**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

Igor Medici de Mattos

**Estudo do melhoramento genético no sistema produtivo de pólen apícola e
suas implicações na saúde das abelhas *Apis mellifera* L.**

Ribeirão Preto – SP

2016

IGOR MEDICI DE MATTOS

Estudo do melhoramento genético no sistema produtivo de pólen apícola e suas implicações na saúde das abelhas *Apis mellifera* L.

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

Ribeirão Preto – SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

de Mattos, Igor Medici

Estudo do melhoramento genético no sistema produtivo de pólen apícola e suas implicações na saúde das abelhas *Apis mellifera* L. Ribeirão Preto, 2016.

114 p; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Soares, Ademilson Espencer Egea.

1. Pólen. 2. *Apis mellifera*. 3. inseminação instrumental.
4. estresse oxidativo. 5. patógenos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

de Mattos, Igor Medici

Estudo do melhoramento genético no sistema produtivo de pólen apícola e suas implicações na saúde das abelhas *Apis mellifera* L.

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Hercília Renata Medici de Mattos e
Oswaldo Henrique de Mattos Filho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e meu irmão, pelo apoio incondicional, aprendizagem diária e amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, pela oportunidade, amizade e confiança que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. David De Jong pela ajuda constante em diversos trabalhos, apoio e conselhos valiosos.

Às Profas. Dra. Zilá Luz Paulino Simões e Dra. Marcia Maria Gentile Bitondi por disponibilizarem seus laboratórios e permitirem que parte desse trabalho fosse desenvolvido de forma exitosa.

Ao Prof. Dr. José Chaud-Netto pelo apoio inicial, fundamental para que o decorrer do trabalho fosse bem-sucedido.

Ao Prof. Dr. David R. Tarpy pela receptividade, apoio e gentileza. Agradeço também pela orientação atenta e dedicação incansável.

Aos técnicos Vera Figueiredo, Marcela Bezerra Laure, Luíz Roberto Aguiar, Rogério Pereira, Roberto Mazzuco, Jennifer Keller, Marjorie Gurganus, Deniz Chen, agradeço pela convivência amigável, disposição, cooperação e ensinamentos.

À Dra. Érica Tanaka e à Dra. Juliana Ramos Martins pela paciência em iniciar-me no mundo da biologia molecular.

Ao Dr. Omar Arvey Martinez Carantón pela orientação, amizade e disponibilidade.

À Dra. Margarita Lopez-Uribe e Dr. Michael Simone-Finstrom pela solidariedade, receptividade e sugestões construtivas.

À Dra. Emily Griffith pela ajuda no processamento dos dados estatísticos e desenvolvimento do modelo matemático.

À Raquel Lunardi Baccetto pela ajuda na elaboração deste texto, bem como pela disponibilidade e apoio.

A todos os colegas do Boco A do Departamento de Genética e também do Laboratório de Biologia e Genética de Abelhas (LBGA), que aqui, por receio de cometer injustiças, agradeço coletivamente.

Meu especial “MUITO OBRIGADO” ao técnico Jairo de Souza por toda dedicação, disponibilidade, orientação, confiança e amizade.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho e conviveram comigo durante esses 4 anos, meus sinceros agradecimentos.

SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Auxílio modalidade Doutorado Pleno no País

Processo: 141992/2012-3

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Auxílio modalidade Doutorado Sanduiche no Exterior (DSE).

Processo: 99999.009196/2014-05

United States Department of Agriculture - USDA

USDA-APHIS

Processo: 14-8130-0360-CA

APOIO INSTITUCIONAL

Departamento de Genética

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto – SP, Brasil.

Department of Entomology

College of Agriculture and Life Science

North Carolina State University

Raleigh, North Carolina, EUA.

RESUMO

de MATTOS, I. M. *Estudo do melhoramento genético no sistema produtivo de pólen apícola e suas implicações na saúde das abelhas Apis mellifera L.* 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2016.

A produção de pólen apícola vem experimentando uma rápida e empolgante expansão desde o final da década de 1990. Tal crescimento pode ser explicado pelo aumento do interesse popular em alimentos de alto valor nutricional, bem como outras inúmeras aplicações desse produto na produção animal. Atualmente em torno de 1.500 toneladas de pólen são produzidas anualmente em todo o mundo. Apesar da importância econômica, social e ecológica assumida por esse setor da cadeia produtiva apícola, poucos estudos vêm abordando o tema, desde o fim da década de 1960. Tal desinteresse científico fez com que diversos aspectos relacionados às técnicas de manejo mais adequadas permanecessem pouco entendidos ou até mesmo nunca validados. Como agravante, um acentuado declínio populacional vem sendo percebido nas espécies de polinizadores, em especial *A. mellifera*. Apesar da gravidade e recorrência, tal fenômeno ainda é pouco entendido. Inúmeros agentes parecem exercer algum tipo de influência negativa na biologia e fisiologia das abelhas melíferas (pesticidas, patógenos, ectoparasitas e perda de habitat), porém nenhum desses fatores foi comprovadamente identificado como desencadeador. Hoje a hipótese emergente, mais aceita entre os pesquisadores da área, trata do possível efeito sinérgico desses fatores como possível desencadeador dessa síndrome. É nesse contexto que estudos relativos à sanidade dessas abelhas se tornaram essenciais para a conservação da espécie e de seus serviços ecológicos. O pólen como imunofetor e mitigador do estresse oxidativo se tornou, portanto, uma das mais proeminentes alternativas para proteção das abelhas *A. mellifera*. A pesquisa teve como principal objetivo a obtenção de informações que propiciassem o melhoramento das práticas vigentes de produção de pólen apícola, além do melhor entendimento do efeito do pólen no sistema imunológico de abelhas melíferas (analisado através do estudo da prevalência de patógenos) e no sistema de defesa antioxidante desses insetos. Este estudo traz informações importantes sobre o desenvolvimento de um sistema produtivo de pólen apícola mais eficaz. A utilização de populações coloniais de tamanhos médios (entre 19.000 e 30.000 indivíduos), combinada com suplementação de carboidrato, foi capaz de produzir resultados produtivos vantajosos. Também concluímos que apiários de produção devem ser prioritariamente instalados em regiões de temperaturas tropicais (com menores amplitudes térmicas), cujo ponto de orvalho também é elevado (alta umidade média) e com períodos moderados de precipitação (porém com frequência regular). Também concluímos que o uso de rainhas inseminadas deve ser considerado pelos apicultores com o objetivo de melhorar a suas produções, uma vez que tal técnica é capaz de produzir resultados mais rápidos e potencialmente mais duradouros do que as técnicas de seleção unilaterais mais comumente usadas nos sistemas produtivos de pólen no Brasil. Os dados obtidos nessa pesquisa também nos mostram indícios de que a expressão relativa dos genes PRX5, SOD2 e GSTS4 respondem significativamente à exposição ao herbicida Paraquat. Por este motivo, novos estudos são necessários para elucidar a real possibilidade dos mesmos serem utilizados como marcadores biológicos para a intoxicação causada por esse herbicida. Modificações significativas também foram observadas na prevalência de patógenos como *Nosema*, DWV e SBV (quando abelhas foram expostas ao Paraquat). Essa pesquisa destaca os efeitos mitigativos do pólen na redução do estresse oxidativo causado pela exposição ao Paraquat. As taxas de sobrevivência, promovidas por dietas ricas em pólen, parecem também estar ligadas à

regulação positiva de genes antioxidantes como os CYPs, SODs, VG e GSTs assim como a menores cargas de IAPV, *Nosema sp*, e espécies tripanosomatídeas. Este é um indicativo da eficácia do pólen como antioxidante e imunofetor, assim como uma possível alternativa para a manutenção da saúde das abelhas no mundo todo.

Palavras-chave: Pólen, *Apis mellifera*, inseminação instrumental, estresse oxidativo, patógenos.

ABSTRACT

de MATTOS, I. M. *Study of strategies for genetic improvement in bee pollen productive system, and analysis of the implications of pollen-rich diets on the honey bee (*Apis mellifera* L.) health*. 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2016.

The demand for bee pollen has significantly increased in the last two decades. This growing consumption can be explained by the increasing incorporation of this product into human diets, as well as the efficiency of this product in improving livestock production. Currently around 1,500 tonnes of pollen are produced annually worldwide. Despite the economic, social and ecological importance assumed by this sector of the beekeeping industry chain, few studies have approached the subject since 1960. As a consequence of such scientific negligency, several aspects related to productive management remain poorly understood or even never validated. To make matters worse, a sharp population decline has been noticed in pollinator species, especially *A. mellifera*, since 2006. No single cause has been identified for these dramatic losses, but rather multiple interacting factors are likely responsible (such as pesticides, malnutrition, habitat loss, and pathogens). In this context, studies addressing the health of honey bees have become essential for the conservation of this pollinator as well as its ecological services. Thus, Pollen as imunofetor and potencial source of antioxidants has become one of the most prominent alternatives for honey bees protection. This research aimed to obtain information able to foster the improvement of pollen production. We also tested the effects of a widely used herbicide on the physiology of honey bees, specifically focusing the effects of Paraquat on the expression of antioxidant-related genes. In doing so, we simultaneously identify the dynamics of pathogen prevalence when bees are exposed to different concentrations of Paraquat. Finally, we investigate the effect of pollen (added to the diet of tested bees) on both oxidative stress and pathogen loads. This study provides important information for the development of a more eficiente pollen productive system. The use of mid-sized swarms (e.g. 19,000 to 30,000 individuals) combined with carbohydrate supplementation is able to provide advantageous productive results. We also concluded that apiaries should prioritarily be settled in regions which present tropical weather (narrow temperature range), the humidity is high and the precipitation is frequent. We were able to conclude that the use of inseminated queens must be considered by beekeepers in order to improve their production, once this technique is able to produce result improvement faster than other unilateral breeding techniques. The data obtained in this study also showed us evidences that the relative expression of genes such PRX5, SOD2 and GSTS4 respond to exposure to the herbicide Paraquat. Therefore, further studies are required to better elucidate the real possibility of those antioxidante related genes to be applied as biological markers for intoxication produced by this herbicide. Significant changes were also observed in the found levels of pathogens such as *Nosema*, DWV and SBV (when bees were exposed to Paraquat). This research highlights the mitigating effects of pollen on reducing the oxidative stress caused by Paraquat exposure. Survival rates promoted by pollen-rich diets also seems to be linked to upregulation of genes such as CYPs, SODs, VG and GSTs, as well as reduced prevalence of IAPV, *Nosema sp* and tripanosomatyd species. This research sheds light into the antioxidant and imunofetor effects of pollen as well as the promising use of those polle-rich diets as alternative for improving honey bee's health.

Keywords: Pollen, *Apis mellifera*, instrumental insemination, oxidative stress, pathogens

ABREVIACÕES

ABPV	–	Acute Bee Paralysis Virus;
AChE	–	Acetilcolinesterase;
AHB	–	Abelhas africanizadas
AIC	–	Critério de informação de Akaike;
AICc	–	Critério de informação de Akaike corrigido;
ANCR1	–	RNA1 não codificador de <i>Apis</i> ;
ANOVA	–	Teste estatístico de análise de variância;
ASA	–	Ácido ascórbico;
BIC	–	Critério de informação Bayesiano;
BQCV	–	Black Queen Cell Virus;
BS	–	Grupo de colônias utilizadas como matrizes reprodutoras;
CAES	–	Carboxilesterases;
CAT	–	Catalase;
CBPV	–	Chronic Bee Paralysis Virus;
CCD	–	Colony Collapse Disorder;
cDNA	–	DNA complementar;
CoN	–	Cobertura de nuvem;
CYP	–	Citocromo monooxigenases;
D.P.	–	Desvio padrão;
Dat	–	Data da coleta de dados;
DL₅₀	–	Dose letal 50;
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico;
dNTP	–	Trifosfato de desoxirribonucleótido;
DWV	–	Deformed Wing Virus;
E.P.	–	Erro padrão;
E2F	–	Fator de alongamento;
EUA	–	Estados Unidos da América;
F1C	–	População F1 utilizada como controle;
FM	–	Rainhas fecundadas através de processos de livres-acasalamento;
G.L.	–	Graus de Liberdade;
GAPDH	–	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;
GST	–	Glutathione-S-transferase;

IAPV	– Israeli Acute Paralysis Virus;
IQ	– Rainhas fecundadas através de processos inseminação instrumental;
KBV	– Kashmir Bee Virus;
LSV	– Lake Sinay Virus;
LC	– Limite de confiança/Intervalo de confiança;
log10	– Logaritmo na base 10
ln	– Logaritmo natural
PC	– População parental utilizada como controle;
PCR	– Reação em cadeia da polimerase;
PHT	– Pollen hoarding trait;
Plu	– Pluviosidade;
PRX	– Peroxiredoxinas;
QMP	– Quantidade média de pólen coletado;
qPCR	– Reação em cadeia da polimerase quantitativa;
RNA	– Ácido ribonucleico;
ROS	– Espécies reativas de oxigênio;
SBV	– Sacbrood Virus;
SOD	– Superóxido dismutase;
SP	– Estado de São Paulo, Brasil;
Bactin	– Actina;
TMax	– Temperatura máxima;
TMin	– Temperatura mínima;
TPA	– Tamanho populacional aproximado;
TPO	– Temperatura de ponto de orvalho;
TT	– Total de tióis;
Umi	– Umidade;
UR	– Umidade relativa;
USP	– Universidade de São Paulo;
VC	– Grupo de colônias descartadas do processo de melhoramento;
VDV	– <i>Varroa destructor</i> Virus;
VG	– Vitelogenina.
~	– Aproximadamente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A e B. As subespécies de <i>Apis mellifera</i> e suas respectivas regiões de origem. C. Estruturação genética das subespécies de <i>Apis mellifera</i>	20
Figura 2 Expansão das abelhas Africanizadas no continente Americano	23
Figura 3. Mapa do sul dos EUA e o respectivo ano de ocorrência de abelhas Africanizadas.....	23
Figura 4. A. Abelha tentando passar pela trampa coletora. B. Exemplo de coletor com trampa interna (modelo Intermediário Interno). C. Coletor com trampa posicionada no alvado da colônia (modelo Tropical Africanizado-Baiano). D. Coletor com trampa posicionada na entrada do alvado (modelo Frontal).....	29
Figura 5. Configuração tradicional de colmeias modelo Langstroth.	37
Figura 6. Coletor de pólen desenvolvido por Raoni Duarte. A. Vista lateral do coletor utilizado na pesquisa; B. Trampa de 356,5 cm ² ; C. Acesso à gaveta coletora através da face traseira do coletor; D. Face dianteira do coletor com entrada de 112 cm ²	38
Figura 7. Gaveta traseira do coletor utilizado. A posição em questão facilita a colheita uma vez que não interfere no fluxo de operárias forrageiras.	38
Figura 8. A. Comparação entre os diferentes grupos testados em relação aos respectivos valores médios de pólen coletado e o tamanho da população. B. Comparação estatística pareada (teste de Dunn). Barras superiores/inferiores representam desvio padrão.	44
Figura 9. Regressão não-linear dos dados relativos a quantidade de pólen produzido (g/dia) e a respectiva estimativa do tamanho da população.	45
Figura 10. Regressão linear da proporção de pólen coletado por abelhas operárias e o respectivo tamanho da população.....	45
Figura 11. Comparações pareadas (A, B, C, D, E e F) entre a quantidade média de pólen coletado (g/dia) nos diferentes grupos testados, através do teste Mann-Whitney. 1. Colônias que não receberam qualquer suplemento (controle); 2. Colônias alimentadas com suplemento de carboidrato; 3. Colônias alimentadas com suplemento de proteína; 4. Colônias alimentadas com suplementos de carboidrato e proteína.	46
Figura 12. Comparação entre a justaposição do modelo proposto com o uso da variável dependente em dados brutos (A) e depois da transformação para log natural (B).	49
Figura 13. Esquema das técnicas de melhoramento genético empregadas na pesquisa e as colônias controle.....	59
Figura 14. Processo de inseminação instrumental de rainhas de <i>A. mellifera</i>	60
Figura 15. Produção média de pólen apícola (g/dia) observada em uma população de 80 colônias (Pop), as colônias que apresentaram as maiores médias produtivas (BS) e as colônias excluídas do programa de seleção. Barras laterais representam desvio padrão.	61

Figura 16. A média produtiva (g/dia) observada nas duas gerações usadas como controle: Parental (PC) e F1 (F1C).	62
Figura 17. Comparação da média produtiva de pólen apícola (g/dia) observada nas gerações Parental (BS), F1 com inseminação instrumental (IQ) e F1 com acasalamento livre (FM). Barras superiores/inferiores representam desvio padrão.	62
Figura 18. Gaiolas (“Holding cages”) em que as abelhas controle e expostas às diferentes concentrações de Paraquat foram mantidas.	67
Figura 19. Sobrevivência das abelhas testadas de acordo com os diferentes tratamentos (A, B, C, D, E, F, G e H) e a compilação dos mesmos (I). Linhas pontilhadas evidenciam os tratamentos em que o pólen fermentado estava disponível para o consume das abelhas.	72
Figura 20. Expressão dos genes relativos ao Citocromo P450 (CYP6S3) e Superóxido dismutase (SOD1) (<i>log10</i>), de acordo com o regime de alimentação testado (linhas contínuas: apenas solução de sacarose 50%, linhas pontilhadas: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).	74
Figura 21. Expressão do gene relativo à Vitalogenina (<i>log10</i>) de acordo com o regime de alimentação testado (linha contínua: apenas solução de sacarose 50%, linha pontilhada: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).	75
Figura 22. Expressão dos genes relativos à Peroxiredoxina (PRX5) e Glutathione S-transferase (GSTS4) (<i>log10</i>), de acordo com o regime de alimentação testado (linhas contínuas: apenas solução de sacarose 50%, linhas pontilhadas: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).	76
Figura 23. Carga de patógenos virais (DWV, IAPV e SBV) (<i>log10</i>), de acordo com o regime de alimentação testado (linhas pontilhadas: apenas solução de sacarose 50%, linhas contínuas: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).	78
Figura 24. Carga de patógenos (<i>Nosema sp</i> e espécies de Tripanossomatídeos) (<i>log10</i>), de acordo com o regime de alimentação testado (linhas pontilhadas: apenas solução de sacarose 50%, linhas contínuas: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. As diferentes configurações utilizadas em todos os 6 grupos testados e os respectivos tamanhos populacionais correspondentes.....	39
Tabela 2. Os diferentes tratamentos alimentares utilizados na pesquisa.....	40
Tabela 3. Os diferentes grupos testados e seus respectivos tamanhos populacionais (número aproximado de abelhas operárias), a quantidade média de pólen coletado (gramas de pólen por dia), o desvio padrão (D.P.) e a média de pólen coletado em relação ao tamanho da população.	43
Tabela 4. Correlação de Pearson entre o número de abelhas operárias retornando com cargas de pólen e as 11 variáveis climáticas observadas.....	48
Tabela 5. Intensidade e direção dos efeitos das variáveis climáticas na coleta de pólen apícola (ANOVA).....	50
Tabela 6. Comparações pareadas das taxas de sobrevivência observadas nos diferentes tratamentos aplicados (Valores de P). Os quadros coloridos (amarelos) representam os tratamentos que contaram com o oferecimento de pólen fermentado <i>ad lib</i>	71

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Sequencia dos primers, relativos aos genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante de *Apis mellifera*, utilizados nas reações de qPCR..... 113

Apêndice 2. Sequencia dos primers, relativos aos patógenos mais comuns de *Apis mellifera*, utilizados nas reações de qPCR. 114

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I: Introdução geral e Objetivos	19
1.1 Introdução Geral	19
1.2 Relação das abelhas <i>Apis mellifera</i> com o Homem.....	19
1.2.1 <i>Apis mellifera</i> no Brasil.....	21
1.2.2 Melhoramento genético de abelhas melíferas	24
1.2.3 Cenário da Sanidade Apícola Mundial	25
1.2.4 O sistema produtivo e comercial de pólen apícola	28
1.2.5 Pólen e sua relação com a saúde das abelhas <i>Apis</i>	30
1.3 Objetivos.....	31
1.4 Objetivos específico	32
1.4.1 Análise da influência de técnicas de manejo e variáveis climáticas na produção de pólen:	32
1.4.2 Melhoramento genético na produção de pólen apícola:	32
1.4.3 Análise dos possíveis benefícios proporcionados pela nutrição, à base de pólen fermentado, na sanidade de colônias de <i>A. mellifera</i> :	33
 2 CAPÍTULO II: Análise dos efeitos do tamanho populacional, da suplementação alimentar e de variáveis climáticas sobre a produção de pólen apícola	34
2.1 Introdução	34
2.2 Materiais e Métodos	36
2.2.1 Tamanho Populacional	39
2.2.2 Efeitos da suplementação de carboidrato e proteína	40
2.2.3 Efeito de variáveis climáticas sobre a produção de pólen	40
2.3 Resultados.....	41
2.3.1 Tamanho populacional	42
2.3.2 Efeitos da suplementação de carboidrato e proteína	43
2.3.3 Efeitos das variáveis climáticas sobre a produção de pólen	47
2.4 Discussão	51
2.5 Conclusão	55
 3 CAPÍTULO III: Avaliação do ganho genético promovido por duas técnicas de melhoramento no sistema produtivo de pólen apícola	56
3.1 Introdução	56
3.2 Material e Métodos	57

3.3 Resultados.....	61
3.4 Discussão	63
3.5 Conclusão	63
4 CAPÍTULO IV: Efeito de dietas ricas em pólen sobre a saúde de <i>Apis mellifera</i>	64
4.1 Introdução	64
4.2 Materiais e Métodos	65
4.2.1 Amostragem de abelhas e desenho experimental	65
4.2.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e métodos qPCR.....	68
4.2.3 Alvos e primers	68
4.2.4 Normalização dos dados em tempo real e análise estatística	69
4.3 Resultados.....	69
4.3.1 Análise de sobrevivência	69
4.3.2 Estresse oxidativo	73
4.3.3 Cargas de patógenos	77
4.4 Discussão	80
4.5 Conclusões	84
5 CAPÍTULO V: Considerações finais	85
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICE	113
Apêndice 1. Sequencia dos primers, relativos aos genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante de <i>Apis mellifera</i> , utilizados nas reações de qPCR.....	113
Apêndice 2. Sequencia dos primers, relativos aos patógenos mais comuns de <i>Apis mellifera</i> , utilizados nas reações de qPCR.	114

1 CAPÍTULO I: Introdução geral e Objetivos

1.1 Introdução Geral

1.2 Relação das abelhas *Apis mellifera* com o Homem

As abelhas melíferas (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758), originalmente nativas dos continentes europeu, africano e asiático (na sua porção mais ocidental), foram amplamente espalhadas pelo mundo através de movimentos humanos de imigração (Figura 1). Hoje esses himenópteros gozam de uma distribuição cosmopolita (FRANK et al., 1998). Esses insetos são característicos por suas colônias constituídas por milhares de indivíduos em que se observa todas as características de eussocialidade (divisão reprodutiva, de trabalho, sobreposição de gerações e cooperação mútua na realização de tarefas específicas) (WINSTON, 1987).

Nas colônias de *A. mellifera* encontramos uma rainha (fêmea fértil), dezenas de milhares de operárias (fêmeas semi-estéreis) e algumas centenas de zangões (machos). A rainha é responsável pela deposição dos ovos, os zangões restringem-se ao acasalamento, enquanto as tarefas de manutenção da colônia são realizadas pelas operárias (MICHENER, 1974, 2000; WILSON, 1976; FREE, 1980). Assim como todos os outros himenópteros, as abelhas são insetos holometábolos e, portanto, passam por quatro fases durante o seu desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto ou imago.

