclusão)

Parte Estudada	Idade	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Salivar Torácica NE1	05	2.4935375	0.0322788	2.4593997	2.5235633
	10	2.4530739	0.0369052	2.4108935	2.4794181
	15	2.6296020	0.0157247	2.6205233	2.6477593
	20	2.9173353	0.0289592	2.8849057	2.9406122
	25	2.7139335	0.0332719	2.6947240	2.7523526
Salivar Torácica NE2	05	2.8739691	0.000884770	2.8734583	2.8749908
	10	2.8918700	0.0089176	2.8816096	2.8977525
	15	2.7827261	0.0110560	2.7700225	2.7901737
	20	2.7691724	0.0072254	2.7650008	2.7775155
	25	2.7035854	0.0061957	2.6965039	2.7080073
Salivar Torácica Primavera	05	2.5886886	0.0508378	2.5390229	2.6406226
	10	2.7744567	0.0064886	2.7703009	2.7819336
	15	2.5437112	0.0458399	2.4990663	2.5906593
	20	2.4572598	0.0416344	2.4097381	2.4873209
	25	2.6077895	0.0497005	2.5532563	2.6505398

(1) Transformação realizada: $TProt_Total = (Prot_Total)^{0.3}$

Médias transformadas (1) para os resultados de proteínas de cérebro e glândulas salivar torácica e cefálica, mandibular e hipofaríngea em experimento de plasticidade (NE1, NE2) e Primavera com abelhas Europeias

Parte Estudada	Média	Desvio	Mínimo	Máximo
Cérebro NA1	2.7324358	0.3182738	2.3628248	3.2534765
Cérebro NA2	2.6302987	0.4894494	1.8207078	3.2448427
Cérebro Verão	2.7647797	0.1823257	2.5068257	3.1151518
Hipofaríngea NA1	2.3077552	0.1794600	2.1079626	2.5522458
Hipofaríngea NA2	1.8178490	0.2265444	1.5258681	2.0957698
Hipofaríngea Verão	2.2362033	0.1856947	2.0446968	2.5854397
Mandibular NA1	1.6187985	0.2237958	1.3986738	2.1231053
Mandibular NA2	1.5233772	0.2569243	1.1704854	2.0264156
Mandibular Verão	1.7396426	0.1428636	1.5816496	1.9740502
Salivar Cefálica NA1	1.4667974	0.2051736	1.2938192	1.9280108
Salivar Cefálica NA2	1.0792387	0.4942958	0.2511886	1.7328621
Salivar Cefálica Verão	1.4391519	0.2901901	0.9490384	1.8140089
Salivar Torácica NA1	2.0755267	0.0771990	1.9746637	2.2314645
Salivar Torácica NA2	1.8205344	0.2295436	1.4574449	2.1328913
Salivar Torácica Verão	2.1820651	0.0582012	2.0801565	2.2773790

⁽¹⁾ Transformação realizada: $TProt_Total = (Prot_Total)^{0.3}$