A história natural das abelhas *Apis* é marcado por um grande período de coevolução com as plantas floríferas, o que permitiu que esses insetos se especializassem em processos de polinização. Tal processo mutualístico garante maior variabilidade genética na reprodução dessas plantas e oferece, como contrapartida, o uso do pólen e do néctar como fonte de nutrientes essenciais para as abelhas (WINSTON, 1987; KEARNS et al., 1998).

A longa convivência com os humanos também tornou *A. mellifera* um dos insetos com maior importância e utilidade na sociedade atual (GALLAI et al., 2009). Hoje, mais de 56 milhões de colônias são mantidas em todo o mundo (FAO, 2009; VURAL e KARAMAN, 2009).

Fonte: **A e B:** FRANCK et al., 1998; **C:** HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006.

Figura 1. A e B. As subespécies de *Apis mellifera* e suas respectivas regiões de origem. C. Estruturação genética das subespécies de *Apis mellifera*.

O mel é, com certeza, o produto apícola mais comercializado e consagrado, mas não é o único e, tampouco, o mais importante (CVITKOVIC et al., 2009). Estudos mostram que 70% das espécies vegetais cultivadas para consumo humano (87 culturas), no mundo, são beneficiadas com os serviços de polinização de *A. mellifera* (WILLIAMS, 1994; KLEIN et al., 2007; GALLAI et al., 2009). Tal serviço desempenhado por insetos representariam mais de 153 bilhões de euros anualmente (GALLAI et al., 2009). Nesse mesmo estudo Gallai et al. (2009) mostraram que a segurança alimentar no mundo é vulnerável diante do atual estado de conservação e constante declínio populacional dos polinizadores.

1.2.1 *Apis mellifera* no Brasil

A presença de abelhas do gênero *Apis* no Brasil é decorrente de sucessivas importações de diferentes raças de *A. mellifera* (BRAND, 1988; GONÇALVES, 2001), possivelmente iniciadas em 1839 com o padre Antônio Carneiro. O religioso teria importado, da região do Porto (Portugal), cerca de 100 colônias de abelhas (*A. mellifera iberica*), porém, apenas sete sobreviveram a longa viagem e foram instaladas no Rio de Janeiro (SEBRAE, 2015). Nas décadas seguintes as importações seguiram constantes, principalmente com o aumento da imigração portuguesa, alemã e italiana no sul e sudeste brasileiro. Essa primeira fase de desenvolvimento da apicultura nacional foi marcada pelas subespécies de *A. mellifera* de origem europeias, bem como a exploração rudimentar para produção de cera e mel (NOGUEIRA-NETO, 1972).

Somente em 1956 o pesquisador brasileiro Warwick Estevam Kerr, na tentativa de obter uma abelha melífera mais apropriada às condições climáticas brasileiras, importou, com autorização governamental, 49 rainhas de *A. m. scutellata* oriundas da África do Sul e Tanzânia (PEREIRA e CHAUD-NETTO, 2005). As 26 rainhas que sobreviveram à viagem foram introduzidas em colônias experimentais localizadas no Horto de Camaquan, em Rio Claro - SP (KERR, 1967). Em março do ano seguinte alguns enxames escaparam das colmeias experimentais e invadiram a zona rural. Esse episódio desencadeou o processo que, posteriormente, ficou conhecido como “africanização” das abelhas melíferas no Brasil.

As abelhas Africanizadas (AHB), encontradas em grande parte do Brasil, são polihíbridos resultante de múltiplos cruzamentos entre indivíduos de *A. m. scutellata* Lepeletier e outros das subespécies *A. m. mellifera* Linnaeus, *A. m. iberica* Goetze, *A. m. caucasica*

Gorbachev, *A. m. ligustica* Spinola e *A. m. carnica* Pollmann (RUTTNER, 1986; GONÇALVES e STORT, 1994).

O processo de “africanização” se estendeu para muitas regiões da América (Figura 2), desde a região central da Argentina até o sul dos Estados Unidos da América (Flórida, Alabama, Mississippi, Luisiana, Arkansas, Texas, Oklahoma, Arizona, Novo México, Califórnia, Utah e Nevada) (RINDERER et al., 1993) (Figura 3).

O processo rápido de expansão desse híbrido é atribuído à grande capacidade adaptativa apresentada por esse tipo de abelha às diferentes condições ecológicas (KERR, 1967; STORT e GONÇALVES, 1979; GONÇALVES, 1992; GONÇALVES e STORT, 1994; STORT e GONÇALVES, 1994; PEREIRA e CHAUD-NETTO, 2005). AHB receberam este nome porque frequentemente apresentam reprodução, forrageamento e comportamento de defesa semelhante aos observados na subespécie parental africana, *A. m. scutellata*. (GONÇALVES, 1974).

Aos poucos, os esforços de apicultores e pesquisadores brasileiros permitiram o desenvolvimento de um protocolo de manejo dessas AHB, de forma a adaptar as práticas ao comportamento e biologia dessas abelhas, além de otimizar a produção (DE JONG, 1996). Uma vez que os apicultores aprenderam a manejar corretamente as AHB, as vantagens inerentes à criação dessas abelhas (em climas similares ao do Brasil) ficaram evidentes. Ao longo dos anos foi possível constatar a superioridade de AHB (quando comparadas com subespécies europeias) em relação à produtividade, resistência às doenças e parasitas, rapidez no crescimento populacional e desenvolvimento de colônia (DE JONG, 1996).

Fonte: RUTTNER (1992).

Figura 2 Expansão das abelhas Africanizadas no continente Americano

Fonte: USDA-ARS (<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=11059&page=6>)

Figura 3. Mapa do sul dos EUA e o respectivo ano de ocorrência de abelhas Africanizadas

1.2.2 Melhoramento genético de abelhas melíferas

Apesar do milenar relacionamento entre homem e *A. mellifera*, iniciativas de melhoramento genético são relativamente recentes. Diferente de outros animais de produção, o complexo sistema reprodutivo desse inseto demandou alguns séculos para seu completo entendimento (MARTÍNEZ, 2012). Somente com o aprofundamento do conhecimento da biologia dessas abelhas, principalmente a partir de 1851, decorrente do desenvolvimento da colmeia de favos móveis (por Langstroth), é que se observou maior domínio na manipulação das colônias, assim como maior entendimento e controle das rainhas (HARBO e RINDERER, 1980; MARTÍNEZ, 2012).

As abelhas melíferas apresentam indivíduos haploides ou diploides em uma mesma colônia. Tal diferença é ligada a determinação sexual dos indivíduos, sendo ovócitos fertilizados (32 cromossomos) tornam-se fêmeas e aqueles não fertilizados (16 cromossomos) tornam-se machos (ROTHENBUHLER et al., 1968; WINSTON, 1987).

O acasalamento de rainhas virgens (não fecundadas) ocorre no ar e conta com a cópula de múltiplos zangões (WINSTON, 1987; TARPY et al. 2004). Sendo assim, o controle dos acasalamentos das rainhas virgens é extremamente difícil em condições naturais. Diante desse cenário, algumas técnicas que buscavam maior controle sobre os indivíduos que participam da cópula foram desenvolvidas. O isolamento de rainhas virgens e zangões em áreas em que não se encontram outros enxames (ilhas distantes, extensas áreas descampadas, canaviais e etc.) foi inicialmente utilizada (HARBO e RINDERER, 1980). Apesar de eficiente, quando bem-sucedida, essa técnica apresenta como principal contraponto a falta de praticidade. As exigências relativas aos locais para isolamento das colônias são bastante específicas, tornando escassas as opções de locais para realização de tal técnica.

A simples substituição de rainhas, por rainhas produzidas a partir de colônias mais produtivas, também é uma técnica amplamente utilizada até hoje. Essa metodologia foi possibilitada através do domínio do conhecimento prático de produção de rainhas (LAIDLAW e PAGE, 1997). As rainhas são produzidas, a partir de larvas de operárias oriundas de colônias produtivas, transferidas a cúpulas e instaladas dentro de outras colônias (induzidas a aceitar e nutrir células reais). Após o desenvolvimento completo essas rainhas são introduzidas em novas colônias com livre acesso aos voos nupciais (LAIDLAW e PAGE, 1997; OMHOLT e ÅDNØY, 1994). Tal técnica apesar de prática e acessível economicamente apresenta resultados limitados uma vez que só permite a seleção dos genes maternos (COBEY, 2007).

A inseminação instrumental é uma técnica na qual se transfere esperma do macho para o sistema reprodutivo da fêmea. Sendo assim, essa técnica tende a agilizar os programas de melhoramento genético, porque permite o completo controle da contribuição genética parental (MARTÍNEZ, 2012; TARPY et al., 2000, 2004; COBEY e SCHLEY, 2002).

A técnica de inseminação usualmente se baseia na deposição de 8 µl de sêmen nos ovidutos médios das rainhas virgens (PAGE e LAIDLAW, 2000). A técnica tem flexibilidade para realizar muitos tipos de acasalamentos controlados, porém, a prática mais usual é a inseminação de rainhas com uma mistura uniforme de espermatozoides de diferentes machos (MARTÍNEZ, 2012; HARBO, 1986).

A seleção dos machos é feita a partir do desempenho de suas irmãs, já que geralmente as avaliações são realizadas com base em características produtivas, das quais as operárias são responsáveis (VENCOVSKY e KERR, 1982; MANRIQUE, 2001). A técnica de inseminação de rainhas exige aparelhos e utensílios específicos (estereomicroscópios, aparelho de inseminação e etc.), ambiente estéril, além de habilidade e delicadeza durante a execução da técnica. Essas exigências fazem com que a técnica ainda seja quase que restrita ao ambiente acadêmico, no Brasil. Em países em que a apicultura é mais bem estabelecida, porém, se observa uma forte presença da iniciativa privada na produção e comercialização de rainhas inseminadas, assim como uma alta demanda de apicultores, o que resulta em um mercado perene de matrizes (AL-QARNI et al., 2003; COBEY, 2007).

Apesar dos inúmeros modelos de seleção de *A. mellifera* já desenvolvidos, a utilização dessas técnicas por apicultores no Brasil ainda é extremamente restrita. De Jong (1996) ressalta que isso se deve, principalmente, ao desconhecimento das vantagens que existem nas técnicas de melhoramento genético.

1.2.3 Cenário da Sanidade Apícola Mundial

Nos últimos dez anos, um acentuado declínio populacional vem sendo percebido nas espécies de polinizadores em países da América do Norte e Europa. Nas populações de *A. mellifera* esse fenômeno frequentemente é diagnosticado como uma perda rápida e acentuada de abelhas adultas (mas não da abelha rainha e das abelhas em desenvolvimento), juntamente com a ausência de respostas invasivas por abelhas-saqueadoras (vanENGELSDORP et al., 2007). Tal síndrome foi batizada como CCD (Colony Collapse Disorder) e, atualmente, é uma das maiores responsáveis por perdas econômicas para apicultores em regiões de clima temperado (LE CONTE, 2010).

Apesar da gravidade e recorrência, tal fenômeno ainda é pouco entendido pela ciência. Inúmeros agentes parecem exercer algum tipo de influencia negativa na biologia e fisiologia das abelhas melíferas, porém nenhum desses fatores foi comprovadamente identificado como desencadeador da CCD. Hoje a hipótese emergente mais aceita entre os pesquisadores da área trata do possível efeito sinérgico de inúmeros fatores como possível desencadeador dessa síndrome (FRAZIER et al., 2008; vanENGELSDORP et al., 2008; vanENGELSDORP et al., 2009; COX-FOSTER et al., 2007; LE CONTE, 2010). Entre os inúmeros efeitos, os pesticidas são um dos maiores causadores de danos fisiológicos às abelhas. Devido a dependência das monoculturas no uso de produtos químicos para controlar plantas daninhas, patógenos e principalmente insetos pragas (AKTAR et al., 2009), as abelhas vêm sendo expostas cada vez mais a quantidades consideráveis de pesticidas (MULLIN et al., 2010; DESNEUX et al. 2007, THOMPSON 2003, PEREIRA 2010). A contaminação por pesticidas pode acarretar a morte desses polinizadores, através do efeito letal desses produtos, ou mesmo causar danos mais sutis, através de doses sub-letais.

Alterações fisiológicas e/ou comportamentais das abelhas como paralisia e desorientação (cujos sintomas são dificilmente detectados) podem afetar a entropia da colônia e, dessa maneira, resultar em colapso total da mesma (PHAM-DELÈGUE et al., 2002; DECOURTYE et al., 2003; GUEZ et al., 2005; MEIXNER, 2010; PEREIRA, 2010). Mullin (2010) discute a presença de pesticidas nas colônias como uma possível causa de declínio nas populações de polinizadores em todo o mundo. O autor afirma que muitos dos pesticidas comumente usados são lipofílicos (como piretróides, organofosforados, algumas classes de fungicidas e herbicidas) o que pode causar acúmulo na matriz constitutiva das colônias (cera) originando assim altas concentrações desses pesticidas (BOGDANOV, 2004).

Herbicidas como o Paraquat[®] (1,1-dimetil-4,4-dicloreto de bipyridínio) são pesticidas não seletivos, massivamente usados em diversas culturas (CHEN et al., 2010). O uso extensivo dessa classe de defensivos agrícolas também é motivo de preocupação para apicultores e cientistas. Estes herbicidas induzem o estresse oxidativo em diversos sistemas vivos, o que, no caso do Paraquat, acarretou seu banimento em diversas regiões do mundo (EUA e diversos países da Europa ocidental) (FARRINGTON et al., 1973; ILETT et al., 1974; ANGELOVA et al., 2005; DINIS-OLIVEIRA et al., 2008; CHEN et al., 2010).

Inseticidas sistêmicos (como os neonicotinóides), aplicados ainda na semente das plantas, também podem estar relacionados com a diminuição populacional dos polinizadores. Resíduos desses inseticidas são comumente encontrados em pólen e néctar desses vegetais tratados (BONMATIN et al., 2005; CHAUZAT et al., 2006). Estudos também confirmaram

que os efeitos neurotóxicos de neonicotinóides são capazes de afetar a aprendizagem, memória e sistema de navegação das abelhas (DECOURTYE et al., 2004).

O uso de acaricidas, em particular tau-Fluvalinato e Coumaphos, para o controle de ectoparasitas, também vem sendo relacionado a alterações fisiológicas e comportamentais (HAARMANN et al., 2002; MULLIN et al., 2010; WILLIAMSON et al., 2013; ZHU et al., 2014). Coumaphos é um organofosforado neurotóxico que inibe a acetilcolinesterase, interferindo assim com a sinalização e função neurológica (BONCRISTIANI et al., 2012). Recentemente estudos mostraram que tal substância pode alterar a expressão gênica de diversas vias imunitárias e de desintoxicação (BONCRISTIANI et al., 2012; GARRIDO et al., 2013). Já o piretróide tau-Fluvalinato tem como alvo os canais de sódio dos neurônios de insetos e ácaros (BLOOMQUIST, 1996; ZLOTKIN, 1999; WANG et al., 2002; SODERLUND et al., 2002; DONG, 2007; EIRI e NIEH, 2012; SCHMEHL et al., 2014). Tau-fluvalinato já foi descrito impactando o desempenho reprodutivo e competitividade de rainhas e zangões (SOKOL, 1996; RINDERER et al., 1999). Locke et al. (2012) também encontraram efeitos diretos desse piretróide no aumento da suscetibilidade à infecção por vírus (especialmente DWV – Deformed wing virus).

Esses acaricidas são principalmente aplicados dentro das colônias na tentativa de controlar populações do ácaro *Varroa destructor* (ANDERSON e TREUMAN, 2000) (Acari: Varoidae). Esse ectoparasita é a principal praga apícola mundial, uma vez que se alimenta da hemolinfa de abelhas em desenvolvimento e adultas, causando redução no tempo de vida de operárias infestadas, imunossupressão e disseminação de patógenos virais (DE JONG et al., 1982; SCHATTON-GADELMAYER e ENGELS, 1988; ALLEN e BALL, 1996).

Até hoje, foram identificados 19 vírus afetando a saúde de *A. mellifera* (ALLEN e BALL, 1996; ELLIS e MUNN, 2005). Entre esses, os vírus mais relacionados com perdas econômicas são: DWV, “Black Queen Cell Virus” (BQCV), “Sacbrood Virus” (SBV), “Israeli Acute Paralysis Virus” (IAPV), “Kashmir Bee Virus” (KBV), “Chronic Bee Paralysis Virus” (CBPV), “*Varroa destructor* Virus” (VDV e “Acute Bee Paralysis Virus” (ABPV) (CHEN e SIEDE, 2007; DESAI e CURRIE, 2015). Outros parasitas como o ácaro traqueal *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae), pragas de colmeias como o coleóptero *Aethina tumida*, além de patógenos fúngicos (*Nosema apis* e *N. ceranae*), espécies de tripanosomatídeos (*Crithidia mellificae* e *Lotmaria passim*) e bactérias (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus pluton*) também são recorrentes preocupações de apicultores em muitas partes do mundo (PENG e NASR, 1985; BAILEY e BALL, 1991; WILSON et al., 1997).

Além dos citados, o aumento das áreas plantadas de monoculturas e consequente diminuição de áreas preservadas (e a inerente diversidade de flores), diminui as alternativas das abelhas para locais de nidificação e variedade de nutrientes (vanENGELSDORP et al., 2009; BRODSCHNEIDER e CRAILSHEIM, 2010; vanENGELSDORP e MEIXNER, 2010).

Com o cenário exposto, é evidente a crescente preocupação de apicultores e cientistas em relação à *A. mellifera*. É nesse mesmo contexto que estudos relativos à sanidade dessas abelhas se tornaram essenciais para a conservação da espécie e de seus serviços ecológicos.

1.2.4 O sistema produtivo e comercial de pólen apícola

A coleta de pólen floral realizada por abelhas operárias ocorre através de visitas das mesmas às anteras de plantas com flores, onde esses insetos entram em contato com o pólen (micro gametófito masculino vegetal). Geralmente os grãos de pólen são recolhidos e acumulados nas corbículas, a fim de transporta-los de forma mais eficiente até a colônia, onde são armazenados (WINSTON, 1987). Na colônia o pólen é estocado dentro de células de cera, onde passam por um processo de fermentação. Esse processo dá origem ao “pão de abelha” que é utilizado na alimentação de indivíduos adultos e em desenvolvimento (WINSTON, 1987).

A atividades de extração do pólen apícola é realizada com a ajuda de um coletor adaptado instalado nas colônias (BARRETO et al., 2006). Tal coletor é dotado de uma “trampa” (superfície de madeira, metal ou plástico constituída por inúmeros orifícios), na qual os péletes de pólen trazidos pelas operárias campeiras em suas corbículas são retidos e armazenados em gavetas coletoras, de onde posteriormente são recolhidos e comercializados.

Hoje podemos observar uma enorme diversidade de modelos de coletores existentes. Esses coletores geralmente diferem em diversos aspectos, porém, todos compartilham o uso da trampa coletora que deve ser posicionado no alvado (entrada) da colônia ou internamente (BARRETO et al., 2006) (Figura 4).

Atualmente mais de 1.500 toneladas de pólen apícola são produzidas anualmente em todo o mundo. Espanha, China, Austrália, Argentina e Brasil se destacam como os maiores produtores (FAO, 2009). A produção de pólen apícola vem experimentando uma rápida e empolgante expansão desde o final da década de 1990. Tal crescimento pode ser explicado pelo aumento do interesse popular em alimentos de alto valor nutricional. É nesse contexto que o pólen passa a ser utilizado como suplementação nutricional humana, graças à sua composição rica em vitaminas, aminoácidos essenciais, minerais, lipídios insaturados e

substâncias antioxidantes (ATTIA et al., 2011; TURNER et al., 2006; ATTIA et al., 2014; EL-ASELY et al., 2014). O pólen apícola também vem sendo relacionado a efeitos benéficos no tratamento de diversas doenças oncológicas, especialmente aquelas relacionadas à próstata (BUCK et al., 1989; HABIB et al., 1990; ZHANG et al., 1995; DHAR e SHOSKES, 2007; HANA et al., 2007; WU e LOU, 2007; XU et al., 2008; WANG et al., 2015). Pesquisadores também foram capazes de identificar melhores resultados produtivos na pecuária, quando pólen foi adicionado a dietas de coelhos (ATTIA et al., 2011), cavalos (TURNER et al., 2006), frangos (ATTIA et al., 2014) e peixes (EL-ASELY et al., 2014).

Fonte: A: MILFONT et al. (2011); B, C e D: BARRETO et al. (2006).

Figura 4. A. Abelha tentando passar pela trampa coletora. B. Exemplo de coletor com trampa interna (modelo Intermediário Interno). C. Coletor com trampa posicionada no alvado da colônia (modelo Tropical Africanizado-Baiano). D. Coletor com trampa posicionada na entrada do alvado (modelo Frontal).

Como resultado desse aumento na demanda por pólen, observou-se significativo aumento da importância desse setor da produção apícola (FAO, 2006). Especificamente no

Brasil, os bons preços oferecidos pelo mercado internacional fizeram com que a atividade se expandisse com especial destaque à região sul da Bahia onde os apicultores vêm conseguindo sólidas produções em meio a plantações de palmáceas (coco e dendê). A produção de pólen também incorpora um importante papel social, uma vez que milhares de famílias contam com este produto como sua principal fonte de renda.

Apesar da importância econômica, social e ecológica assumida por esse setor da cadeia produtiva apícola, poucos estudos vêm abordando o tema desde o fim da década de 1960. Tal desinteresse científico fez com que diversos aspectos relacionados às técnicas de manejo mais adequadas permanecessem pouco entendidos ou até mesmo nunca validados.

1.2.5 Pólen e sua relação com a saúde das abelhas *Apis*

Além dos desafios sanitários atuais, um dos motivos que mais contribuem para as perdas de colônias são as dietas inadequadas. Sabe-se que a dieta está intimamente ligada à composição da hemolinfa (MATTILA e OTIS, 2006; CAPPELARI et al., 2009; PIRK et al., 2010; DE GRANDI-HOFFMAN et al., 2010). Sendo assim, fontes estáveis de pólen são extremamente importantes para o crescimento saudável da colônia, uma vez que garantem diversos nutrientes essenciais (DE GRANDI-HOFFMAN et al., 2010).

O pólen floral é virtualmente a única fonte de proteínas e lipídios na dieta de abelhas melíferas apresentando, portanto, relação direta na produção do alimento larval (WINSTON, 1987). O pão de abelha também é um importante percussor dessas secreções produzidas nas glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrizas (enfermeiras) e utilizadas na produção da geleia real. A geleia real é componente da dieta de larvas e também da abelha rainha (WINSTON, 1987).

A proteína oriunda do pólen também tem papel importante no desenvolvimento de um sistema imunológico eficiente (RITZ e GARDNER, 2006; ROWLEY e POWELL, 2007; DE GRANDI-HOFFMAN et al., 2010). De Grandi-Hoffman et al. (2010) mostraram que os efeitos da infecção por DWV, transmitida através do ectoparasita *Varroa*, diminuem drasticamente em abelhas alimentadas com pólen ou suplementos proteicos, em condições laboratoriais. Janmaat e Winston (2000) reportaram uma mitigação significativa nos efeitos negativos do parasitismo de *V. destructor* quando o estresse proteico é aliviado, através de alimentação suplementar com pólen.

Além de fonte de proteína, o pólen também é uma rica fonte de substâncias antioxidantes. A grande quantidade de polifenóis presentes nesse nutriente também fez com

que pesquisadores testassem a inclusão desse produto como suplemento em diversas dietas animais. Ferreira et al. (2013) provaram que o pólen apícola é um eficiente mitigador de estresse oxidativo causado por resíduos de pesticidas em peixes.

Quando desafiados por altas demandas metabólicas (originadas por parasitas, patógenos e/ou outros estressores ambientais) organismos tendem a aumentar a produção ou ativação de proteínas antioxidantes (SORCI e FAIVRE, 2009; ALAUX et al., 2010; AUFAUVRE, 2012). O estresse oxidativo é uma condição biológica de perturbação do equilíbrio entre a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que reparem os danos causados por essas espécies reativas (SELYE, 1956; McEWEN, 2000; SANTORO et al., 2000; TAKEDA et al., 2008; AHMAD et al., 2012).

Para manter o equilíbrio oxidativo os organismos utilizam um sistema de defesa que é constituído por enzimas, tais como a acetilcolinesterase (AChE), carboxilesterases (CAES), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), bem como um sistema de defesa não enzimático composto de ácido ascórbico (ASA), o total de tióis (TT), peroxiredoxinas (PRX) e outros componentes (ORUÇ et al., 2004; AHMAD et al., 2012). Quando estes sistemas não conseguem manter tal equilíbrio pró-oxidantes podem induzir elevadas proporções de peroxidação lipídica e causar danos em tecidos e células (SOUTHORN e POWIS 1998). Substâncias antioxidantes como os polifenóis, presentes em grande parte dos pólenes florais, inibem ROS geradas pelo metabolismo celular prevenindo danos fisiológicos (GHELDOLF e ENGESETH, 2002; FERREIRA et al., 2013).

Diante do cenário atual, o pólen como imunofetor e mitigador do estresse oxidativo se tornou uma das mais proeminentes alternativas para proteção das abelhas *A. mellifera* e, consequentemente, dos serviços de polinização.

1.3 Objetivos

A pesquisa teve como principal objetivo a obtenção de informações que propiciassem o melhoramento das práticas vigentes de produção de pólen apícola. A pesquisa também buscou o melhor entendimento do efeito do pólen no sistema imunológico de abelhas melíferas (através do estudo da presença de patógenos) e no sistema de defesa antioxidante desses insetos.

1.4 Objetivos específico

1.4.1 Análise da influência de técnicas de manejo e variáveis climáticas na produção de pólen:

- a. Testar a influência do tamanho populacional das colônias na coleta de pólen apícola;
- b. Testar a influência de diferentes formatações de colmeias (tamanhos populacionais) sobre a coleta de pólen apícola;
- c. Testar a influência da suplementação de carboidrato na coleta de pólen apícola;
- d. Testar a influência da suplementação proteica na coleta de pólen apícola;
- e. Analisar o efeito de variáveis climáticas sobre a produção de pólen apícola;
- f. Elaborar um modelo matemático/estatístico preditivo capaz de compilar os efeitos apresentados pelas variáveis climáticas na produção de pólen apícola.

1.4.2 Melhoramento genético na produção de pólen apícola:

- a. Mensurar a capacidade de coleta de pólen de aproximadamente 80 colônias de abelhas africanizadas;
- b. Selecionar as colônias parentais (com as maiores médias produtivas);
- c. Produzir rainhas a partir das colônias mais produtivas;
- d. Realizar o cruzamento controlado dos zangões e rainhas (através de inseminação instrumental) dessas colônias mais produtivas, a fim de se formar novas linhagens (F1);
- e. Testar a produtividade média dessas novas linhagens (F1);
- f. Comparar o desempenho de diferentes técnicas de melhoramento genético no ganho produtivo de pólen apícola das diferentes gerações testadas, assim como de grupos controle.

1.4.3 Análise dos possíveis benefícios proporcionados pela nutrição, à base de pólen fermentado, na sanidade de colônias de *A. mellifera*:

- a. Identificar as taxas de sobrevivência decorrentes da exposição a diferentes concentrações do herbicida Paraquat® (utilizado como indutor de estresse oxidativo);
- b. Analisar os efeitos da dieta rica em pólen sobre as taxas de sobrevivência decorrentes da exposição a diferentes concentrações do herbicida Paraquat;
- c. Analisar o efeito de diferentes concentrações de Paraquat sobre a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante de abelhas melíferas;
- d. Analisar o efeito da dieta rica em pólen sobre a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante de abelhas melíferas;
- e. Analisar o efeito de diferentes concentrações de Paraquat sobre a incidência de patógenos virais, microsporídeos e espécies de tripanossomatídeos;
- f. Analisar o efeito da dieta rica em pólen sobre a incidência de patógenos virais, microsporídeos e espécies de tripanossomatídeos.

2 CAPÍTULO II: Análise dos efeitos do tamanho populacional, da suplementação alimentar e de variáveis climáticas sobre a produção de pólen apícola

2.1 Introdução

Entre as diversas práticas comumente observadas em sistemas produtivos de pólen apícola, no Brasil, o uso de colônias com pequenas populações é uma das mais aplicadas por apicultores. Apesar da escassez de estudos comprovando os benefícios reais de tamanhos reduzidos de populações à produção de pólen, ainda é frequente a observação de colônias produtivas com apenas 6 ou 8 quadros dentro das colmeias.

Na ciência tampouco existe unanimidade em relação ao efeito de populações diminutas sobre o forrageamento de pólen. Eckert et al. (1994) mostraram que a proporção de forrageiras que buscam pólen foi significativamente maior em colônias que apresentavam populações menores. Os autores sugerem que tal fato ocorre graças a necessidade dessas pequenas colônias em investir no crescimento populacional, a fim de garantir uma melhor provisão de alimento proteico, que está intimamente ligado à alimentação de indivíduos em desenvolvimento.

Taha e Saad (2013), no entanto, relatam que a quantidade de indivíduos em desenvolvimento e pólen coletado são positivamente afetados pelo tamanho da população colonial. Os autores sugerem que o desempenho superior das colônias mais populosas pode ser explicado por um número total maior de abelhas operárias exercendo tal comportamento de forrageamento.

Sabe-se que o sistema de regulação de coleta de pólen é altamente complexo. O número de forrageiras empregadas na coleta de pólen é influenciado positivamente pela quantidade de larvas e seus feromônios associados (PANKIW et al., 1998; PANKIW e Page Jr., 1999; PANKIW e RUBINK, 2002; PANKIW, 2004; PANKIW, 2007; TSURUDA e PAGE Jr., 2009); outros estímulos dentro do ninho, como a quantidade de pólen armazenado também apresenta influência negativa sobre o forrageamento (BARKER, 1971; FREE e WILLIAMS, 1971; MOELLER, 1972; FEWELL e WINSTON, 1992). A genética também é um fator importante, uma vez que afeta a “preferência” das abelhas operárias por forragear pólen ou néctar (ROBINSON e PAGR Jr., 1989; GUZMÁN-NOVOA et al., 1994; PAGE Jr. et al., 1995, 2000; CALDERONE e PAGE Jr., 1998; RUEPPELL et al., 2004; CHAPMAN et al., 2007). Fatores externos à colônia também parecem influenciar significativamente a coleta de pólen. As quantidades de recursos alimentares disponíveis no ambiente, bem como a

qualidade dessas fontes, foram comprovadamente associadas a frequência de forrageamento de pólen (NUNEZ, 1970, 1982; WADDINGTON, 1982; SEELEY, 1986; SEELEY e LEVIEN, 1987; FEWELL e WINSTON, 1996). A entrada de néctar na colônia, porém, não parece ser parte dessa regulação direta, apesar de vários autores relatarem um aumento na coleta de pólen quando a quantidade de néctar/mel armazenado é aumentada (FREE, 1967; FEWELL e WINSTON, 1996).

O uso de suplementação proteica é mais um tema relacionado ao sistema produtivo de pólen que vem levantando dúvidas em relação aos seus benefícios. Alguns estudos relatam que esse tipo de suplementação não tem efeito positivo sobre a quantidade de abelhas em desenvolvimento ou, até mesmo, apresenta efeito negativo sobre as quantidades coletadas (DOULL, 1980; SILVA et al., 2010). Outros estudos, no entanto, observaram melhores resultados produtivos quando a suplementação de proteína foi aplicada (SHEESLEY e PODUSKA, 1968; IBRAHIM, 1973; ALVES et al., 1997). A falta de um número significativo de estudos abordando os temas em questão vem dificultando conclusões assertivas relativas aos benefícios da suplementação alimentar e tamanho populacional de colônias na produção de pólen apícola.

Outro importante fator intrínseco às boas média produtivas é o clima. Sabe-se que as condições climáticas exercem importante impacto na biologia de *A. mellifera* (BROWN e PAXTON, 2009; KEARNS et al., 1998; MCCARTHY, 2001; PEÑUELAS et al., 2004; HEGLAND et al., 2009). Estudos mostram que as temperaturas máximas e mínimas diárias tem efeitos significativos nas atividades de polinizadores, incluindo o horário de pico da coleta, número de viagens de coleta e quantidade de pólen coletado (HEGLAND et al., 2009; WILLMER e STONE, 2004). Além dos comportamentos citados, essas variáveis climáticas também têm forte influência em tarefas relacionadas com a termorregulação do ninho e desenvolvimento de abelhas jovens (WINSTON, 1987). Frequência de chuvas, umidade relativa e fotoperíodo também podem afetar a fenologia de floração de muitas plantas, incluindo produção e maturação de néctar e pólen (SPARKS et al., 2000; FITTER e FITTER, 2002; KUDO et al., 2004; MILLER-RUSHING et al., 2006; SCHWEINGER et al., 2008). Portanto, fica clara a importância de diversas variáveis climáticas sobre a produção de pólen apícola, bem como as consequências ecológicas para serviços de polinização prestados por esses insetos (MEMMOTT et al., 2007; DEUTSCH et al., 2008; SCHWEIGER et al., 2010; HEGLAND et al., 2009).

Neste estudo tentamos compilar informações acerca do efeito de algumas técnicas de manejos, bem como de fatores abióticos (clima) no sistema de produção de pólen apícola.

Esse estudo também promove a discussão acerca dessas metodologias produtivas a fim de se indicar quais condições produtivas e técnicas empregadas se mostram mais adequadas. Um modelo estatístico capaz de explicar a influência das variáveis climáticas sobre a produção de pólen apícola, e sua consequente equação preditiva, também foram desenvolvidos.

2.2 Materiais e Métodos

As colônias utilizadas nessa fase da pesquisa contavam com rainhas africanizadas, irmãs, e de mesma idade. As colmeias utilizadas para manutenção das abelhas eram todas do modelo Langstroth (Figura 5). Os experimentos foram realizados em dois apiários experimentais, um deles localizado na zona rural do município de Luiz Antônio – SP (latitude: 21° 34' 59" S, longitude: 47° 44' 18" O), mais especificamente, dentro da estação experimental de Jataí. As colônias de abelhas mantidas nesse apiário se encontravam em meio a uma plantação de *Eucaliptus sp* (abandonada), bem como eram circundadas por vegetação nativa. O outro apiário experimental estava localizado na Universidade de São Paulo, município de Ribeirão Preto - SP (latitude: 21° 10' 42" S, longitude: 47° 48' 24" O, altitude: 545 m). Esse apiário também se encontrava em meio a áreas plantadas de *Eucaliptus sp* e vegetação nativa.

O modelo de coletor de pólen utilizado em todos os testes era semelhante ao descrito por Barreto et al. (2006) como “Intermediário Interno” (Figura 4B). Apesar da semelhança, o modelo desenvolvido por Raoni Duarte conta com adaptações que julgamos mais adequadas ao tipo de ensaio objetivado por esta pesquisa. A trampa era composta por orifícios de 5 mm de espessura por 5mm de diâmetro, homoganeamente distribuídos por 356,5 cm² (Figura 6B). A parte frontal contava com uma abertura ampla para a entrada de operárias forrageiras (112 cm²), bem como orifícios específicos para instalação de canudos de borracha que permitiam a saída de zangões, porém, não davam acesso ao interior da colônia a essas operárias (Figura 6D). A parte de trás do coletor permitia acesso à gaveta onde colhíamos o pólen coletado (Figura 6C, 7).

Os coletores foram instalados sobre a placa de fundo e abaixo da câmara de cria, em cada uma das colônias testadas (Figura 5).

O erro estatístico do tipo α assumido para todos os testes foi de 0,05. Todas as análises foram realizadas no software SPSS (IBM 2013).

Fonte: Sonoma-Bees (www.sonomabees.org/beekeeping-basics)

Figura 5. Configuração tradicional de colmeias modelo Langstroth.

Figura 6. Coletor de pólen desenvolvido por Raoni Duarte. **A.** Vista lateral do coletor utilizado na pesquisa; **B.** Trampa de 356,5 cm²; **C.** Acesso à gaveta coletora através da face traseira do coletor; **D.** Face dianteira do coletor com entrada de 112 cm².

Figura 7. Gaveta traseira do coletor utilizado. A posição em questão facilita a colheita uma vez que não interfere no fluxo de operárias forrageiras.

2.2.1 Tamanho Populacional

A influência do tamanho da população na coleta de pólen foi testada através da comparação da quantidade de pólen colhido em 35 colônias com diferentes configurações e, consequentemente, tamanhos populacionais (Tabela 1). Os testes foram realizados no apiário experimental de Luiz Antônio – SP. A metodologia utilizada para estimar o tamanho da população de cada formatação colonial testada foi a mesma desenvolvida por Burgett e Barikam (1985). Todas as coletas de dados foram efetuadas simultaneamente para os diferentes grupos. Após 30 dias em produção, a média coletada (g/dia) foi calculada para todas as colônias testadas.

A proporção de pólen coletado (de acordo com o tamanho populacional) também foi calculada através da seguinte equação matemática:

$$\text{Produção média de Pólen (g / dia)} \times \text{Tamanho populacional}^{-1} \times 10^{-3}$$

Tabela 1. As diferentes configurações utilizadas em todos os 6 grupos testados e os respectivos tamanhos populacionais correspondentes.

		Configuração					
		Câmara de cria			Melgueiras		Tamanho populacional aproximado*
Grupo	Número de colônias	Quadros de cria	Quadros de alimento	Quadros cobertos por abelhas	Quadros de alimento	Quadros cobertos por abelhas	
A	5	6	2	6	-	-	14.580
B	5	8	2	8	-	-	19.440
C	5	8	2	8	10	8	29.680
D	5	16	4	16	-	-	38.880
E	5	16	4	16	10	8	49.120
F	5	16	4	16	20	16	59.300
G	5	16	4	16	30	24	78.800

*Metodologia utilizada para o cálculo de tamanho populacional foi a mesma de Burgett e Barikam (1985).

2.2.2 Efeitos da suplementação de carboidrato e proteína

Esse estudo foi realizado no apiário experimental da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto -SP. Quarenta colônias, igualmente divididas em 4 grupos, foram padronizados em uma configuração idêntica a descrita para o Grupo C (Tabela 1). Essas colônias foram submetidas a diferentes tratamentos alimentares (Tabela 2) e tiveram sua produção de pólen registrada. Depois de um mês, a média produtiva (g/dia) foi calculada em cada uma das colônias testadas.

A suplementação proteica era homogeneizada manualmente e depositadas (200 g) sobre a parte superior dos quadros.

Tabela 2. Os diferentes tratamentos alimentares utilizados na pesquisa.

Grupo		Dieta	Número de colônias
1	Controle	-	10
2	Suplementação de carboidrato	Solução de sacarose (50%)	10
3	Suplementação proteica	200 g de homogeneizado contendo 70% açúcar glacé, 20% Aminopan®* e 10% de extrato de baunilha	10
4	Suplementação de carboidrato + proteica	Solução de sacarose (50%) + 200g do homogeneizado proteico	10

*Aminopan®: Suplemento nutricional comercial a base de aminoácidos.

2.2.3 Efeito de variáveis climáticas sobre a produção de pólen

Vinte colônias de *A. mellifera* (padrão Langstroth) foram usadas nessa fase da pesquisa. As colônias tinham aproximadamente o mesmo tamanho populacional no início do estudo (composto por oito quadros de cria e dois quadros de alimentos, com abelhas ocupando 8 dos 10 quadros). Todas as 20 colônias eram encabeçadas por rainhas irmãs de mesma idade. Este estudo também foi conduzido no apiário experimental da Universidade de São Paulo.

O experimento consistiu-se de observações e registros diários da frequência de abelhas operárias retornando com cargas de pólen (em suas corbículas), durante 3 minutos, em cada uma das colônias testadas. Todas as observações começaram à mesma hora, de janeiro a

dezembro de 2014 (abrangendo todas as estações do ano). A hora exata para início do experimento (07:30h) foi previamente testado e escolhido pelo maior número de abelhas operárias que retornavam com cargas de pólen.

Os dados observacionais foram estaticamente correlacionados com 11 variáveis climáticas amostradas diariamente. Esses dados climáticos foram obtidos em duas bases de dados gratuitas fornecidos pelo governo federal brasileiro e o governo do Estado de São Paulo (respectivamente: <http://www.inpe.br/>; <http://www.ciiagro.org.br/>). Ambos os bancos de dados registravam os dados meteorológicos da estação mais próxima ao apiário.

Variáveis meteorológicas observadas:

- a. Temperatura máxima do dia (°C);
- b. Temperatura mínima do dia (°C);
- c. Temperatura do ponto de orvalho no momento da observação (°C);
- e. Temperatura do ar no momento das observações (°C);
- f. Umidade relativa do ar no momento das observações (%);
- g. Pressão atmosférica no momento das observações (hPa);
- h. Variação da pressão atmosférica nas últimas três horas antes da observação (hPa);
- i. Cobertura de nuvens no momento das observações (%);
- j. Altura do primeiro leigo de nuvens no momento das observações (m);
- k. Velocidade do vento no momento das observações (m/s);
- l. Pluviosidade do dia (mm).

2.3 Resultados

Os apiários experimentais utilizados estão localizados em área de clima definido por duas estações: uma amena e seca (de abril a setembro) e outra quente e úmida (outubro a março) (KÖPPEN e GEIGER, 1928; SILVA et al., 2014). A flora local do *campus* da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto consiste de 289 espécies nativas, e introduzidas, distribuídas em 232 gêneros e 73 famílias botânicas – cerca de 67% destas apresentam a melitofilia como principal síndrome de polinização (ALEIXO et al., 2014; SILVA et al., 2014). Dentre essas espécies, encontramos diversos espécimes de *Alternanthera brasiliana*, *Chamissoa altissima* (Amaranthaceae); *Bidens sulphurea*, *Crepis japonica*, *Montanoa bipinnatifida*, *Sphagneticola trilobata*, *Tithonia diversifolia* (Asteraceae); *Eucalyptus citriodora*, *E. grandis*, *E. moluccana*, *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis*, *E.*

uniflora, *Syzygium cumini*, *S. malaccense* (Myrtaceae); *Paspalum notatum* e *Brachiaria sp* (Poaceae); *Citrus latifolia*, *C. limonia*, *Murraya paniculata* (Rutaceae).

A estação ecológica de Jataí, onde um dos apiários experimentais estava localizado, apresenta 137 espécies de plantas com flores, sendo 72 espécies vegetais características por militofilia (MATEUS, 2001). Entre essas espécies visitadas por abelhas, destacam-se aquelas das famílias Araliaceae, Asteraceae, Malpighiaceae, Bignoniaceae, Apocynaceae, Leguminosae, Sapindaceae, Myrtaceae e Poaceae (MATEUS, 2001).

De acordo com Almeida-Anacleto et al. (2012), espécies das famílias Amaranthaceae, Araliaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Poaceae e Rutaceae são importantes fontes de pólen para *A. mellifera* no Estado de São Paulo. Segundo Barreto et al. (2006), os períodos de janeiro a maio e fim de setembro a dezembro parecem apresentar maior abundância de fontes polínicas no estado.

2.3.1 Tamanho populacional

O grupo G de colônias, que apresentavam população aproximada de 78.800 abelhas, teve de ser descartado desta pesquisa. Durante os experimentos realizados não foi possível a coleta de pólen nesse grupo, devido ao excesso de abelhas operárias que congestionaram a entrada da colmeia, comprometendo assim o influxo de alimento e a termorregulação.

Os dados acerca da coleta de pólen, em colônias de diferentes tamanhos populacionais, não apresentaram distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov: $P < 0,001$; Shapiro-Wilk: $P < 0,001$) e, portanto, foram analisados através de métodos estatísticos não paramétricos. As colônias do grupo C apresentaram a maior quantidade média de pólen coletado por colônia ($40,45 \text{ g/dia} \pm 31,19 \text{ D.P.}$), seguido das colônias do grupo B ($34,64 \pm 19,93$), e das colônias do grupo F ($28,89 \pm 28,57$) (Tabela 3, Figura 8A). A comparação da quantidade de pólen coletado entre os diferentes tamanhos de população demonstrou diferença estatisticamente significativa (teste de Kruskal-Wallis: $K = 28,92$; $P < 0,001$) (Figura 8A). O teste de Dunn, aplicado como análise *post hoc*, também revelou diferenças significativas quando os grupos foram comparados de forma pareada (Figura 8B). A distribuição dos dados obtidos parece ser compatível com o modelo polinomial de terceiro grau (cúbico) ($R = 0,237$; $R^2 = 0,056$; $R^2 \text{ Ajustado} = 0,049$; $Z = 7,979$; $P < 0,001$) (Figura 9).

A maior proporção de pólen coletado em relação ao tamanho populacional foi registrada nas colônias do grupo B (1,78), seguido das colônias do grupo A (1,71), e finalmente as do grupo C (1,36) (Tabela 3). Uma intensa correlação estatística negativa foi observada quando o

modelo linear foi utilizado para explicar as variações observadas entre a variável dependente “proporção de pólen coletado” (de acordo com o tamanho da população) e a variável independente “tamanho populacional” ($R = -0,926$; $R^2 = 0,858$; $P = 0,007$) (Figura 10).

2.3.2 Efeitos da suplementação de carboidrato e proteína

Os dados relativos à coleta de pólen em colônias que receberam diferentes suplementos alimentares também não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk: $W = 0,896$, $P < 0,001$; Kolmogorov-Smirnov: $D = 0,214$; $P < 0,001$). Colônias que receberam suplementação de carboidrato (grupo 2) apresentaram a maior média de pólen coletado por dia ($79,59 \pm 68,55$ g/dia), seguida das colônias que receberam tanto a suplementação de carboidrato quanto a proteica (grupo 4) ($78,47 \pm 59,42$ g/dia). Colônias alimentadas somente com suplementação de proteína (grupo 3) mostraram a menor média de pólen coletado ($59,71 \pm 50,36$ g/dia). Colônias que não receberam suplementação (grupo 1) apresentaram produção de pólen de $63,44 \pm 63,79$ g/dia. A comparação feita através do teste de Kruskal-Wallis confirmou a existência de diferença significativa entre os tratamentos aplicados ($K = 7.971$; $P = 0.046$). O teste *post hoc* Mann-Whitney confirmou que o grupo 4 apresentou maior produção de pólen quando comparado com os grupos 1 e 3 (Figura 11).

Tabela 3. Os diferentes grupos testados e seus respectivos tamanhos populacionais (número aproximado de abelhas operárias), a quantidade média de pólen coletado (gramas de pólen por dia), o desvio padrão (D.P.) e a média de pólen coletado em relação ao tamanho da população.

Grupo	Tamanho populacional aproximado (TPA)	Quantidade média de pólen coletado (QMP)	D.P.	Relação da coleta de pólen e tamanho populacional*
A	14.580	24,95	14,83	1,71
B	19.440	34,69	19,93	1,78
C	29.680	40,45	31,19	1,36
D	38.880	20,71	14,53	0,53
E	49.120	25,10	19,37	0,51
F	59.360	28,89	28,57	0,48

*Calculado através da fórmula: $(QMP \div TPA) \times 10^3$

A

B

	A	B	C	D	E	F
A		0.745	0.127	> 0.999	> 0.999	> 0.999
B	0.745		> 0.999	0.089	0.357	0.150
C	0.127	> 0.999		0.018*	0.042*	0.002**
D	> 0.999	0.089	0.018*		> 0.999	> 0.999
E	> 0.999	0.357	0.042*	> 0.999		> 0.999
F	> 0.999	0.150	0.002**	> 0.999	> 0.999	

Teste de Dunn: *P ajustado < 0,05; **< 0,01

Figura 8. **A.** Comparação entre os diferentes grupos testados em relação aos respectivos valores médios de pólen coletado e o tamanho da população. **B.** Comparação estatística pareada (teste de Dunn). Barras superiores/inferiores representam desvio padrão.

Figura 9. Regressão não-linear dos dados relativos a quantidade de pólen produzido (g/dia) e a respectiva estimativa do tamanho da população.

Figura 10. Regressão linear da proporção de pólen coletado por abelhas operárias e o respectivo tamanho da população.

*Teste de Mann-Whitney: $P < 0,05$; ns: $P > 0,05$

Figura 11. Comparações pareadas (A, B, C, D, E e F) entre a quantidade média de pólen coletado (g/dia) nos diferentes grupos testados, através do teste Mann-Whitney. **1.** Colônias que não receberam qualquer suplemento (controle); **2.** Colônias alimentadas com suplemento de carboidrato; **3.** Colônias alimentadas com suplemento de proteína; **4.** Colônias alimentadas com suplementos de carboidrato e proteína.

2.3.3 Efeitos das variáveis climáticas sobre a produção de pólen

O número de abelhas operárias retornando com cargas de pólen foi utilizado como variável dependente para os testes estatísticos de correlação. O teste de Pearson foi aplicado em todas as variáveis climáticas, a fim de identificar quais seriam significativamente correlacionados entre si (Tabela 4). Em seguida, um modelo linear misto foi aplicado, usando todos os parâmetros testados. Devido a aderência do modelo aos dados obtidos, os logaritmos naturais ($\ln$) das medidas da variável dependente foram utilizados no modelo (Dados brutos: Critério de informação de Akaike (AIC): 7603,1; Critério de informação de Akaike corrigido (AICc): 7603,1; Critério de informação Bayesiano (BIC): 7606,6. $\ln$ dos dados: AIC: 1890,6; AICc: 1890,6; BIC: 1.894,1) (Figura 12).

Sete variáveis, de um total de 11 testadas foram estatisticamente correlacionadas com a coleta de pólen: A temperatura máxima do dia ($P < 0,001$), a temperatura mínima do dia ($P = 0,006$), a temperatura do ponto de orvalho ($P = 0,002$), umidade relativa do ar na hora da medição ($P = 0,041$), a cobertura de nuvens na hora da medição ($P < 0,001$), precipitação das últimas 24 horas ($P < 0,001$) e a data da amostragem ($P < 0,001$) (Tabela 5).

Tabela 4. Correlação de Pearson entre o número de abelhas operárias retornando com cargas de pólen e as 11 variáveis climáticas observadas.

	Pólen coletado	Temp. do ar	Pressão atmosférica	Var. pressão atmosférica	Cobertura de nuvens	Temp. ponto de orvalho	Altura base de nuvens	Umidade relativa	Temp. máxima	Temp. mínima	Pluviosidade	Velocidade do vento
Pólen coletado	1.00	0.28	0.05	-0.22	0.00	0.31	0.04	0.05	0.35	0.20	0.16	0.01
Temp. do ar	0.28	1.00	-0.16	-0.42	0.08	0.40	0.00	-0.18	0.60	0.46	0.05	-0.07
Pressão atmosférica	0.05	-0.16	1.00	0.13	0.19	0.23	-0.08	0.09	0.05	0.44	0.06	-0.40
Var. pressão atmosférica	-0.22	-0.42	0.13	1.00	-0.38	-0.22	-0.03	0.32	-0.26	-0.10	-0.01	0.21
Cobertura de nuvens	0.00	0.08	0.19	-0.38	1.00	0.35	-0.24	-0.13	0.12	0.33	0.26	-0.30
Temp. ponto de orvalho	0.31	0.40	0.23	-0.22	0.35	1.00	-0.18	0.33	0.33	0.58	0.16	-0.21
Altura base de nuvens	0.04	0.00	-0.08	-0.03	-0.24	-0.18	1.00	-0.22	0.18	-0.07	-0.03	0.07
Umidade relativa	0.05	-0.18	0.09	0.32	-0.13	0.33	-0.22	1.00	-0.19	-0.09	0.22	0.22
Temp. máxima	0.35	0.60	0.05	-0.26	0.12	0.33	0.18	-0.19	1.00	0.58	0.08	-0.16
Temp. mínima	0.20	0.46	0.44	-0.10	0.33	0.58	-0.07	-0.09	0.58	1.00	0.20	-0.46
Pluviosidade	0.16	0.05	0.06	-0.01	0.26	0.16	-0.03	0.22	0.08	0.20	1.00	-0.11
Velocidade do vento	0.01	-0.07	-0.40	0.21	-0.30	-0.21	0.07	0.22	-0.16	-0.46	-0.11	1.00

Figura 12. Comparação entre a justaposição do modelo proposto com o uso da variável dependente em dados brutos (A) e depois da transformação para log natural (B).

Tabela 5. Intensidade e direção dos efeitos das variáveis climáticas na coleta de pólen apícola (ANOVA).

	Estimativa	E.P.	G.L.	t	P
Intercepto	46.5885	11.557	41	4.03	0.0002
Temp. ar	0.02317	0.0205	622	1.13	0.2606
Pressão atmosférica	0.008368	0.00639	622	1.31	0.1909
Var. pressão atmosférica	-0.05875	0.0603	622	-0.97	0.3304
Cobertura de nuvens	-0.00539	0.00117	622	-4.59	< 0.001
Data da observação	-0.00267	0.00044	622	-6.07	< 0.001
Temp. ponto de orvalho	0.04815	0.0160	622	3.01	0.0028
Altura da base de nuvens	-0.00016	0.00011	622	-1.47	0.1425
Umidade relativa	-0.00381	0.00185	622	-2.05	0.0406
Temp. máxima	0.06735	0.0185	622	3.63	0.0003
Temp. mínima	0.06861	0.0251	622	2.73	0.0064
Pluviosidade	0.02959	0.00832	622	3.55	0.0004
Velocidade do vento	0.04570	0.0322	622	1.42	0.1566

A equação matemática preditiva produzida para compilar todos os parâmetros testados estatisticamente:

$$\text{Produção de pólen apícola} = 46,5886 + (0,6735 \times TMax) + (0,06861 \times TMin) + (0,04815 \times TPO) + (0,02959 \times Plu) - (0,00381 \times Umi) - (0,00539 \times CoN) + (-0,00267 \times Dat)$$

TMax: Temperatura máxima; *TMin*: Temperatura mínima; *TPO*: Temperatura de ponto de orvalho; *Plu*: Pluviosidade; *Umi*: Umidade; *com*: Cobertura de nuvens; *Dat*: Data da coleta de dados.

2.4 Discussão

Vários autores têm abordado os efeitos do tamanho da população na coleta de pólen com enfoque evolutivo, porém poucos têm discutido o efeito do tamanho populacional sobre a produção de pólen apícola. Apesar da escassez de estudos que comprovem as vantagens de populações menores no sistema produtivo, é muito comum apicultores priorizando colônias de populações menores, ou mesmo dividir as colônias maiores em duas menos populosas.

Eckert et al. (1994) sugere que as pequenas colônias devem investir no crescimento da população para garantir, entre outras coisas, a sobrevivência no período de inverno e, por essa razão, o número proporcional de abelhas campeiras coletando pólen deve ser maior. Nossos dados reforçam a conclusão de que as colônias mais povoadas apresentam, proporcionalmente, menor quantidade de forrageiras coletando pólen. Uma elevada e significativa correlação linear negativa foi registrada entre a quantidade proporcional de pólen coletado por abelha operárias e o tamanho estimado da população. Contudo, nossos dados mostraram maiores quantidades totais de pólen foram coletados nas colônias de médio porte. Os nossos resultados também sugerem que a produção de pólen, em relação ao tamanho populacional, se encaixa em um modelo estatístico de terceiro grau (cúbico) de distribuição polinomial.

Os resultados obtidos também sugerem que o maior número total de forrageiras apresentado por colônias médias e grandes é mais vantajoso para sistemas produtivos do que a maior proporção relativa, observada nas colônias de tamanho menor.

Colônias de tamanho intermediário e pequeno, no entanto, apresentaram eventos de obstrução da entrada da colônia com menor frequência do que as configurações que

compunham tamanhos populacionais maiores (grupos D, E e F). A obstrução foi recorrente em períodos de pico de forrageamento e provavelmente afetou o desempenho dessas colônias maiores. A obstrução da entrada é um fato preocupante uma vez que pode dificultar significativamente a termorregulação, além de prejudicar o influxo de alimentos, resinas e água.

O número de quadros de cria utilizado para compor cada configuração também pode ser parte da explicação do sucesso de colônias de tamanho intermediário. Provavelmente a área de cria maior permitida por configurações como a do grupo C estimulou melhores resultados de forrageamento de pólen, quando comparados com os de formatações menores. Sabe-se que a quantidade de larvas na colônia é um significativo estimulante para a coleta de pólen (FEWELL e PAGE Jr., 1993; ECKERT et al., 1994; PANKIW e PAGE Jr., 1999; LE CONTE et al., 2001; PANKIW e RUBINIK, 2002; PANKIW, 2007; TSURUDA e PAGE Jr., 2009).

O uso de suplementação de carboidrato para aumentar a coleta de pólen se mostrou vantajosa. Alguns autores descreveram uma melhora na quantidade total de pólen coletado quando as abelhas foram previamente alimentadas com soluções de sacarose (FREE e SPENCERBOOTH, 1961; FREE, 1965; BARKER e JAY, 1978; GOODWIN, 1994; SILVA et al., 2010). Nossos dados estão de acordo com esta conclusão, uma vez que grupos alimentados com o suplemento de carboidratos (2 e 4) mostraram as maiores médias produtivas registradas (Figura 11). Apesar da inexistência de diferença estatística significativa entre os grupos 2 e 4 (Figura 11E), uma ligeira superioridade foi observada em colônias alimentadas com suplementação apenas de carboidrato e, por essa razão, sugerimos a hipótese de que a suplementação de proteína pode desempenhar um papel inibitório sobre a produção de pólen apícola. O fato de o grupo 3, alimentado somente com a suplementação de proteína apresentar as menores médias de produção pólen (menor do que o grupo controle) corrobora com essa hipótese. É importante salientar que os resultados obtidos são relativos à formulação proteica suplementar testadas nessa pesquisa. Mais estudos são necessários para conclusões definitivas acerca de outras formulações proteicas que podem ser usadas na suplementação alimentar de *Apis*. O Aminopan foi escolhido por sua disponibilidade nacional (é comercializado em todo Brasil), além de preço acessível, frente a outras formulações de suplementação animal.

Sabe-se que um forte componente genético afeta a "escolha" de operárias entre o forrageamento de pólen e néctar. Apesar disso, estudos comprovam a existência de plasticidade nesses comportamentos, uma vez que os indivíduos podem alternar entre a

atividade de coleta de néctar e pólen de acordo com a necessidade da colônia (CALDERONE e PAGE Jr., 1991; FEWELL e PAGE Jr., 1993; FEWELL e WINSTON, 1996). Estudos também comprovam que o componente genético também exerce influência sobre a carga de pólen carregada pelas operárias. Forrageiras de pólen tendem a transportar quantidades relativamente maiores de pólen e menores de néctar e vice-versa (HUNT et al., 1995; PAGE Jr. et al., 2000). Por sua vez, sabe-se que a coleta de néctar é controlada principalmente pela disponibilidade e qualidade das fontes de néctar (NUNEZ, 1970, 1982; SEELE, 1986; SEELEY e LEVIEN, 1987; WADDINGTON, 1982; FEWELL e WINSTON, 1996). Possivelmente a alta disponibilidade de carboidrato induzida pela suplementação oferecida deve ter encorajado a alternância de forrageiras de néctar em forrageiras de pólen. Free (1967), Fewell e Winston (1996) também encontraram um ligeiro, porém significativo, aumento da coleta de pólen e/ou tamanho da carga quando maiores níveis de néctar/mel eram armazenados na colônia.

Keller et al. (2005) reuniu uma rica revisão dos estudos relacionados com a regulação do comportamento de forrageamento de pólen. Os autores destacam a complexidade do sistema de regulação e a dificuldade em prever como uma variável específica altera o comportamento da colônia. A hipótese de que a suplementação de proteína inibe a coleta de pólen, através dos voláteis produzidos pela fermentação de tal dieta, não é descartada, mas, provavelmente, não deve ser a razão principal para a diminuição observada. Dreller e Tarpy (2000) mostraram que o estímulo olfatório é insuficiente para aumentar ou diminuir o esforço de procura por alimentos. Ao invés, sugerem que um sistema de regulação individual mais complexo deva desempenhar tal papel regulatório. Camazine et al. (1998) apoia a hipótese de que as abelhas enfermeiras fornecem informações às operárias forrageiras acerca da necessidade da colônia por pólen. Segundo a hipótese de Dreller e Tarpy (2000), as operárias enfermeiras modulariam, portanto, o forrageamento de pólen a partir das medidas das necessidades nutricionais da colônia, calculada através da interação dessas operárias com as abelhas em desenvolvimento (que demandam alimentação proteica). Informações acerca da oferta intracolônica seriam recolhidas através da procura e consumo de pólen por essas abelhas enfermeiras, que utilizam o pólen para a produção de secreções glandulares (CAMAZINE et al., 1998).

A alta disponibilidade proteica dentro da colônia (aparentemente medidas pelas abelhas enfermeiras) parece interagir com o mecanismo regulador responsável pela redução da coleta de pólen. Como consequência desse sistema, colônias regularmente alimentadas com suplementos proteicos tendem a aumentar a produção de abelhas em desenvolvimento, porém

diminuem esforços relativos ao forrageamento de pólen (FEWELL e WINSTON, 1992). Camazine (1993) mostrou que muitas forrageiras respondem à adição de pólen na dieta mudando a frequência da atividade forrageira para, preferencialmente, néctar ou permanecendo na colmeia e cessando por completo a atividade de forrageamento. Os dados obtidos em congruência com as informações de pesquisas prévias nos permitem sugerir a regulação do forrageamento de pólen através de um sistema que conta como principal “gatilho” as abelhas enfermeiras.

Os dados também mostram que a suplementação de proteína apresentou um efeito inibidor sobre a coleta de pólen. Keller et al (2005) também enfatizam que as abelhas podem se beneficiar da suplementação proteica apenas quando a disponibilidade de pólen no ambiente é criticamente baixa. Em sistemas produtivos ideais apenas colônias que apresentam uma capacidade destacada de coleta devem ser utilizadas. Além disso, os coletores empegados devem reter apenas uma parte do pólen coletado pelas abelhas forrageiras (geralmente 60 - 75%), permitindo uma provisão adequada para abelhas em desenvolvimento (MILFONT et al., 2011). Essas colônias também devem ser instaladas em locais onde existe abundância e regularidade de fontes polínicas. Se todas essas medidas forem adotadas, a utilização de suplementação proteica pode ser restrita a eventuais períodos de escassez de alimento no ambiente.

Os resultados referentes aos efeitos de variáveis climáticas sobre a produção de pólen nos permitem afirmar que muitas das variáveis observadas apresentam significativa correlação com a coleta de pólen. Sabe-se que a atividade de forrageio das abelhas é positivamente influenciada pelo aumento da temperatura. Sendo assim, elevações térmicas brandas tendem a facilitar a termorregulação do ninho ($\sim 34^{\circ}\text{C}$), permitindo assim que um número menor de operárias se dediquem a tal serviço de manutenção térmica. A temperatura do ponto de orvalho também se mostrou positivamente correlacionada com a coleta de pólen. Tal fato pode ser explicado pela correlação de tal medida térmica com a umidade relativa do ar. Quando a temperatura do ponto de orvalho está alta, o ar estará provavelmente saturado de umidade. Portanto, a manutenção da umidade dentro da colônia ($\sim 80\%$) se torna mais fácil nessas condições, prevenindo que um grande número de operárias se empenhem em viagens de coleta de água.

O conforto térmico de animais de produção é um dos fatores mais observados na pecuária, uma vez que a temperatura tem influência direta na fisiologia e comportamento dos animais (DESHAZER et al., 2009). A produção apícola de qualquer natureza é, sem dúvida, beneficiada quando as colônias se encontram em situação de conforto térmico, permitindo

então que as operárias se dediquem com mais afinco aos comportamentos relativos à provisão de alimento. Assim como as medidas térmicas, a pluviosidade observada também apresentou uma significativa correlação positiva com a coleta de pólen apícola. Apesar de estar ligada à pausa momentânea das atividades de forrageamento, devido a dificuldade enfrentada por esses insetos diminutos ao voar no momento das precipitações, a pluviosidade tem efeito positivo na floração e produção de pólen floral dos vegetais. Por uma questão de disponibilidade nos bancos de dados consultados, a variável em questão foi analisada em milímetros de pluviosidade diária e não no exato momento em que a observação foi feita. Mais estudos são necessários para que se conclua a correlação de dados relativos a precipitação no momento em que as medidas de forrageamento são feitas. A cobertura de nuvens, medida no momento da observação, se correlacionou negativamente com a coleta de pólen. Sabe-se que o sol é importante para as abelhas como instrumento de indicações de fontes de alimento (WINSTON, 1987; FRISCH, 1967; SEELEY, 1995; WENNER et al., 1990). Sendo assim, período de nebulosidade podem dificultar esse complexo sistema de indicação intracolônia, resultando em correlação negativa com a coleta de pólen.

2.5 Conclusão

Este estudo traz informações importantes sobre o desenvolvimento de um sistema produtivo de pólen apícola mais eficaz. A utilização de populações coloniais de tamanhos médios (entre 19.000 e 30.000 operárias), combinada com suplementação de carboidrato devem produzir melhores resultados na produção de pólen. Também concluímos que apiários de produção de pólen devem, prioritariamente, ser instalados em regiões de temperaturas tropicais (com amplitudes térmicas baixas), cujo ponto de orvalho também é elevado (alta umidade média) e com períodos moderados de precipitação (porém com frequência regular).

3 CAPÍTULO III: Avaliação do ganho genético promovido por duas técnicas de melhoramento no sistema produtivo de pólen apícola

3.1 Introdução

No Brasil a produção de pólen vem se beneficiando pouco do melhoramento genético, uma vez que poucos apicultores empregam tal estratégia. Os poucos produtores que promovem o melhoramento do seu plantel produtivo o fazem através de técnicas de melhoramento unilateral. Essas técnicas só permitem a seleção dos genes maternos, uma vez que se baseiam na produção de rainhas a partir das colônias mais produtivas e posterior acesso livre dessas matrizes ao acasalamento no ambiente. A eficiência parcial de tal estratégia de melhoramento pode ser explicada pela biologia das abelhas *Apis*, cujos acasalamentos ocorrem no ar e contam com uma rainha e diversos machos, frequentemente mais de doze (WINSTON, 1987; TARPY et al., 2004; PESO et al., 2013).

As técnicas de melhoramento genético unilaterais promovem alta variabilidade genética, quando comparadas com técnicas de seleção bilaterais (que selecionam machos e fêmeas). Tal variabilidade genética é sabidamente importante para a efetividade de comportamentos relacionados com a coleta de pólen, uma vez que são inúmeros os estudos que relacionam positivamente maior diversidade poliândrica com melhores resultados em coleta e armazenamento de pólen (RICHARD et al., 2011; KOCHER et al., 2009; KOCHER et al., 2010; NIÑO et al., 2012; PESO et al., 2013; MATTILA e SEELEY, 2007; ECKHOLM et al., 2011; 2015). Porém, devido à alta herdabilidade das características relativas à coleta e armazenamento de pólen (PAGE Jr., 2013), é plausível hipotetizar que o melhoramento genético, através de sistemas de seleção bilaterais, possa promover interessantes resultados.

O “pollen-hoarding trait” (PHT) é uma síndrome de forte composição genética que, quando expressa em altas frequências, tende a aumentar as quantidades de pólen estocados na colônia (CALDERONE e PAGE Jr., 1988, 1991). Sabe-se que tal síndrome tem influência direta em diversos traços comportamentais como distância de forrageamento, preferência das operárias por coletar pólen ou néctar, número total de forrageiras destacadas para a tarefa de coletar pólen e sensibilidade à concentração de açúcares em néctares (PAGE Jr et al., 1995; ECKHOLM et al., 2011). O PHT, porém, jamais foi testado com objetivos produtivos e, ainda hoje, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos desta síndrome no melhoramento genético para fins de produção de pólen apícola.

Diferente da seleção unilateral a inseminação instrumental proporciona um controle maior dos genes que estarão presentes nas gerações seguintes, uma vez que existe controle de ambos os parentais que participarão do processo de inseminação. Sendo assim, o uso de tal técnica de seleção genética aumenta a probabilidade da presença de genes relacionados à eficiência na coleta de pólen e consequentemente do valor genético dessas gerações produzidas.

Neste estudo testamos o desempenho produtivo de colônias encabeçadas por rainhas fecundadas através de processos de livre-acasalamento (FM) e inseminação instrumental (IQ).

3.2 Material e Métodos

O estudo foi realizado no município de Luís Antônio, Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil (latitude: 21°34'59" S, longitude: 47°44'18" O). Iniciamos o experimento medindo a coleta de pólen em 80 colônias (padrão Langstroth) que apresentavam, aproximadamente, o mesmo tamanho populacional (29.680 abelhas segundo a técnica de BURGETT e BARIKAM, 1985). Coletores de pólen foram instalados entre a câmara de criação e a placa de fundo, em cada uma das colônias testadas. O modelo de coletor utilizado é o mesmo descrito na Figura 5.

Ao final do período de amostragem calculou-se a média produtiva de cada colônia (g/dia). Posteriormente, as duas colônias que apresentaram as maiores médias produtivas foram selecionados como matrizes reprodutoras (BS): A e B (Figura 13). As outras 78 colônias foram classificadas como o grupo de descarte voluntário (VC).

A geração F1 de rainhas foi produzida a partir de BS (colônia A), seguindo práticas padrões de produção de rainhas (LAIDLAW e PAGE Jr., 1997). Rainhas da geração F1 foram submetidas à diferentes técnicas de acasalamento: Inseminação instrumental, usando múltiplos zangões e livre acasalamento. A Inseminação instrumental foi realizada com zangões produzidos na colônia B. Para isso, os machos, ainda imaturos, foram marcados dentro da colmeia e, 10 dias depois, recolhidos para a extração de sêmen. Rainhas produzidas a partir de colônia A foram inseminadas instrumentalmente com uma mistura de 8,0 µl do sêmen colhido de 12 zangões irmãos (oriundo da colônia B) (Figura 14). Após o processo de inseminação instrumental, as rainhas fecundadas foram introduzidas em colônias órfãs com telas de exclusão de rainhas instaladas nas entradas das colmeias para evitar que essas tentassem voos de acasalamento. Após 10 dias, as colônias foram inspecionadas e aquelas que

apresentavam postura de ovos foram incluídas em análises subsequentes (10 rainhas inseminadas).

O acasalamento livre também foi permitido à dez rainhas, produzidas a partir da mesma colônia A. Essas rainhas, ainda virgens, foram introduzidas em colônias órfãs com livre acesso a voos de acasalamento. Depois de 10 dias, a partir da introdução das rainhas virgens, as colônias que apresentavam postura de ovos foram incluídas nos próximos passos da pesquisa.

Após 70 dias (a partir da detecção de postura de ovos das rainhas F1), quando as colônias já haviam substituído as populações iniciais por descendentes das novas rainhas introduzidas, a produção de pólen apícola foi novamente medida. Após 30 dias em produção, a média de pólen coletado (g/dia) foi calculada em cada uma das colônias testadas.

Um grupo de 20 colônias, escolhidas aleatoriamente, foi mantido como controle (PC). A produção de pólen também foi mediada nessas colônias, concomitantemente e seguindo as mesmas metodologias aplicadas aos grupos anteriores. Uma vez calculado o peso médio de produção de pólen nessas colônias controle, as rainhas foram substituídas por suas filhas (F1C). Essas rainhas também tiveram livre acesso a voos de acasalamento.

Posteriormente o grupo F1C também teve sua média produtiva calculada, assim como em todos os grupos anteriores. Ambos os grupos controle foram utilizados para nos ajudar a identificar possíveis efeitos da sazonalidade sobre as produções de pólen observadas.

As comparações de médias produtivas realizadas nos grupos BS e PC forma contemporâneas, assim como nos grupos FM, IQ e F1C.

ANOVA foi usada para comparar a produção de pólen entre os grupos testados. O teste de Tukey foi utilizado como *post hoc* para comparações pareadas. O erro (α) assumido para todos os testes estatísticos foi de 0,05. Todas as análises foram realizadas no software SPSS (IBM, 2013).

Pop: n= 80; **BS:** n= 2; **PC:** n= 20; **FM:** n= 20; **IQ:** n= 20; **F1C:** n= 20.

Figura 13. Esquema das técnicas de melhoramento genético empregadas na pesquisa e as colônias controle.

Figura 14. Processo de inseminação instrumental de rainhas de *A. mellifera*.

3.3 Resultados

A média de coleta de pólen das 80 colônias iniciais variou 14,19 - 58,83 g/dia (média = 34,32 g/dia; D.P. = 13,50). As duas colônias selecionadas (BS) apresentaram as maiores médias de produção de pólen: $58,83 \pm 23,11$ g/dia e $53,37 \pm 31,20$ g/dia (respectivamente: A e B). O grupo VC produziu $25,73 \pm 11,12$ g/dia. A média de coleta de pólen entre o grupo BS e o grupo VC foi significativamente diferente ($t = 4,62$; $P < 0,001$) (Figura 15).

Detectamos um aumento significativo na produção média de pólen entre as colônias parentais (BS) e as colônias encabeçadas por rainhas filhas fecundadas por diferentes técnicas (BS vs. IQ: $t = 7,64$, $P < 0,001$; BS vs. FM: $t = 11,95$; $P < 0,001$). No entanto, não detectamos diferenças significativas entre as colônias do grupo controle PC e F1C ($t = 1,799$; $P = 0,1056$) (Figura 16).

A geração F1 gerada através do tratamento IQ produziu 2,74 vezes mais pólen do que a geração parental ($153,95 \pm 42,83$ g/dia). Observou-se também um aumento na produção de pólen para o tratamento FM, $100,07 \pm 8,23$ g/dia, mas o aumento foi apenas 1,78 vezes maior do que de BS. A diferença na produção de pólen entre os tratamentos IQ e FM também foi estatisticamente significativa ($t = 3,89$; $P = 0,003$) (Figura 17).

ANOVA: $P < 0,001$; *Teste de Tukey: 0,001

Figura 15. Produção média de pólen apícola (g/dia) observada em uma população de 80 colônias (Pop), as colônias que apresentaram as maiores médias produtivas (BS) e as colônias excluídas do programa de seleção. Barras laterais representam desvio padrão.

ns: Teste de Tukey: $P = 0,105$

Figura 16. A média produtiva (g/dia) observada nas duas gerações usadas como controle: Parental (PC) e F1 (F1C).

ANOVA: $P < 0,001$; *Teste de Tukey: $P = 0,003$; ** $P < 0,001$

Figura 17. Comparação da média produtiva de pólen apícola (g/dia) observada nas gerações Parental (BS), F1 com inseminação instrumental (IQ) e F1 com acasalamento livre (FM). Barras superiores/inferiores representam desvio padrão.

3.4 Discussão

Esse estudo foi pioneiro, no Brasil, na utilização de inseminação instrumental de *A. mellifera* aplicado à produção de pólen apícola. Os resultados obtidos nos permitiram constatar significativas melhoras nas médias produtivas observadas em apenas uma geração. Estes resultados são, provavelmente, independentes dos efeitos de variações sazonais, uma vez que não foi observada mudança significativa na produção de pólen entre a gerações parental e F1 nas colônias do grupo controle.

Sabe-se que a herdabilidade de diversos traços comportamentais relacionados a coleta de pólen são altamente aditivos (HUNT et al., 1995; PAGE Jr. et al., 2000; RÜPPELL et al., 2004; RUEPPEL, 2014). Os resultados obtidos nos permitem sugerir que a inseminação instrumental parece propiciar que genes desejáveis sejam herdados pela prole em maior frequência. A explicação se encontra na seleção bilateral característica dessa metodologia.

Apesar dos resultados obtidos reforçarem a significativa influência genética no comportamento de coleta de pólen e, conseqüentemente, aumento produtivo, ainda é impossível qualquer afirmação acerca da sobreposição de genes (ou *loci*) entre os fenótipos característicos da PHT e aqueles selecionados com fins produtivos. Para que esse aspecto da herança das características produtivas de pólen apícola seja solucionado mais pesquisas são necessárias.

3.5 Conclusão

Globalmente, conclui-se que o uso de rainhas inseminadas deve ser considerado pelos apicultores com o objetivo de melhorar a suas produções, uma vez que tal técnica é capaz de produzir resultados mais rápidos e potencialmente mais duradouros do que as técnicas de seleção unilaterais mais comumente usadas nos sistemas produtivos de pólen no Brasil.

4 CAPÍTULO IV: Efeito de dietas ricas em pólen sobre a saúde de *Apis mellifera*

4.1 Introdução

Abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) são essenciais para o funcionamento de ecossistemas naturais e agrícolas, uma vez que esses insetos garantem, através de seus serviços de polinização, a reprodução e variabilidade genética de diversas espécies vegetais (DELAPLANE e MAYER, 2000; KLEIN et al., 2007; GALLAI et al., 2009).

Como contrapartida, durante a atividade de polinização, esses insetos adquirem nutrientes essenciais (encontrados no néctar e pólen), (WINSTON, 1987; DI PASQUALE et al., 2013).

A principal fonte de proteína para as abelhas, conhecida como o “pão das abelhas”, consiste do pólen floral naturalmente fermentado e misturado ao néctar e a secreções das próprias abelhas. O “bee bread” (versão em inglês para pão de abelha) é também, virtualmente, a única fonte de lipídeos, vitaminas e minerais (como o zinco, cobre e ferro), flavonoides, carotenoides, e terpenos para abelhas em desenvolvimento (WINSTON et al., 1987; ALMARAZ et al., 2007; CAMPOS et al., 2010; OMNIA et al., 2014).

Na última década, declínios crônicos em populações de *A. mellifera*, principalmente na Europa e América do Norte, veem preocupando cientistas e apicultores (ELLIS et al., 2010; POTTS et al., 2010; vanENGELSDORP e MEIXNER, 2010). Apesar de ainda não existir um diagnóstico causal preciso, cientistas em todo mundo veem atribuindo os colapsos coloniais observados à interação de múltiplos fatores, incluindo o uso de pesticidas, malnutrição, perda de habitat e patógenos (vanENGELSDORP et al., 2009; BRODSCHNEIDER e CRAILSHEIM, 2010; vanENGELSDORP e MEIXNER, 2010; DU RAND et al., 2015). Entre os patógenos relacionados a essas perdas econômicas notamos um número considerável de patógenos virais: “DWV, BQCV, SBV, IAPV, KBV, CBPV, VDV e ABPV (CHEN e SIEDE, 2007; DESAI e CURRIE, 2015). Além dos patógenos, são inúmeros os registros que correlacionam exposição a pesticidas e estresse oxidativo em abelhas melíferas (BÜYÜKGÜZEL, 2009; ADAMSKI et al., 2003; PAPADOPOULOS et al., 2004; COSSIO-BAYUGAR et al., 2002; WU et al., 2009; JAMES e XU, 2012; BONCRISTIANI et al., 2012). O enfraquecimento do sistema imunológico das abelhas, em decorrência do estresse oxidativo, pode ser uma das explicações para os colapsos colônias (BONCRISTIANI et al., 2012).

O herbicida Paraquat[®] é um dos pesticidas não seletivos mais usados no mundo, principalmente em países em desenvolvimento como China e Índia (CHEN et al., 2010). Este viológeno induz o estresse oxidativo em diversos sistemas vivos, incluindo em abelhas. Por essa razão, Paraquat tem sido frequentemente usado em experimentos laboratoriais como um modelo para indução de estresse oxidativo (FARRINGTON et al., 1973; ILETT et al., 1974; ANGELOVA et al., 2005; DINIS-OLIVEIRA et al., 2008; CHEN et al., 2010).

Apesar do Paraquat ser considerado pouco tóxico às abelhas adultas (FAO, 2003), Cousin et al. (2013) mostraram que, mesmo em concentrações muito baixas, esse herbicida tem efeitos significativos no desenvolvimento de oenócitos larvais, além de provocar dano ao DNA desses insetos (ALI et al., 1996; COOKE et al., 2003; LEHMANN, 2005; MANNUSS et al., 2012).

O genoma de *A. mellifera* codifica somente 38 genes relacionados à atividade antioxidante (CORONA e ROBINSON, 2006). Tal sistema de defesa inclui enzimas como SODs, CAT, GSTs, e PRXs (TANG e TU, 1994; TOBA e AIGAKI, 2000; WOOD et al., 2003a, 2003b; COPLEY et al., 2004; CORONA e ROBINSON, 2006). CYPs também são uma importante classe de enzimas usada pelas abelhas para metabolizar xenobióticos, incluindo fitoquímicos (FEYEREISEN, 2012; MAO et al., 2013).

A presente pesquisa objetivou a análise dos efeitos do herbicida Paraquat, na fisiologia de *A. mellifera*, focando principalmente no efeito deste bupiridínio na expressão de genes relacionados à atividade antioxidante. Nós também analisamos a dinâmica de diversos patógenos quando abelhas foram expostas a diferentes concentrações de Paraquat. Por fim, testamos os efeitos do pólen fermentado, adicionado à dieta das abelhas, na mitigação do estresse oxidativo e na carga de patógenos.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Amostragem de abelhas e desenho experimental

Nós obtivemos abelhas operárias, de linhagens europeias (*A. mellifera ligustica*), a partir de uma única colônia, a fim de se obter maior controle do genótipo dos indivíduos que seriam testados. A colônia em questão era mantida no apiário experimental da Universidade Estadual da Carolina do Norte, nos Estados Unidos da América (North Carolina State University Lake Wheeler Honey Bee Research Facility - Raleigh, Carolina do Norte, EUA; 35° 46' N, 78° 38' O).

A Coleta de abelhas operárias recém-emergidas foi feita diretamente das células de cria, no exato momento em que os indivíduos emergiam. Imediatamente após a coleta, colocamos 20 abelhas em cada uma das gaiolas plásticas ('holding cages'), e posteriormente alojamos estas gaiolas dentro de uma incubadora com condições de temperatura e umidade próximas a da colônia (34 °C e ~50% UR) (Figura 18). É importante ressaltar que selecionamos somente abelhas que não apresentavam ácaros *Varroa destructor* presos ao corpo, tampouco sinais clínicos de doenças virais como por exemplo deformidades das asas.

Oito grupos de tratamento foram definidos de acordo com a concentração de Paraquat adicionada à solução de de sacarose (50%) oferecida as abelhas, além da disponibilidade do pão de abelha (pólen fermentado coletado da mesma colônia de onde as abelhas foram selecionadas). O pão de abelha foi retirado com uma pinça diretamente das células onde era armazenado, e colocado em tubos de Eppendorf® (1,5 ml). As tampas dos tubos foram removidas e estes foram então colocados dentro de algumas "holding cage" como um alimentador adicional.

Dois grupos controles foram definidos e ambos receberam alimentadores contendo solução de sacarose a 50%, *ad libitum* (grupos 1 e 2), porém, somente o grupo 2 recebeu o alimentador adicional contendo pão de abelha *ad libitum*. Paraquat não foi adicionado à solução de sacarose nos grupos controle.

Os grupos de tratamento 1 e 2 receberam alimentadores contendo solução de sacarose, a 50% *ad libitum*, adicionada de 10 µg/abelha de Paraquat. O grupo de tratamento 2 também recebeu o alimentador adicional contendo pão de abelha *ad libitum*.

Os grupos de tratamento 3 e 4 receberam os alimentadores contendo solução de sacarose a 50% (adicionada de 20 µg/abelha de Paraquat) e, mais uma vez, somente o grupo 4 recebeu também o alimentador com o pão de abelha.

Os grupos de tratamento 5 e 6, por sua vez, também receberam alimentadores com solução de sacarose a 50%, dessa vez misturada a 30 µg/abelha de Paraquat. Somente o grupo 6 recebeu também o pão de abelha *ad libitum*.

Após 72 horas nas "holding cages", coletamos as abelhas e as congelamos imediatamente através de submersão em nitrogênio líquido. Posteriormente as amostras foram armazenadas a -80 °C.

O experimento foi conduzido de agosto a setembro de 2015, e todos os tratamentos foram repetidos três vezes cada.

A referência de dose letal (DL₅₀) do Paraquat usada nessa pesquisa foi 26.3 µg/abelha, após 72 horas de exposição (FAO, 2003).

Figura 18. Gaiolas (“Holding cages”) em que as abelhas controle e expostas às diferentes concentrações de Paraquat foram mantidas.

4.2.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e métodos qPCR

A extração e isolamento do RNA total das amostras foi feito de forma similar às descritas por Boncristiani et al. (2011). Para cada grupo testado, nós homogeneizamos um total de 10 abelhas em uma sacola plástica na presença de 4 ml de Trizol (Invitrogen, USA). Imediatamente após a homogeneização, 500 µl do homogeneizado foi coletado e depositado em um novo tubo (contendo 500 µl de Trizol), seguindo as especificações do fabricante. Após a extração e purificação, foi verificada a integridade do RNA total obtido (200 ng RNA/amostra) usando o aparelho Nanodrop® (Thermo Scientific).

Nós geramos cDNA a partir de 1600 ng (8 µl de RNA por 200 ng/µl) utilizando uma mistura de 4 µl da enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), 2 nmol de dNTP (trifosfato de desoxirribonucleótido), composto de 2 nmol de Poly dT-18 e 0.1 nmol de Poly dT (12–18) (GREGORC et al., 2012). Todas as amostras de cDNA foram diluídas para um volume total de 75 µl.

Os pares de primers foram desenvolvidos para amplificação de seções de 70-244 bp de 17 genes de abelhas e 11 patógenos previamente estabelecidos (Apêndices 1 e 2). Seguimos protocolos padrões de PCR quantitativo em tempo real (StepOnePlus Real-Time PCR Systems; Applied Biosystems) para mensurar a expressão diferencial de genes relacionados ao estresse oxidativo e as cargas de patógenos. Os ensaios de qPCR foram conduzidos em placas de 96 poços usando 1 µl do cDNA, previamente diluído. As reações contavam com volume total de 10 µl. O fluoróforo SYBR Green (Invitrogen) foi adicionado às reações, de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. As reações foram conduzidas sob um protocolo térmico que consistia de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de um protocolo de dois passos que compreendia 95 °C por 15 segundos, 59-63 °C por 30s, seguido pela curva de dissociação, assim como descrito por Evans et al. (2006).

4.2.3 Alvos e primers

Os genes relacionados ao estresse oxidativo analisados nessa pesquisa foram: Catalase (CAT), Citocromo P450 (CYP6S3 e CYP9Q2), Glutathione S- tranferase (GSTD1, GSTS3 e GSTS4), Superóxido dismutase (SOD1 e SOD2), Peroxiredoxinas (PRX5, TPX1, TPX3, TPX4 e TPX5) e Vitelogenina (VG) (Apêndice 1). Os patógenos virais examinados foram: ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, “Lake Sinai Virus” (LSV), SBV e VDV

(Apêndice 2). Nós também verificamos a presença de microsporídios (*Nosema apis* e *N. ceranae*) e espécies tripanosomatídeas (*Crithidia mellificae* e *Lotmaria passim*).

Quatro genes foram usados como controles para as reações: Actina (β actin), fator de alongamento (E2F), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e RNA1 não codificador de *Apis* (ANCR1).

4.2.4 Normalização dos dados em tempo real e análise estatística

Os resultados da amplificação foram expressos representando o número de ciclos necessários para gerar um sinal fluorescente maior que um limiar definido previamente. A fim de medir com acurácia o nível de expressão, nós normalizamos cada um dos genes/patógenos alvo com base nos quatro genes de referencia (β actin, E2F, GAPDH e ANCR1) usando o software geNorm (VANDESOMPELE et al. 2002). Para propósito de exibição, nós normalizamos os resultados por mediana dos valores de abundância dos transcritos (CT controle – CT alvos) e os apresentamos através de valores de escala relativa usando o programa JMP 9 (SAS Institute Inc., 2009).

Para avaliar a variação nos níveis de transcrição de genes entre os diferentes tratamentos, nós utilizamos ANOVA dois fatores. Dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados usando o logaritmo na base 10 ($\log_{10}$). Nós aplicamos o teste de sobrevivência de Cox, e realizamos comparações *post hoc* pareadas usando o teste Tukey (contando com a correção de Bonferroni). Todos os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Todos os testes foram bicaudais.

4.3 Resultados

4.3.1 Análise de sobrevivência

A mortalidade de abelhas foi significativamente diferente entre os diferentes tratamentos testados, de acordo com a estatística de sobrevivência (Wilcoxon – Gehan: 495,905; $P < 0,001$) (Figura 19). O modelo de regressão de Cox também mostrou taxas de sobrevivência significativamente mais altas quando o pão de abelhas estava presente na dieta das abelhas testadas ($B = 1,206$; Exp. = 0,508; Wald= 138,687, $P < 0,001$). A exposição ao Paraquat (10 μg /abelha) teve um efeito negativo na sobrevivência ($B = -0,677$, Exp. = 3,339; Wald= 28,252, $P < 0,001$). Resultados similares foram observados em abelhas expostas a 30 μg /abelha de Paraquat ($B = -0,840$, Exp. $B = 0,432$; Wald= 38,938; $P < 0,001$).

A comparação pareada entre as curvas de sobrevivência demonstrou que o grupo controle 1 teve maior taxa de sobrevivência que todos os grupos de tratamento (respectivamente: vs controle 2: Wilcoxon - Gehan= 4,291; P= 0,038; vs tratamento 1: 132,619; P < 0,001; vs tratamento 2: 37,078; P < 0,001; vs tratamento 3: 61,936; P < 0,001; vs tratamento 4: 12,643; P < 0,001; vs tratamento 5: 161,755; P < 0,001; vs tratamento 6: 9,602; P 0,002). O grupo controle 2 também apresentou taxa de sobrevivência maior que a maioria dos grupos de tratamento (respectivamente: vs controle 1: Wilcoxon - Gehan= 4,291; P= 0,038; vs tratamento 1: 99,503; P < 0,001; vs tratamento 2: 13,413; P < 0,001; vs tratamento 3: 35,002; P < 0,001; vs tratamento 4: 0,251; P= 0,616; vs tratamento 5: 132,255; P < 0,001; vs tratamento 6: 0,541; P= 0,462). A comparação pareada também mostrou que as taxas de mortalidade foram maiores nos grupos de tratamento com maior concentração de Paraquat, assim como nos grupos de tratamento que não receberam pólen (Tabela 6).

A partir da análise de regressão múltipla da expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo e cargas virais, nós observamos que seis dessas variáveis foram estatisticamente correlacionadas (correlação de Pearson) com a taxa de mortalidade observada (CYP6S3: -0,676; P< 0,001; GSTS4: -0,405; P= 0,025; PRX5: -0,345; P= 0,049; SOD2: -0,448; P= 0,014; VG: -0,413; P=0,022; *Nosema*: 0,407; P= 0,024). O modelo testado foi significativamente capaz de explicar as variações observadas ($Z= 34,569$; P= 0,028; $R^2 = 0,997$; R^2 ajustado = 0,968). Estes dados, como esperado, mostraram que as taxas de mortalidade foram correlacionadas negativamente a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante, assim como correlacionadas positivamente as cargas de patógenos como *Nosema sp.*

Tabela 6. Comparações pareadas das taxas de sobrevivência observadas nos diferentes tratamentos aplicados (Valores de P). Os quadros coloridos (amarelos) representam os tratamentos que contaram com o oferecimento de pólen fermentado *ad lib.*

	0 µg/abelha		10 µg/abelha		20 µg/abelha		30 µg/abelha	
	Controle 1	Controle 2	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5	Tratamento 6
Controle 1		0.038	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002
Controle 2			< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.616	< 0.001	0.462
Tratamento 1				< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.005	< 0.001
Tratamento 2					0.005	< 0.001	< 0.001	0.001
Tratamento 3						< 0.001	< 0.001	< 0.001
Tratamento 4							< 0.001	0.805
Tratamento 5								< 0.001
Tratamento 6

Figura 19. Sobrevivência das abelhas testadas de acordo com os diferentes tratamentos (A, B, C, D, E, F, G e H) e a compilação dos mesmos (I). Linhas pontilhadas evidenciam os tratamentos em que o pólen fermentado estava disponível para o consumo das abelhas.

4.3.2 Estresse oxidativo

Dentre os 14 genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante, cinco mostraram respostas significativas à exposição ao Paraquat/dietas ricas em pólen. A expressão de CYP6S3 foi significativamente influenciada pela alimentação ($F= 14,210$; $P= 0,001$), sendo que abelhas alimentadas com pão de abelha apresentaram maior expressão deste gene. A concentração de Paraquat aparentemente não influenciou significativamente a expressão relativa de CYP6S3 ($F= 2,019$; $P= 0,151$), assim como a interação entre alimentação e concentração do herbicida aplicado ($F= 1,188$; $P= 0,345$) (Figura 20). A expressão de SOD2 também foi afetada pela alimentação ($F= 9,583$; $P= 0,006$), mas não foi influenciada nem pela concentração de Paraquat ($F= 1,964$; $P= 0,160$), nem pela interação entre as duas variáveis analisadas ($F= 0,909$; $P= 0,458$). A expressão de VG, assim como no gene SOD2, foi altamente influenciada pela alimentação ($F= 14,680$; $P= 0,001$), mas não foi afetada pela interação entre alimentação e concentração de Paraquat ($F= 1,296$; $P= 0,3090$) ou pela concentração de Paraquat ($F= 2,395$; $P= 0,106$) (Figura 21).

A expressão de dois genes, PRX5 e SOD1, foi afetada pela concentração de Paraquat (respectivamente: Figuras 22 e 20), e a expressão de GSTS4 foi afetada tanto pela alimentação ($F= 6,627$; $P= 0,020$), quanto pela concentração de Paraquat ($F= 3,543$; $P= 0,038$) (Figura 21). A expressão de GSTS4, porém, não foi influenciada pela interação entre a alimentação e a concentração de Paraquat ($F= 1,473$; $P= 0,259$).

CAT não mostrou mudanças estatisticamente significativas durante o tratamento. A expressão de PRX5 foi significativamente afetada apenas pela concentração de Paraquat ($F= 3,543$; $P= 0,038$). A interação entre as variáveis testadas e a alimentação não resultou em efeitos significativos na expressão desse gene (respectivamente: $F= 0,113$; $P= 0,950$; $F= 0,851$; $P= 0,369$). Resultados similares foram observados nos testes do gene SOD1. A expressão foi significativamente afetada por diferentes concentrações de Paraquat adicionado a solução de sacarose ($F= 5,141$; $P= 0,011$).

Figura 20. Expressão dos genes relativos ao Citocromo P450 (CYP6S3) e Superóxido dismutase (SOD1) (*log10*), de acordo com o regime de alimentação testado (linhas contínuas: apenas solução de sacarose 50%, linhas pontilhadas: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).

Figura 21. Expressão do gene relativo à Vitalogenina (*log10*) de acordo com o regime de alimentação testado (linha contínua: apenas solução de sacarose 50%, linha pontilhada: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).

Figura 22. Expressão dos genes relativos à Peroxiredoxina (PRX5) e Glutathione S-transferase (GSTS4) (*log10*), de acordo com o regime de alimentação testado (linhas contínuas: apenas solução de sacarose 50%, linhas pontilhadas: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).

4.3.3 Cargas de patógenos

Na avaliação inicial dos 11 patógenos alvos (ABPV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, LSV, SBV, VDV, *Nosema sp* e espécies trypanosomatídeas), apenas sete mostraram sinais positivos por qPCR, incluindo BQCV, CBPV, DWV, IAPV, SBV, *Nosema sp*, e espécies de tripanosomatídeos.

BQCV foi o patógeno detectado com menos frequência neste estudo. Das 24 amostras de abelhas analisadas, apenas 11 apresentaram o vírus. Cargas de BQCV não foram estatisticamente relacionadas à alimentação ($F= 0,458$; $P= 0,0508$), à concentração de Paraquat aplicada ($F= 1,444$; $P= 0,267$), ou à interação entre alimentação e concentração de Paraquat ($F= 0,460$; $P= 0,713$). Resultados similares foram obtidos para as cargas de CBPV (alimentação: $F= 1,291$; $P= 0,272$; concentração de Paraquat: $F= 2,870$; $P= 0,069$; interação: $F= 0,572$; $P= 0,641$).

Os resultados obtidos a partir de ANOVA (de dois fatores) demonstraram um efeito significativo do pólen na prevalência de três patógenos (IAPV, *Nosema sp* e espécies de tripanosomatídeos). Abelhas alimentadas com pólen fermentado mostraram as menores cargas de IAPV em quase todos os tratamentos ($F= 6,806$; $P= 0,019$) (Figura 23). Nos controles negativos (tratamento sem adição de Paraquat à solução de sacarose), as abelhas mostraram cargas significativamente menores de IAPV quando comparadas com as abelhas alimentadas somente com a solução de sacarose, sem pólen fermentado (0,227 – 2,400 95% LC). A interação entre alimentação e concentração de Paraquat foi igualmente significativa ($F= 3,948$; $P= 0,027$).

Um efeito significativo da alimentação também foi observado em cargas de *Nosema* ($F= 15,610$; $P= 0,001$). Todos os testes realizados em abelhas alimentadas com pólen mostraram cargas menores de *Nosema* quando comparadas com abelhas alimentadas somente com a solução de sacarose. Uma tendência similar foi observada para as cargas de espécies tripanosomatídeas ($F= 7,895$; $P= 0,012$) (Figura 24).

A detecção de DWV foi a maior entre todos os patógenos analisados. Esse patógeno também foi detectado em todas as amostras analisadas. As cargas virais foram maiores conforme as concentrações de Paraquat ($F= 10,990$; $P< 0,001$). Abelhas alimentadas com a solução de sacarose sem adição de Paraquat (controle) apresentaram cargas significativamente menores de DWV quando comparadas com operarias tratadas com Paraquat adicionado à solução de sacarose (concentração de 20µg/abelha) (-1,333 a -0,60, 95% LC). As cargas de SBV também foram afetadas pela concentração de Paraquat aplicado ($F= 4,251$; $P= 0,021$). A interação entre alimentação e concentração de Paraquat foi igualmente significativa para a presença de SBV ($F= 8,261$; $P= 0,001$).

Figura 23. Carga de patógenos virais (DWV, IAPV e SBV) ($\log_{10}$), de acordo com o regime de alimentação testado (linhas pontilhadas: apenas solução de sacarose 50%, linhas contínuas: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).

Figura 24. Carga de patógenos (*Nosema sp* e espécies de Tripanossomatídeos) ($\log_{10}$), de acordo com o regime de alimentação testado (linhas pontilhadas: apenas solução de sacarose 50%, linhas contínuas: solução de sacarose 50% e pólen fermentado).

4.4 Discussão

Esse estudo indica que a exposição ao Paraquat influencia a expressão de diversos genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante de *A. mellifera*, como PRX5, SOD1 e GSTS4.

A diminuição na expressão do gene PRX5, diante da exposição ao Paraquat, mostra um efeito significativo na sobrevivência das abelhas testadas. Como uma peroxirredoxina, o PRX5 tem como principal função a proteção celular contra o estresse oxidativo, modulação de cascatas de sinalização intracelular, regulação da proliferação celular e metabolismo fosfolipídio (CHEN et al., 2000; WOOD et al., 2003b; NEVALAINEN 2010; JARVIS et al., 2012; POOLE et al., 2011; MANEVICH et al., 2013; HUAXIA et al., 2015). A expressão reduzida de um gene relacionado à atividades de tamanha importância para a função celular e proteção antioxidante é, evidentemente, um fator chave na explicação da diminuição das taxas de sobrevivência. Não obstante, pouca informação pode ser encontrada quanto ao papel específico do PRX5 na detoxificação xenobiótica, assim como na resistência das abelhas a pesticidas. Este é a primeira indicação da função do PRX5 na redução do estresse oxidativo induzido pelo herbicida Paraquat. Uma vez que nenhuma correlação entre a presença de pólen na dieta e a expressão do gene PRX5 foi encontrada, não há evidência que suportem a influência do pólen na redução do estresse oxidativo (e consequente mortalidade) pela via das peroxirredoxinas.

É de fato interessante que este herbicida possa afetar a expressão de tal gene. Estudos adicionais seriam importantes para o melhor entendimento do papel deste gene na detoxificação de pesticidas por abelhas, assim como o possível uso do PRX5 como um indicador biológico da exposição ao Paraquat.

A Glutathione S-transferase também parece ser um gene importante na prevenção da mortalidade de abelhas expostas ao Paraquat. GSTs são proteínas multifuncionais essenciais para o metabolismo de xenobiótico e para a proteção contra danos peroxidativos (CORONA e ROBINSON, 2006). Essas enzimas estão envolvidas na detoxificação de uma grande variedade de compostos tóxicos, uma vez que promovem a conjugação desses compostos em glutathione, facilitando assim sua remoção do organismo (HINTON et al., 1995; JAKOBY, 1985; LEE, 1991; WEIRICH et al., 2002). No presente estudo, nós observamos um efeito significativo tanto da alimentação quanto da concentração de Paraquat na expressão de GSTS4, o que sugere que a expressão deste gene também está relacionada a vias nutricionais. Os resultados encontrados estão de acordo com pesquisas anteriores que indicam que alterações na expressão de GST podem ser induzidas por diversos fatores em insetos, como a

qualidade da alimentação e a exposição a certos pesticidas (HAYAOKA e GAUTERMAN, 1982; PAPADOPOULOS et al., 1999; PAPADOPOULOS et al., 2000; KOSTAROPOULOS et al., 2001). Nossos resultados sugerem que o GSTS4 pode ser parte importante na função do pólen na mitigação dos efeitos nocivos da exposição ao Paraquat.

Os resultados observados em abelhas expostas à baixas concentrações (incluindo doses abaixo do DL_{50} oral, de acordo com FAO 2003) são preocupantes para criadores de abelhas em áreas em que o herbicida Paraquat ainda é utilizado. De acordo com Concenza (2012), a característica catiônica do Paraquat resulta em alta solubilidade em água (620 g/l) e alta mobilidade no meio ambiente. Portanto, é frequentemente a contaminação de corpos d'água em regiões onde existe aplicação deste herbicida, principalmente devido a infiltração a partir do solo (NANSEU-NJIKI et al., 2010).

A concentração de Paraquat também foi relacionada ao aumento de patógenos como SBV e DWV. O estresse oxidativo gerado por este herbicida parece ser importante para a prevalência de patógenos de forma geral. Os títulos de DWV foram significativamente afetados pela concentração de Paraquat. Tal fato é extremamente preocupante porque este patógeno está presente em abelhas mundialmente, incluindo algumas espécies de *Bombus* (GENERSCH et al., 2006; MARTINSON et al., 2011; PARMENTIER et al., 2016). Este picornavírus (família Iflaviridae) é caracterizado por causar má formações nas asas de operárias, abdomens inchados e encurtados, além de descoloração parcial da cutícula (GENERSCH e AUBERT, 2010). *V. destructor* tem um papel importante na transmissão, patologia e virulência do DWV (BOWEN-WALKER et al., 1999; NORDSTROM et al., 1999; TENTCHEVA et al., 2004; GAUTHIER et al., 2007; YANG et al., 2007; SANTILLÁN-GALICIA et al., 2008; GISDER et al., 2009; GENERSCH e AUBERT 2010), e a prevalência deste patógeno pode ser um fator fundamental para a sobrevivência das abelhas durante o inverno. Cargas maiores do vírus foram detectadas quando altas concentrações de Paraquat foram usadas (exceto para o grupo exposto a concentração de 30 μ g/abelha). É possível que o Paraquat aja de modo similar ao *V. destructor*, suprimindo imunologicamente as abelhas e promovendo um ambiente interno no hospedeiro favorável à replicação deste vírus.

O SBV é conhecido por afetar abelhas em desenvolvimento. Estudos mostram que esse patógeno viral também é capaz de infectar abelhas adultas, porém, sem sintomas evidentes (GAUTHIER et al., 2007; DAINAT et al., 2012; AMIRI et al., 2015). Em um estudo sanitário, Amiri et al. (2015) relatam que o SBV estava presente em 75% das colônias diagnosticadas como “doentes” na Dinamarca, e que sua prevalência está relacionada ao

estresse a que essas colônias eram expostas. O efeito significativo da exposição ao Paraquat nos títulos observados deste patógeno pode indicar que o estresse oxidativo resultante da exposição ao Paraquat atue como um fator chave para explicar a prevalência deste vírus.

As taxas de mortalidade reduzidas observadas quando pólen foi adicionado as dietas é um achado importante desse estudo. Esses efeitos mitigativos proporcionados pelo pólen nos permitem fomentar discussões acerca da importância da biodiversidade floral (e consequente disponibilidade do pólen no ambiente) na preservação de abelhas e outros polinizadores.

Várias pesquisas têm salientado a importância da ingestão do pólen como meio de reduzir a susceptibilidade das abelhas a pesticidas e patógenos, o que pode ser explicado, ao menos em parte, pelo aumento da expressão (“up-regulation”) de genes relativos a defesa antioxidante, por meio de vias nutricionais (ALAUX et al., 2011; MAO et al., 2013). Alguns constituintes do pólen parecem ser responsáveis por essa “up-regulation”, como o ácido p-coumárico (um componente da esporopolenina que constitui a membrana externa de muitos grãos de pólen) e Coenzima q10 (CoQ10) (uma provitamina endógena lipossolúvel encontrada naturalmente na mitocôndria) (WEHLING et al., 1989; JIANG et al., 2004; STRACHECKA et al., 2014; XUE et al., 2012; ALAUX et al., 2011; MAO et al., 2013).

Dentre os genes relacionados a maior sobrevivência em abelhas expostas ao Paraquat, Vitelogenina foi um dos mais significantes. Essa proteína vitelínica é um precursor comum de gema de diversos ovíparos (BRANDT et al., 2005). A presença dessa proteína na hemolinfa é regulada nutricionalmente e é frequentemente maior em abelhas operárias jovens (principalmente para o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas), abelhas operárias bem nutridas e abelhas rainhas (AMDAM et al., 2003, 2004; SEEHUUS et al., 2006; CORONA et al., 2007; ALAUX et al., 2011; AMENT, 2011; JOHNSON, 2015). Seehuus et al. (2006) também relataram que a vitelogenina era capaz de reduzir o estresse oxidativo inativando radicais livres, prolongando a vida de abelhas previamente injetadas com Paraquat.

Dada a íntima relação da expressão de vitelogenina com nutrição das abelhas, conclui-se que a presença de pólen deve ser essencial para a “up-regulation” dessa enzima e, portanto, mais uma via de mitigação dos efeitos nocivos do Paraquat.

A presença do pólen também influenciou positivamente a expressão de alguns genes relacionados ao Sistema de defesa antioxidante (CYP6S3, GSTS4 e SOD2), o que provavelmente levou a uma redução geral no estresse oxidativo. A interação positiva entre o pólen e o aumento da expressão dos GSTs é provavelmente um fator chave na maior sobrevivência das abelhas expostas ao Paraquat, já que esse gene parece promover a expressão de enzimas com funções específicas de redução dos mecanismos de estresse

oxidativo promovidos por este herbicida. CYP6S3 também foi estatisticamente correlacionado a melhora das taxas de sobrevivência nas abelhas. Este gene é um dos P450s, mais especificamente do grupo das enzimas CYP3, que está geralmente envolvido na detoxificação de inseticidas (CLAUDIANOS et al., 2006), e nos processos de resistências a esses xenobióticos (BERENBAUM, 2002; FEYEREISEN, 2005).

O gene relativo à expressão do SOD2 também foi regulado positivamente na presença de pólen. SODs convertem o radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, constituindo a primeira linha de defesa contra ROS produzido na mitocôndria. SODs normalmente existem em duas formas em células eucarióticas, diferindo principalmente pela localização celular e na estrutura de seus sítios ativos: MnSOD (SOD2) está presente no espaço mitocondrial interno, e Cu/ZnSOD (SOD1) está presente no citoplasma (CORONA e ROBINSON, 2006). Strachecka et al. (2014) observaram que a atividade dos SODs também aumentava quando as abelhas eram tratadas com CoQ10 (um constituinte frequente do pólen). Wang et al. (2014) e Alaux et al. (2011) descobriram que SODs eram regulados positivamente em abelhas alimentadas com pólen.

A maiores taxas sobrevivência observadas, promovida por dietas ricas em pólen, também parecem ter correlação imunológica. A presença de *Nosema* (*N. ceranae* e *N. apis* Zander) foi significativamente correlacionada com a taxa de mortalidade. Esses microsporídeos são endoparasitas que infectam células epiteliais do intestino de abelhas adultas (FORSGREN e FRIES, 2010). Este endoparasita também afeta o metabolismo, secreção de enzimas, e conteúdo proteico das glândulas hipofaríngeas, assim como os níveis de ácidos graxos e vitelogenina na hemolinfa (SUWANNAPONG et al., 2010; ALAUX et al., 2011; CHAIMANEE et al., 2012; GOBLIRSCH et al., 2013; MATASIN et al., 2012; BAHREINI e CURRIE, 2015). Antunez et al. (2009) e Di Paquali et al. (2013) também relataram a supressão imunológica decorrente da Nosemose, o que pode diminuir a resistência a outros patógenos (incluindo vírus) e estressores (como os pesticidas). *Nosema* também tem sido frequentemente relacionado à perda de colônias nos Estados Unidos e Europa (COX-FOSTER et al., 2007; OLDROYD, 2007; vanENGELSDORP et al., 2007; HIGES et al., 2008; HIGES, 2010; revisado em GENERSCH et al., 2010).

Sabe-se que o pólen pode ser um importante imunofetor, ajudando abelhas melíferas a se resguardarem contra estressores (MELLO e SILVA-FILHO, 2002; Chen et al., 2007; MUNCH et al., 2008; STRACHECKA et al., 2014). Essa pesquisa corrobora com tal constatação, uma vez que observou efeitos positivos de dietas ricas em pólen na redução da presença de IAPV e espécies tripanosomatídeas. O IAPV é comumente encontrado em baixas

quantidade no organismo de abelhas melíferas (HUNG et al., 1996; CHEN e EVANS, 2007; GENERSCH e AUBERT, 2010). Porém, recentes estudos vêm relacionando esse patógeno viral com perdas de colônias nos EUA (COX-FOSTER et al., 2007; MICHAUD et al., 2015). Genersch e Aubert (2010) destacam que em ocasiões em que o sistema imunológico do hospedeiro é suprimido (na presença de estresse oxidativo, por exemplo), os títulos desse patógeno podem se elevar, tornando-o assim extremamente virulento.

4.5 Conclusões

A identificação de perfis de marcadores biológicos relacionados a exposição à diferentes tipos de xenobióticos é um passo crucial na avaliação da saúde individual e ambiental das abelhas melíferas. Os dados obtidos mostram indícios de que a expressão relativa dos genes PRX5, SOD2 e GSTS4 respondem significativamente à exposição ao herbicida Paraquat. Por este motivo, novos estudos são necessários para elucidar a real possibilidade dos mesmos serem utilizados como marcadores biológicos para a intoxicação causado por Paraquat.

Essas modificações significativas na expressão desses diversos genes relativos a defesa antioxidantes de *Apis* também tem impacto sobre a respostas imunológicas desses insetos, como evidenciado pelos níveis encontrados de *Nosema*, DWV e SBV.

Essa pesquisa também destaca os efeitos mitigativos do pólen da redução do estresse oxidativo causado pela exposição ao Paraquat. As taxas de sobrevivência, promovidas por dietas ricas em pólen, parecem também estar ligado a regulação positiva de genes antioxidantes como os CYPs, SODs, VG e GSTs assim como a menores cargas de IAPV, *Nosema sp.*, e espécies tripanosomatídeas. Este é um indicativo da eficácia do pólen como antioxidante e imunofetor, assim como uma possível alternativa para a manutenção da saúde das abelhas no mundo todo.

5 CAPÍTULO V: Considerações finais

O sistema produtivo de pólen apícola é, ainda hoje, marcado pela precariedade de suas técnicas e distanciamento do conhecimento acadêmico. Esforços no sentido de desenvolver práticas produtivas mais eficientes são extremamente necessários. Este estudo pôde concluir que melhores resultados são obtidos quando população coloniais de tamanho médio (entre 19.000 e 30.000), são combinadas com suplementação regular de carboidrato. Também pudemos concluir que inúmeras variáveis climáticas são capazes de impactar a coleta de pólen apícola por operárias forrageiras. Sendo assim, apicultores devem, prioritariamente, instalar apiários em regiões de clima tropical (temperaturas médias elevadas) e de períodos regulares, porém não extensos, de precipitação. Ainda são inúmeras as questões não respondidas referentes a melhoria das técnicas produtivas de pólen apícola. Por exemplo, estudos abordando a eficiência dos diferentes tipos de coletores utilizados, bem como a correlação dos inúmeros modelos com a qualidade do pólen produzido.

Nessa pesquisa também concluímos que o uso de rainhas inseminadas é capaz de trazer consideráveis vantagens produtivas, uma vez que tal técnica é capaz de produzir aumentos produtivos mais rápidos e, potencialmente mais duradouros. Apesar da aparente sobreposição fenotípica, ainda não temos qualquer informação disponível acerca da correlação genética do PHT com a produção comercial de pólen.

Essa pesquisa também foi capaz de identificar inúmeras vantagens intrínsecas a dietas ricas em pólen, como a diminuição dos efeitos insalubres de diferentes estressores (exposição a herbicida e prevalência de patógenos, por exemplo). Trata-se de um campo de pesquisa muito importante para a conservação dos serviços de polinização de *A. mellifera* e consequente segurança alimentar no planeta. Resultados como os obtidos nessa pesquisa evidenciam a necessidade de uma discussão mais profunda do problema da diminuição populacional dos polinizadores, abordando principalmente a ecologia da paisagem e o impacto da diminuição da biodiversidade nos colapsos de colônias registrados. Por fim, sugerimos que novos estudos sejam realizados para a identificação de marcadores biológicos relacionados a exposição à diferentes tipos de xenobióticos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.; KORAYEM-MOHAMED, M.; ABDEL-AAL, A.; ABDEL-AAL, A. M.; EL-SONBATY, A. A. M. The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *J. Biol. Earth. Sci.*, p. B93-B109. 2012.
- AKTAR, M. D.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.*, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2009.
- AL-QARNI A. S.; SMITH B. H.; COBEY S. W., Performance Evaluation of Naturally Mated and Instrumentally Inseminated Honeybee (*Apis mellifera* L.) Queens in Field Colonies. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 6, p. 1476-1481, 2003.
- ALAUX, C.; DUCLOZ, F.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, v. 6, p. 562 – 565, 2010.
- ALAUX. C.; DANTEC, C.; PARRINELLO, H.; LE CONTE, Y. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*, v. 12, p. 496–509, 2011.
- ALEIXO, K. P.; DE FARIA, L. B.; GARÓFALO, C. A.; FONSECA, V.; SILVA, C. Pollen Collected and Foraging Activities of *Frieseomelitta varia* (Lepeletier) (Hymenoptera: Apidae) in an Urban Landscape. *Sociobiology*, v. 60, n. 3, 266-276, 2013.
- ALI, S.; JAIN, S. K.; ABDULLA, M.; ATHAR, M. Paraquat induced DNA damage by reactive oxygen species. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, v. 39, p. 63–67, 1996.
- ALLEN, M. F.; BALL, B. V. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, v.77, p.141-162.1996.
- ALMARAZ-ABARCA, N.; CAMPOS, M. G.; ÁVILA-REYES, J. A.; NARANJO-JIMENEZ, N.; CORRAL, J. H.; GONZÁLEZ-VALDEZ, L. S. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, p. 119–124, 2007.
- ALVES, M. Produção de Pólen Apícola. *Pesquisa & Tecnologia*, v. 10, p. 1-6, 2013.
- AMDAM, G. V.; NORBERG, K.; FONDRAK, M. K.; PAGE JR., R. E. Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 101, p. 11350-11355, 2004.

- AMDAM, G. V.; NORBERG, K.; HAGEN, A.; OMHOLT, S. W. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 100, p. 1799-1802, 2003.
- AMIRI, E.; MEIXNER, M.; NIELSEN, S. L.; KRYGER, P. Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies. *PLoS ONE*, v. 10, p. e0140272, 2015.
- ANDERSON, D. L., TRUEMAN, J. W. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.*, v. 24, n. 3, p. 165-89, 2000.
- ANGELOVA, M. B.; PASHOVA, S. B.; SPASOVA, B. K.; VASSILEV, S. V.; SLOKOSKA, L. S. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol. Res.*, v. 109, p. 150–158, 2005.
- ANTUNEZ, K.; MARTIN-HERNANDEZ, R.; PRIETO, L.; MEANA, A.; ZUNINO, P.; HIGES, M. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.*, v. 11, p. 2284–2290, 2009.
- ATTIA, Y. A.; AL-HANOUN, A.; TAGEL-DIN, A. E.; BOVERA, F.; SHEWIK, Y. E. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, p. 294–303, 2011.
- ATTIA, Y., ABDAL-HAMID, A. E.; IBRAHIM, M. S.; AL-HARTHI, M. A.; BOVERA, F.; ELNAGGAR, A. Productive performance, biochemical and hematological traits of broiler chickens supplemented with propolis, bee pollen, and mannan oligosaccharides continuously or intermittently. *Livestock Science*, v. 164, p. 87–95, 2014.
- AUFAUVRE, J.; BIRON, D. G.; VIDAUD, C.; FONTBONNE, R.; ROUDEL, M.; DIOGON, M.; VIGUES, B.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F.; BLOT, N. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* v. 2, p. 326. 2012.
- BAHREINI, R.; CURRIE, R. W. The influence of *Nosema* (Microspora: Nosematidae) infection on honey bee (Hymenoptera: Apidae) defense against *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 132, p. 57–65, 2015.
- BAILEY, L.; BALL, B. V. Honey Bee Pathology, second ed. Academic Press, London, UK, 1991.
- BARKER, R. G.; JAY, S. C. Effect of various sugar and honey treatments on the foraging activity of honey bees. *Manitoba entomologist*, v. 12, p. 15-24, 1978.
- BARKER, R. J. The influence of food inside the hive on pollen collection. *Journal of Apicultural Research*, v. 10, p. 23-26, 1971.

- BARRETO, L. M. C.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O.; DIB, A. P. S. *Produção de pólen no Brasil*. Cabral Editora e Livraria Universitária, Taubaté – SP, 2006.
- BERENBAUM, M. R. Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *J. CHEM. ECOL.*, v. 28, p. 873– 896, 2002.
- BERRY, J. Pesticides, bees and wax: an unhealthy, untidy mix. *Bee Culture*, v. 137, p. 33–35, 2009.
- BEVK, D.; KRALJ, J.; ČOKL, A. Coumaphos affects food transfer between workers of honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, v. 43, p. 465–470, 2012.
- BIENEFELD, K.; ZAUTKE, F.; PRONIN, D.; MAZEDD, A. Recording the proportion of damaged *Varroa jacobsoni* in the debris of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Apidologie*, v. 30, p. 249-256, 1999.
- BLOOMQUIST, J.R. Ion channels as targets for insecticides. *Annu. Ver. Entomol.*, v. 41, p. 163–190, 1996.
- BOGDANOV, S. Beeswax: quality issues today. *Bee World*, v. 85, p. 46–50, 2004.
- BONCRISTIANI, H.; UNDERWOOD, R.; SCHWARZ, R.; EVANS, J. D.; PETTIS, J.; vanENGELSDORP, D. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, v. 58, n. 5, p. 613–620, 2012.
- BONMATIN, J. M.; MARCHAND, P. A.; CHARVET, R.; MOINEAU, I.; BENGSCH, E. R. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 5336–5341, 2005.
- BOWEN-WALKER, P. L.; MARTIN, S. J.; GUNN, A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud., *J. Invertebr. Pathol.*, v. 73, p. 101–106, 1999.
- BRAND, D. D. The honeybee in New Spain and Mexico. *Journal of Cultural Geography*, v. 9, p. 71-81, 1988.
- BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and Health in the Honey bee (Review). *Apidologie*, v. 41, n. 3, p. 278-294, 2010.
- BÜCHLER, R.; DRESCHER, W.; TORNIER, I. Grooming behaviour of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and *Apis dorsata* and its effect on the parasitic mites *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*. *Exp. Appl. Acarol.*, v. 16, p. 313-319, 1992.

- BUCK, A. C.; REES, R. W.; EBELING, L. Treatment of chronic prostatitis and prostatodynia with pollen extract. *British Journal of Urology*, v. 64, p. 496–499, 1989.
- BURGETT, M.; BURIKAM, I. Number of Adult Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Occupying a Comb: A Standard for Estimating Colony Populations. *Journal of Economic Entomology*, v. 78, p. 1154-1156, 1985.
- CALDERONE, N. W.; PAGE JR., R. E. Evolutionary genetics of division of labor in colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). *American Naturalist*, v. 138, p. 69-92, 1991.
- CALDERONE, N. W.; PAGE JR., R. E. Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 22, p. 17-25, 1998.
- CAMAZINE, S. The regulation of pollen foraging by honey bees: how foragers assess the colony's need for pollen. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 323, p. 265-272, 1993.
- CAMAZINE, S.; CRAILSHEIM, K.; HRASSNIGG, N.; ROBINSON, G. E.; LEONHARD, B. Protein trophallaxis and the regulation of pollen foraging by honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, v. 29, p. 113-126, 1998.
- CAMPOS, M.; FRIGERIO, C.; LOPES, J.; BOGDANOV, S. What is the future of Bee-Pollen? *J. ApiProduct ApiMedical Sci.*, v. 2, p. 131–144, 2010.
- CAPPELARI, F. A.; TURCATTO, A. P.; MORAIS, M. M.; DE JONG, D. Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). *Genet. Mol. Res.*, v. 8, p. 1245-1249, 2009.
- CHAIMANEE, V.; CHANTAWANNAKUL, P.; CHEN, Y.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. S. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J. Insect. Physiol.*, v. 58, p. 1090–1095, 2012.
- CHAPMAN, N.; OLDROYD, B.; HUGHES, W. Differential responses of honeybee (*Apis mellifera*) patrines to changes in stimuli for the generalist tasks of nursing and foraging. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 61, p. 1185–1194, 2007.
- CHAUZAT, M. P.; FAUCON, J. P.; MARTEL, A. C.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.*, v. 99, p. 253–262, 2006.
- CHEN, Q.; NIU, Y.; ZHANG, R.; GUO, H.; GAO, Y. The toxic influence of Paraquat on hippocampus of mice: Involvement of oxidative stress. *Neuro Toxicology*, v. 31, p. 310–316, 2010.

- CHEN, Y. P.; SIEDE, R. Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.*, v. 70, p. 33–80, 2007.
- CHEN, Y. P.; EVANS, J. D. Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States. *Am. Bee J.*, v. 147, p. 1027–1028, 2007.
- CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, v. 15, p. 615–636, 2006.
- COBEY, S. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, v. 38, p. 390–410, 2007.
- COBEY, S.; SCHLEY, P. Innovations in instrumental insemination. The compact, versatile right and left handed Schley model II instrument. *American Bee Journal*, p. 433–435, 2002.
- COPLEY, S. D.; NOVAK, W. R. P.; BABBITT, P. C. Divergence of Function in the Thioredoxin Fold Suprafamily: Evidence for Evolution of Peroxiredoxins from a Thioredoxin-like Ancestor. *Biochemistry*, v. 43, p. 13981–13995, 2004.
- CORONA, M.; ROBINSON, G. E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, v. 15, p. 687–701, 2006.
- CORONA, M.; VELARDE, R. A.; REMOLINA, S.; MORAN-LAUTER, A.; WANG, Y. et al. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, p. 7128–7133, 2007.
- COUSIN, M.; SILVA-ZACARIN, E.; KRETZSCHMAR, A.; EL-MAATAOUI, M.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P. Size Changes in Honey Bee Larvae Oenocytes Induced by Exposure to Paraquat at Very Low Concentrations. *PLoS ONE*, v. 8, p. e65693, 2013.
- COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D. A metagenomic survey of microbes in honey bee Colony Collapse Disorder. *Science*, v. 318, p. 283–287, 2007.
- CVITKOVIĆ, D.; GRGIĆ, Z.; MATAŠIN, Ž.; PAVLAK, M.; FILIPI, J.; TLAK GAJGER, I. Economic aspects of beekeeping production in Croatia. *Vet. Arhiv*, v. 79, p. 397–408, 2009.
- DAHLGREN, L.; JOHNSON, R. M.; SIEGFRIED, B. D.; ELLIS, M. D. Comparative Toxicity of Acaricides to Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Workers and Queens. *Journal of Economic Entomology*, v. 105, n. 6, p. 1895–1902, 2012.

- DAINAT, B.; EVANS, J. D.; CHEN, Y. P.; GAUTHIER, L.; NEUMANN, P. Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *PLoS ONE*, v. 7, n. 2, p. e32151, 2012.
- DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. *Bee World*, v. 77; n. 2, p. 67-70, 1996.
- DE JONG, D. *Varroa jacobsoni* does reproduce in worker cells of *Apis cerana* in South Korea. *Apidologie*, v. 19, p. 241-244, 1988.
- DE JONG, D.; MORSE, R.A.; EICKWORT, G.C. Mite pests of honey bees. *Annual Review of Entomology*, v.27, p. 229-252, 1982.
- DECOURTYE, A.; ARMENGAUD, C.; RENOU, M.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, S. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 78, p. 83–92, 2004.
- DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELEGUE, M. H. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag Sci*, v. 59, p. 269–278, 2003.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y. P.; 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.). *J. Insect Physiol.*, v. 56, p. 1184–1191, 2010.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G.; WARDELL, G.; AHUMADA-SEGURA, F.; RINDERER, T.; DANKA, R.; PETTIS, J. Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *Journal of Apicultural Research*, v. 47, p. 265-270, 2008.
- DELAPLANE, K. S.; MAYER, D. F. *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing, New York, NY, USA, 344pp., 2000.
- DESAI, S. D.; e CURRIE, R. W. Genetic diversity within honey bee colonies affects pathogen load and relative virus levels in honey bees, *Apis mellifera* L. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, v. 69, p. 1527–1541, 2015.
- DESHAZER, J. A.; HAHN, G. L.; XIN, H. Capítulo 1: Basic Principles of the Thermal Environment and Livestock Energetics. In: *Livestock Energetics and Thermal Environment Manegement*, 1-22. St. Joseph, Michigan, 2009.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 52, p. 81–106, 2007.

- DHAR, N. B.; SHOSKES, D. A. New therapies in chronic prostatitis. *Current Urology Reports*, v. 8, n. 4, p. 313-318, 2007.
- DI PASQUALE, G.; SALIGNON, M.; LE CONTE, Y.; BELZUNCES, L. P.; DECOURTYE, A. et al. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS One*, v8, p. e72016, 2013.
- DINIS-OLIVEIRA, R. J.; DUARTE, J. A.; SÁNCHEZ-NAVARRO, A.; REMIÃO, F.; BASTOS, M. L.; CARVALHO, F. Critical. Paraquat Poisonings: Mechanisms of Lung Toxicity, Clinical Features, and Treatment. *Reviews in Toxicology*, v. 38, p. 13–71, 2008.
- DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert. Neurosci.*, v. 7, p. 17–30, 2007.
- DOULL, K. M. Relationships between consumption of a pollen supplement, honey production and broodrearing in colonies of honeybees *Apis mellifera* L. *Apidologie*, v. 11, p. 361–365, 1980.
- DRELLER, C.; TARPY, D. R. Perception of the pollen need by foragers in a honeybee colony. *Animal Behaviour*, v. 59, p. 91–96, 2000.
- du RAND, E. E.; SMIT, S.; BEUKES, M.; APOSTOLIDES, Z.; PIRK, Z. W. W.; NICOLSON, S. W. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, v. 5, p. 11779, 2015.
- ECKERT, C. D.; WINSTON, M. L.; YDENBERG, R. C. The relationship between population size, amount of brood, and individual foraging behaviour in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Oecologia*, v. 97, p. 248–255, 1994.
- ECKHOLM, B. J.; ANDERSON, K. E.; WEISS, M.; DEGRANDI-HOFFMAN, G. Intracolony genetic diversity in honeybee (*Apis mellifera*) colonies increases pollen foraging efficiency. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 65, n. 5, p. 1037–1044, 2011.
- ECKHOLM, B. J.; HUANG, M. H.; ANDERSON, K. E.; MOTT, B. E.; DEGRANDI-HOFFMAN, G. Honey bee (*Apis mellifera*) intracolony genetic diversity influences worker nutritional status. *Apidologie*, v. 46, p. 150–163, 2015.
- EIRI, D.; NIEH, J. C. A nicotinic acetylcholine receptor affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *Journal of Experimental Biology*, v. 215, p. 2022–2029, 2012.

- EL-ASELY, A. M.; ABBASS, A. A.; AUSTIN, B. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 40, n. 2, p. 500-506, 2014.
- ELLIS, J. D.; MUNN, P. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, v. 86, p. 88-101, 2005.
- ELLIS, J. D.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. S. Colony losses, managed colony population decline, and colony collapse disorder in the United States. *J. Api. Res.*, v. 49, p. 134-136, 2010.
- ELZEN, P. J.; BAXTER, J. R.; SPIVAK, M.; WILSON, W. T. Amitraz resistance in *Varroa*: new discovery in North America. *Am. Bee J.*, v. 139, p. 362, 1999.
- ELZEN, P. J.; WESTERVELT, D. Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida. *Am. Bee J.*, v. 142, p. 291-292, 2002.
- EVANS, J. D. Gee, Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature*, v. 287, p. 60-62, 1980.
- EVANS, J.; ARONSTEIN, K. A.; CHEN, Y.; HETRU, C.; IMLER, J. L.; JIANG, H. et al. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect. Mol. Biol.*, v. 15, p. 645-656. 2006.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations Bees and Their Role in Forest Livelihoods: *A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products*, by Nicola Bradbear, Rome – Italy, 2009.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Value-Added Products from Beekeeping. Rural Infrastructure and Agro-Industries Division*, W0076, FAO Agricultural Services Bulletin. Rome, Italy, 2006.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Specification and evaluations for agricultural pesticides. Paraquat dichloride, 1,1'-dimethyl-4,4'-bispyridinium dichloride. FAO. 21 pp., 2003.
- FARRINGTON, J.A. et al. Bipyridylium quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.314, n.3, p.372-381, 1973.

- FERREIRA, D.; ROCHA, H. C.; KREUTZ, L. C.; LORO, V. L.; MARQUEZE, A.; KOAKOSKI, G. et al. Bee Products Prevent Agrichemical-Induced Oxidative Damage in Fish. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. e74499, 2013.
- FEWELL, J. H.; PAGE JR., R. E. Genotypic variation in foraging responses to environmental stimuli by honey bees, *Apis mellifera*. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 49, p. 1106–1112, 1993.
- FEWELL, J. H.; WINSTON, M. L. Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 30, p. 387-393, 1992.
- FEWELL, J.H.; WINSTON, M. L. Regulation of nectar collection in relation to honey storage levels by honey bees, *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology*, v. 7, p. 286-291, 1996.
- FEYEREISEN, R. Insect CYP genes and P450 enzymes. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, ed Gilbert LI (Elsevier/Academic Press, Amsterdam) pp 236–316, 2012.
- FORSGREN, E.; FRIES, I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, v. 170, p. 212–217, 2010.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, v. 52, p. 1119-1134, 1998.
- FRAZIER, M.; MULLIN, C.; FRAZIER, J.; ASHCRAFT, S. What have pesticides got to do with it? *Am. Bee J.*, v. 148, p. 521–523, 2008.
- FREE, J. B. *A organização social das abelhas (Apis)*. São Paulo: EPU – EDUSP. Coleção Temas de Biologia. v.13, 1980. 79 p.
- FREE, J. B. Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. *Animal Behaviour*, v. 15, p. 134-144, 1967.
- FREE, J. B. The effect on pollen collection of feeding honey-bee colonies with sugar syrup. *The Journal of Agricultural Science*, v. 64, p. 167-168, 1965.
- FREE, J. B.; SPENCERBOOTH, Y. Effect of feeding sugar syrup to honey bee colonies. *Journal of Agricultural Science*, v. 57, p. 147–151, 1961.

- FREE, J. B.; WILLIAMS, I. H. The effect of giving pollen and pollen supplement to honeybee colonies on the amount of pollen collected. *Journal of Apicultural Research*, v. 10, p. 87–90, 1971.
- FRISCH, K. V. The Dance Language and Orientation of Bees. Cambridge, Mass.: The Belknap Press of Harvard University Press, 1967.
- GALLAIA, N.; SALLES, J. M.; SETTELED, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, v. 68, p. 810 – 821, 2009.
- GARRIDO, P. M.; ANTÚNEZ, K.; MARTÍN, M.; PORRINI, M. P.; ZUNINO, P.; EGUARAS, M. J. Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology*, v. 59, p. 113–119, 2013.
- GAUTHIER, L.; TENTCHEVA, D.; TOURNAIRE, M.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; COLIN, M. Edouard, et al. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*, v. 38, p. 426–435, 2007.
- GENERSCH, E.; AUBERT, A. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.) Elke genersch, michel aubert. *Vet. Res.*, v. 41, p. 54, 2010.
- GENERSCH, E.; VON DER OHE, W.; KAATZ, H.; SCHROEDER, A.; OTTEN, C.; BUCHLER, R.; BERG, S.; RITTER, W.; MUHLEN, W.; GISDER, S.; MEIXNER, M.; LIEBIG, G.; ROSENKRANZ, P.. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, doi: 10.1051/apido/2010014. 2010
- GENERSCH, E.; YUE, C.; FRIES, I.; DE MIRANDA, J. Detection of *Deformed wing virus*, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 91, p. 61–63, 2006.
- GHELDOLF, N.; ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 3050–3055, 2002.
- GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, v. 491, p. 105–108, 2012.
- GISDER, S.; AUMEIER, P.; GENERSCH, E. Deformed wing virus (DWV): viral load and replication in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, v. 90, p. 463–467, 2009.

- GOBLIRSCH, M.; HUANG, Z. Y.; SPIVAK, M. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE*, v. 8, p. e58165, 2013.
- GONÇALVES L.S. *Africanized honey bee: introduction, adaptation and benefits*. Proceedings of the 37th International Apicultural Congress, Durban, Africa do Sul: 401-402, 2001
- GONÇALVES, L. S. Africanização das abelhas nas Américas, impactos e perspectivas de aproveitamento do material genético. *Naturalia*, 1992. p. 126–134, Edição Especial em Homenagem aos 70 anos do Dr. Warwick Estevam Kerr.
- GONÇALVES, L. S. The introduction of the African Bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America. *Am. Bee J.*, v. 114, p. 414–419, 1974.
- GONÇALVES, L. S.; STORT, A. C. A africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. II. In: BARRAVIERA, B. (Ed.). *Venenos Animais: Uma visão integrada*. Rio de Janeiro, RJ: EPUC, Editora de Publicações Científicas Ltda., 1994. p. 49–63.
- GOODWIN, R. M.; TEN-HOUTEN, A.; PERRY, J. H. Effect of feeding pollen substitutes to honey bee colonies used for kiwifruit pollination and honey production. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, v. 22; p. 459–462, 1994.
- GREGORC, A.; EVANS, J. D.; SCHARF, M.; ELLIS, J. D. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.*, v. 58, p. 1042–1049, 2012.
- GUEZ, D.; ZHANG, S. W.; SRINIVASAN, M. Methyl parathion modifies foraging behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology*, v. 14, n. 4, p. 431–437, 2005.
- GUZMÁN-NOVOA, E.; PAGE JR., R. E.; GARY, N. E. Behavioral and lifehistory components of division of labor in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 34, p. 409–417, 1994.
- HAARMANN, T.; SPIVAK, M.; WEAVER, D.; WEAVER, B.; GLENN, T. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *Journal of Economic Entomology*, v. 95, n. 1, p. 28–35, 2002.
- HABIB, F. K.; ROSS, M.; BUCK, A. C.; EBELING, L.; LEWENSTEIN, A. In vitro evaluation of the pollen extract, cernitin T-60, in the regulation of prostate cell growth. *British Journal of Urology*, v. 66, n. 4, p. 393-397, 1990.

- HANA, L. H. Y.; SHANB, S.; ZHANGA, X.; WANGA, N. L.; LUB, X. P.; YAO, X. S. Down-regulation of prostate specific antigen in LNCaP cells by flavonoids from the pollen of *Brassica napus*. *Phytomedicine*, v. 14, p. 338–343, 2007.
- HARBO, J. R. *Propagation and instrumental insemination. in Bee genetics and breeding*. Academic Press, Inc. p. 361-389, 1986.
- HARBO, J. R.; HARRIS, J. W. Resistance to *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) when mite-resistant queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) were free-mated with unselected drones. *J. Econ. Entomol.*, v. 94, p. 1319–1323, 2001.
- HARBO, J. R.; RINDERER, T. E. Breeding and genetics of honeybees. Beekeeping in the United States. *Agriculture Handbook*, n. 335, p. 49-57, 1980.
- HAWTHORNE, D. J.; DVELY, G. P. Killing them with kindness? In-hive medications may inhibit xenobiotic efflux transporters and endanger honey bees. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, p. 1–9, 2011.
- HAYAOKA, T.; GAUTERMAN, W. C. Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital and pesticides in various housefly strains and its effects on toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 17, p. 113-119, 1982.
- HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, v. 443, p. 931–949, 2006.
- HUAXIA, Y.; WANG, F.; YAN, Y.; LIU, F.; WANG, H.; GUO, X.; XU, B. A novel 1-Cys thioredoxin peroxidase gene in *Apis cerana cerana*: characterization of AccTpx4 and its role in oxidative stresses. *Cell Stress and Chaperones*, v. 20, p. 663–672, 2015.
- HUNG, A. C.; SHIMANUKI, H.; KNOX, D. A. Inapparent infection of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in the U.S. honey bees. *Am. Bee J.*, v. 136, p. 874–876, 1996.
- HUNT, G. J.; PAGE JR., R. E.; FONDRK, M. K.; DULLUM, C. J. Major quantitative trait loci affecting honey bee foraging behavior. *Genetics*, v. 141, p. 1537–1545, 1995.
- IBM Corp. Released IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp, 2013.
- IBRAHIM, A.; REUTER, G. S.; SPIVAK, M. Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*. *Apidologie*, v. 38, n. 1, p. 67–76, 2007.

- IBRAHIM, A.; SPIVAK, M. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie*, v. 37, p. 31–40, 2006.
- IBRAHIM, S. H. Effect of feeding on pollen collection of honey bee colonies. *Bulletin de la Société entomologique d'Égypte*, v. 57, p. 227-230, 1973.
- ILETT, K. I.; STRIPP, B.; MENARD, R. H.; REID, W. D.; GILLETTE, J. R. Studies on the mechanism of the lung toxicity of paraquat. Comparison of tissue distribution and some biochemical parameters in rats and rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 28, p. 216 – 226, 1974.
- JAKOBY, W.B. Glutathione transferases: An overview, *Methods Enzymol.*, v. 113, p. 495–499, 1985.
- JAMES, R. R.; XU, J. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 109, p. 175–182, 2012.
- JANMAAT, A. F.; WINSTON, M. L. The influence of pollen storage area and *Varroa jacobsoni* Oudemans parasitism on temporal caste structure in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*, v. 47, p. 177–182, 2000.
- JARVIS, R. M.; HUGHES, S. M.; LEDGERWOOD, E. C. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 53, p. 1522– 1530, 2012.
- JIANG, P.; WU, M. H.; ZHENG, Y. F.; WANG, C.; LI, Y. H.; XIN, J. Analysis of coenzyme Q10 in human plasma by column-switching liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, v. 805, p. 297–301, 2004.
- JMP®, Pro v10.0. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2007.
- JOHNSON, R. M. Honey Bee Toxicology Reed M. Johnson. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 60, p. 415–34, 2015.
- JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, M. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, v. 41, n. 1, p. 312–331, 2010.
- JOHNSON, R. M.; POLLOCK, H. S.; BERENBAUM, M. R. Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.*, v. 102, p. 474–479, 2009.

- KADALA, A.; CHARRETON, M.; JAKOB, I.; LE CONTE, Y.; COLLET, C. A use-dependent sodium current modification induced by type I pyrethroid insecticides in honeybee antennal olfactory receptor neurons. *Neurotoxicology*, v. 32, n. 3, p. 320–330, 2011.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W.; WASER, N. Endangered mutualisms: the conservation of plant–pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 29, p. 83–112, 1998.
- KELLER, I.; FLURI, P.; IMDORF, A. Pollen nutrition and colony development in honey bees – Part II. *Bee World*, v. 86, p. 27–34, 2005.
- KERR, W. E. The history of the introduction of African bees to Brazil. *South African Bee Journal*, v. 2, n. 39, p. 3–5, 1967.
- KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 274, n. 1608, p. 303–313, 2007.
- KOCHER, S.; AYROLES, J.; STONE, E.; GROZINGER, C. Individual variation in pheromone response correlates with reproductive traits and brain gene expression in worker honey bees. *PloS ONE*, v. 5, p. e9116, 2010.
- KOCHER, S.; RICHARD, F.; TARPY, D.; GROZINGER, C. Queen reproductive state modulates pheromone production and queen– worker interactions in honeybees. *Behavioral Ecology*, v. 20, p. 1007–1014, 2009.
- KÖPPEN, W.; GEIGER, R. *Klimate der Erde*. Justus Perthes: Gotha, Germany, 1928.
- KOSTAROPOULOS, I.; PAPADOPOULOS, A. I.; METAXAKIS, A.; BOUKOUVALA, E.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 31, p. 313–319, 2001.
- LAETZ, C. A.; BALDWIN, D. H.; COLLIER, T. K.; HEBERT, V.; STARK, J. D.; SCHOLZ, N. L. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environ. Health Perspect.*, v. 117, p. 348–353, 2009.
- LAIDLAW JR., H. H.; PAGE JR., R. E. *Queen Rearing and Bee Breeding*. Cheshire, Connecticut, USA: Wicwas Press, 1997.
- LE CONTE, Y.; ELLIS, M.; RITTER, W. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, v. 41, p. 353–363, 2010.

- LEE, K. Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: Induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochem.*, v. 21, p. 353–361, 1991.
- LEHMANN, A. R. Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett.*, v. 579, p. 873–876, 2005.
- LOCKE, B.; LE CONTE, Y.; CRAUSER, D.; FRIES, I. Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct European honey bee populations. *Ecology and Evolution*, v. 2, n. 6, p. 1144–1150, 2012.
- LOUCIF-AYAD, W.; ARIBI, N.; SOLTANI, N. Evaluation of Secondary Effects of some Acaricides on *Apis mellifera* Intermissa (Hymenoptera, Apidae): Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase Activities. *European Journal of Scientific Research*, v. 21, n. 4, p. 642–649, 2008.
- MAGGI, M.; PERALTA, L.; RUFFINENGO, S.; FUSELLI, S.; EGUARAS, M. Body size variability of *Varroa destructor* and its role in acaricide tolerance. *Parasitol. Res.*, v. 110, n. 6, p. 2333–2340, 2012.
- MANEVICH, Y.; HUTCHENS, S.; TEW, K. D.; TOWNSEND, D. M. Allelic variants of glutathione S-transferase P1-1 differentially mediate the peroxidase function of peroxiredoxin VI and alter membrane lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 54, p. 62–70, 2013.
- MANNUSS, A.; TRAPP, O.; PUCHTA, H. Gene regulation in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1819, p. 154–165, 2012.
- MANRIQUE A. J. *Seleção de abelhas africanizadas para a melhoria na produção de própolis*. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Brasil. 108 f. 2001.
- MAO, W.; SCHULER, M. A.; BERENBAUMA, M. R. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *PNAS*, v. 110, p. 8842–8846, 2013.
- MARTÍNEZ, O. A. C. *Melhoramento genético e seleção de colmeias para aumento da produção de própolis verde na apicultura comercial*. Tese (Doutorado em Genética) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012. 136p.
- MARTINSON, V. G.; DANFORTH, B. N.; MINCKLEY, R. L.; RUEPPELL, O.; TINGEK, S.; MORAN, N. A. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, v. 20, p. 619–628, 2011.

- MATEUS, S. Abundância relativa, fenologia e visita às flores pelos apoidea do cerrado da Estação Ecológica de Jataí - Luiz Antônio - SP. 1998. 159 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.
- MATILLA, H. R.; OTIS, G. W. Influence of pollen diet in spring on the development of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*, v. 99, p. 604-613, 2006.
- MATTILA, H. R.; SEELEY, T. D. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science*, v. 317, p. 362–364, 2007.
- MAUGHAN, R. J.; EVANS, S. P. Effects of pollen extract upon adolescent swimmers. *British Journal of Sports Medicine*, v. 16, n. 3, p. 142-145, 1982.
- McEWEN, B.S. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. *Brain Res.*, v. 886, p. 172-189, 2000.
- MEIXNER, M. D.; COSTA, C.; KRYGER, P.; HATJINA, F.; BOUGA, M.; IVANOVA, E.; BÜCHLER, R. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research*, v. 49, n. 1, p. 85-92, 2010.
- MELLO, M.; SILVA-FILHO, M. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian J. Plant. Physiol.*, v. 14, p. 71–81, 2002.
- MICHAUD, S.; BONCRISTIANI JR., H. F.; GOUW, J. W.; STRAND, M. K.; PETTIS, J.; RUEPPELL, O.; FOSTER, L. J. Response of the honey bee (*Apis mellifera*) proteome to Israeli acute paralysis virus (IAPV) infection. *Can. J. Zool.*, v. 93, p. 711–720, 2015.
- MICHENER, C. D. *The bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2000.913p.
- MICHENER, C. D. *The Social Behavior of the bees – A comparative study*. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press, 1974. 404p.
- MILANI, N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids – a laboratory assay. *Apidologie*, v. 26, p. 415–429, 1995.
- MILFONT, M. O.; FREITAS, B. M.; ALVES, J. E. Pólen apícola: Manejo para produção de pólen no Brasil. Aprenda Fácil, Viçosa- MG, 102 f., 2011.

- MOELLER, F. E. Honey bee collection of corn pollen reduced by feeding pollenin the hive. *American Bee Journal*, v. 112, p. 210-212, 1972.
- MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; vanENGELSDORP, D.; PETTIS, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS One*, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010.
- MUNCH, D.; AMDAM, G.; WOLSCHIN, F. Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Funct. Ecol.*, v. 22, p. 407–421, 2008.
- NANSEU-NJIKI, C. P.; DEDZO, G. K.; NGAMENI, E. Study of the removal of paraquat from aqueous solution by biosorption onto Ayous (*Triplochiton schleroxylon*) sawdust. *Journal of Hazardous Materials*, v. 179, p. 63–71, 2010.
- NEVALAINEN, T.J. 1-Cysteine peroxiredoxin: a dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca²⁺-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie*, v. 92, p. 638–644, 2010.
- NIÑO, E.; MALKA, O.; HEFETZ, A.; TEAL, P.; HAYES, J.; GROZINGER, C. Effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen insemination volume on worker behavior and physiology. *Journal of Insect Physiology*, v. 58, p. 1082-1089, 2012.
- NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a história da Apicultura Brasileira. In: CAMARGO, J. M. F. (Ed). *Manual de Apicultura*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 1972. p. 17–32.
- NORDSTROM, S.; FRIES, I.; AARHUS, A.; HANSEN, H.; KORPELA, S. Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie*, v. 30, p. 475–484, 1999.
- NUÑEZ, J. A. Honeybee foraging strategies at a food source in relation to its distance from the hive and the rate of sugar flow. *Journal of Apicultural Research*, v. 21, p. 139-150, 1982.
- NUÑEZ, J. A. The relationship between sugar flow and foraging and recruiting behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) *Animal Behaviour*, v. 18, p. 527-538, 1970.
- OLDROYD, B. P. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends Ecol. Evol.*, v. 14, p. 312–315, 1999.
- OLIVER, C. J.; SOFTLEY, S.; WILLIAMSON, S. M.; STEVENSON, P. C.; WRIGHT, G. A. Pyrethroids and Nectar Toxins Have Subtle Effects on the Motor Function, Grooming and Wing Fanning Behaviour of Honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0133733, 2015.

- OMHOLT, S. W.; ÅDNØY, T. Effects of various breeding strategies on diploid drone frequency and quantitative traits in a honey bee population. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 89, n. 6, p. 687-692, 1994.
- OMNIA, M. A.; NABILA, M. A.; NADIA, R. R. Biochemical effects of propolis and bee pollen in experimentally – induced hyperammonemia in rats. *Benha Veterinary Medical Journal*, v. 27, p. 8-24, 2014.
- OOMEN, P. A. A sequential scheme for evaluating the hazard of pesticides to bees, *Apis mellifera*. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, v. 51, p. 1205– 1213, 1986.
- ORUÇ, E. O.; SEVGILER, Y.; ULNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, v. 137, p. 43-51, 2004.
- PAGE JR., R. E. *The Spirit of the Hive: The Mechanisms of Social Evolution*. Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, 2013, 226pp.
- PAGE JR., R. E.; FONDRK, M. K.; HUNT, G. J.; GUZMAN-NOVOA, E.; HUMPHRIES, M. A.; NGUYEN, K.; GREENE, A. S. Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *Journal of Heredity*, v. 91, n. 6, p. 474–479, 2000.
- PAGE JR., R. E.; WADDINGTON, K. D.; HUNT, G. J.; FONDRK, M. K. Genetic determinants of honey bee foraging behaviour. *Animal Behavior*, v. 50, p. 1617–1625, 1995.
- PAGE, R. E.; LAIDLAW, H. H. Honey bee genetics and breeding. in *The hive and the honeybee*. Ed. Bookcrafters. p. 235-267, 2000.
- PAGE, R. E.; LAIDLAW, H. H., *Mating designs. in Bee genetics and breeding*. Academic Press, Inc. p. 305-321, 1986.
- PALMER, M. J.; MOFFAT, C.; SARANZEWA, N.; HARVEY, J.; WRIGHT, G. A.; CONNOLLY, C. N. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nature Communications*, v. 4, p. 1634, 2013.
- PANKIW, T. Brood pheromone modulation of pollen forager turnaround time in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Behavior*, v. 20, p. 173–180, 2007.
- PANKIW, T. Brood Pheromone Regulates Foraging Activity of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 97, p. 748-751, 2004.

- PANKIW, T.; PAGE JR., R. E. The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, v. 185, p. 207–213, 1999.
- PANKIW, T.; PAGE JR., R. E.; FONDRK, M. K. Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 44, p. 193–198, 1998.
- PANKIW, T.; RUBINK, W. L. Pollen foraging response to brood pheromone by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.). *Annals of Entomological Society of America*, v. 95, p. 761–767, 2002.
- PAPADOPOULOS, A. I.; POLEMITOUA, I.; LAIFIA, P.; YIANGOUA, A.; TANANAKI, C. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica* kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comput. Biochem. Phys. C.*, v. 139, p. 93–97, 2004.
- PAPAEFTHIMIOU, C.; PAPACHRISTOFOROU, A.; THEOPHILIDIS, G. Biphasic responses of the honeybee heart to nanomolar concentrations of amitraz. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 107, p. 132–137, 2013.
- PARMENTIER, L.; SMAGGHE, G.; de GRAAF, D. C.; MEEUS, I. *Varroa destructor* Macula-like virus, Lake Sinai virus and other new RNA viruses in wild bumblebee hosts (*Bombus pascuorum*, *Bombus lapidarius* and *Bombus pratorum*). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 134, p. 6–11, 2016.
- PENG, Y. S.; FANG, Y.; XU, S.; GE, L. The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 49, p. 54–60, 1987.
- PENG, Y. S.; NASR, M. E. Detection of honeybee tracheal mites (*Acarapis woodi*) by simple staining techniques. *J. Invertebrate Pathol.*, v. 46, p. 325–331, 1985.
- PENG, Y.; NASR, M. E. Detection of honey bee tracheal mites (*Acarapis woodi*) by simple staining techniques. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 46, p. 325–331, 1985.
- PEREIRA, A.M. *Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas*. 2010. 125f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.
- PESO, M.; NIÑO, E.; GROZINGER, C. M.; BARRON, A. B. Effect of honey bee queen mating condition on worker ovary activation. *Insectes Sociaux*, v. 60, p. 123–133, 2013.

- PHAM-DELEÈGUE, M. H.; DECOURTYE, A.; KAISER, L.; DEVILLERS, J. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, v. 33, n. 5, p. 425-432, 2002.
- PIRK, C. W. W.; BOODHOO, C.; HUMAN, H.; NICOLSON, S. The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*). *Apidologie*, v. 41, p. 62-72, 2010.
- POOLE, L. B.; HALL, A.; NELSON, K. J. Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. *Curr. Protoc. Toxicol.*, v. 7, Unit7-9, 2011.
- POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.*, v. 25, p. 345-353, 2010.
- RATH, W. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, v. 30, p. 97-110, 1999.
- RICHARD, F.; SCHAL, C.; TARPY, D. R.; GROZINGER, C. Effects of instrumental insemination and insemination quantity on Dufour's gland chemical profiles and vitellogenin expression in honey bee queens (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*, v. 37, p. 1027-1036, 2011.
- RINDERER, T. E.; DE GUZMAN, L.; LANCASTER, V.; DELATTE, G.; STELZER, J. *Varroa* in the mating yard: The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan® on drone honey bees. *American bee journal*, v. 139, n. 2, p. 134-139, 1999.
- RINDERER, T. E.; HARRIS, J. W.; HUNT, G. J.; DE GUZMAN, L. I. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. *Apidologie*, v. 41, n. 3, p. 409-424, 2010.
- RINDERER, T.; BUCO, S. M.; RUBNIK, W. L. Morphometric identification of Africanized and European honey bees using large reference populations. *Apidologie*, v. 24, p. 569-585, 1993.
- RITZ, B. W.; GARDNER, E. M. Malnutrition and energy restriction differentially affect viral immunity. *The Journal of Nutrition*, v. 136, p. 1141-1144, 2006.
- ROBINSON, G. E.; PAGE JR., R. E. Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 24, p. 317-323, 1989.

- ROSENKRANZ, P.; AUMEIER, P.; ZIEGELMANN, B. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 103, p. S96–S119, 2010.
- ROSENKRANZ, P.; FRIES, I.; BOECKING, O.; STÜRMER, M. Damaged *Varroa* mites in the debris of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies with and without hatching brood. *Apidologie*, v. 28, p. 427–437, 1997.
- ROTHENBUHLER, W. C.; KULINCEVIC, J. M.; KERR, W. E., Bee Genetics, *Annual Review of Genetics*. v. 2, p. 413–438, 1968.
- ROWLEY, A. F.; POWELL, A. Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology*, v. 179, p. 7209–7214, 2007.
- RUEPPELL, O. The architecture of the pollen hoarding syndrome in honey bees: implications for understanding social evolution, behavioral syndromes, and selective breeding. *Apidologie*, v. 45, p. 364–374, 2014.
- RÜPPELL, O.; PANKIW, T.; NIELSON, D. I.; FONDRK, M. K.; BEYE, M.; PAGE, R. E. Pleiotropy, epistasis and new QTL: the genetic architecture of honey bee foraging behavior. *Journal of Heredity*, v. 95, p. 481–491, 2004.
- RUTTNER, F. Geographical variability and classification. In: RINDERER, T. E. (ed.). *Bee genetics and breeding*. Orlando: Academic Press, 1986. p. 23-56.
- RUTTNER, F. *Naturgeschichte der Honigbienen*. Ehrenwirth, Verlag, Munich, Germany. 357 pp. 1992.
- RUTTNER, F.; HÄNEL, H. Active defense against *Varroa* mites in a carniolan strain of honeybees. *Apidologie*, v. 23, p. 173-187, 1992.
- SANTIAGO, G. P.; OTERO-COLINA, G.; SANCHEZ, D. M.; RAMIREZ-GUZMAN, M. E.; VANDAME, R. Comparing effects of three acaricides on *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) using two application techniques. *Fla. Entomol.*, v. 83, p. 468–476, 2000.
- SANTILLÁN-GALICIA, M. T.; CARZANIGA, R.; BALL, B. V.; ALDERSON, P. G. Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*. *J. Gen. Virol.*, v. 89, p. 1685–1689, 2008.
- SANTORO, M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.*, v. 59, p. 55-63, 2000.

- SCHATTON-GADELMAYER, K.; ENGELS, W. Hemolymph proteins and body weight in newly emerged worker honey bees according to different rates of parasitization by brood mites (Hymenoptera, Apidae: *Apis mellifera*, Acarina, Varroidae: *Varroa jacobsoni*). *Entomologia Generalis*, v. 14, p. 93-101, 1988.
- SCHMEHL, D. R. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, v. 71, p. 177-190, 2014.
- SCHNEIDER, S.; EISENHARDT, D.; RADEMACHER, E. Sublethal effects of oxalic acid on *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): changes in behaviour and longevity. *Apidologie*, v. 43, n. 2, p. 218-225, 2012.
- SEBRAE. Conheça a história da apicultura no Brasil: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/Conhe%C3%A7a-o-hist%C3%B3rico-da-apicultura-no-Brasil>. Acessado em 25 de fevereiro de 2016.
- SEEHUUS, S. C.; NORBERG, K.; GIMSA, U.; KREKLING, T.; AMDAM, G. V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 103, p. 962-967, 2006.
- SEELEY, T. D.; LEVIEN, R. A. Social foraging by honeybees: how a colony tracks rich sources of nectar. In: *Neurobiology and behavior of honeybees* (Menzel R, Mercer A, eds). New York: Springer-Verlag; 38-53, 1987.
- SEELEY, T. D. Social foraging by honeybees: how colonies allocate foragers among patches of flowers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 19, p. 343- 354, 1986.
- SEELEY, T. D. *The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies*. Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 1995.
- SELYE, H. *The Stress of Life*, 2nd ed.; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 1956.
- SHEESLEY, R.; PODUSKA, B (1968) Supplemental feeding of honeybees. *Glean. Bee Culture*, 96: 678-683.
- SHEESLEY, R.; PODUSKA, B. Supplemental feeding of honeybees. *Glean. Bee Culture*, v. 96, p. 678-683, 1968.
- SILVA, C. I.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; GROPPA, M.; BAUERMANN, S. G.; SARAIVA, A. M.; QUEIROZ, E. P.; EVALDT, A. C.; ALEIXO, K. P.; CASTRO, J. P.; CASTRO, M. M. N.; DE FARIA, L. B.; CALIMAN, M. J. F.; WOLFF, J. L.; PAULINO-NETO, H. F.; GARÓFALO, C. A. Catálogo polínico das plantas usadas por abelhas no campus da USP de Ribeirão Preto. 1. ed. - Ribeirão Preto, SP: Holos, 153 pp., 2014.

- SILVA, D. F.; ARAUJO, I. G.; WELTER, J. H.; WAGNER, R. B.; DE MENEZES, L. F.; ARBOITTE, M. Z. Development and pollen production in hives of Africanized *Apis mellifera* L. maintained in sunflower culture. *Revista Agrarian*, v. 3, p. 147-151, 2010.
- SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, v. 171, p. 3-59, 2002.
- SOKOL, R. The influence of a multimonth persistence of Fluwarol in a hive of a honey bee colony. *Medycyna Weterynaryjna*, v. 52, p. 718-720, 1996.
- SORCI, G.; FAIVRE, B. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philos. Trans. R. Soc. B.*, v. 364, p. 71-83, 2009.
- SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. Nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceeding*, v. 63, p. 381-389, 1998.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie*, v. 29, p. 291-302, 1998.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *J. Econ. Entomol.*, v. 94, p. 326-331, 2001.
- STORT, A. C.; GONÇALVES, L. S. A abelha africanizada e a situação atual da apicultura no Brasil. *Ciência e Cultura*, v.1, n.31, p.32-43, 1979.
- STORT, A. C.; GONÇALVES, L. S. A africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. In: BARRAVIERA, B.(ed.). *Venenos Animais: Uma visão integrada*. Rio de Janeiro, RJ: EPUC, Editora de Publicações Científicas Ltda, 1994. p. 33-47.
- STRACHECKA, A.; OLSZEWSKI, K.; PALEOLOG, J.; BORSUK, G.; BAJDA, M. Coenzyme q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, v. 86, p. 165-179, 2014.
- SUWANNAPONG, G.; MAKSONG, S.; SEANBUALUANG, P.; BENBOW, M. E. Experimental infection of dwarf honeybee with *Nosema ceranae* isolated from *Apis florum* Fabricius 1787: A new parasite in Thai honeybee. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 13, p. 361-364, 2010.

- SZABO, T. I.; LEFKOVITCH, L. P. Fourth generation of closed population honey bee breeding 2 relationship between morphological and colony traits. *Apidologie*, v. 19, p. 259-274, 1988.
- TAHA, E. K. A.; SAAD, N. A. K. Relationship between Population Size and Productivity of Honey Bee Colonies. *Journal of Entomology*, v. 10, p. 163-169, 2013.
- TAKEDA, K.; NOGUCHI, T.; NAGURO, I.; ICHIJO, H. Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Stress and Immune Response. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 48, p. 199-225, 2008.
- TANG, A. H.; TU, C. P. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 27876–27884, 1994.
- TARPY, D. R.; HATCH, S.; FLETCHER, D. J. C. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. *Animal Behaviour*, v. 59, p. 97–101, 2000.
- TARPY, D. R.; NIELSEN, R.; NIELSEN, D. I. A scientific note on the revised estimates of paternity frequency in *Apis*. *Insectes Sociaux*, v. 51, n. 2, p. 203–204, 2004.
- TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; ZAPPULLA, N.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F. et al. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 7185–7191, 2004.
- THOMPSON, H. M. Behavioral effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology*, v.12, p.317-330, 2003.
- TOBA, G.; AIGAKI, T. Disruption of the microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, v. 253, p. 179–187, 2000.
- TSURUDA, J. M.; PAGE JR., R. E. The effects of young brood on the foraging behavior of two strains of honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 64, p. 161–167, 2009.
- TURNER, K. K.; NIELSEN, B. D.; O’CONNOR, C. I.; BURTON, J. L. Bee pollen product supplementation to horses in training seems to improve feed intake: a pilot study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 90, p. 414–420, 2006.
- vanBUREN, N. W. M.; MARIEN, A. G. H.; VELTHUIS, H. H. W. The role of trophallaxis in the distribution of Perizin in a honeybee colony with regard to the control of the *Varroa* mite. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 65, p. 157–164, 1992.

- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, 2002.
- vanENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E. Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, v. 4, p. e6481, 2009.
- vanENGELSDORP, D.; HAYES, J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. A survey of honey bee colony losses in the U.S. fall 2007 to spring. *PLoS ONE*, v. 3, p. e4071, 2008.
- vanENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 103, p. S80–S95, 2010.
- vanENGELSDORP, D.; UNDERWOOD, R. M.; CARON, D.; HAYES, J. Jr. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*, v. 147, p. 599-603, 2007.
- VENCOVSKY, R.; KERR, W. Melhoramento Genético em Abelhas. II. Teoria e avaliação de alguns métodos de seleção. *Revista Brasileira de Genética*, v. 3, p. 493-502, 1982.
- VURAL, H.; KARAMAN, S. Socio-Economic Analysis of Beekeeping and the Effects of Beehive Types on Honey Production. *NotulaeBotanicaeHortiAgrobotanici Cluj-Napoca*, v. 37, n. 2, p. 223-222, 2009.
- WADDINGTON, K. D. Honey bee foraging profitability and round dance correlates. *Journal of Compared Physiology*, v. 148, p. 297-301, 1982.
- WANG, H.; ZHANG, S. W.; ZENG, Z. J.; YAN, W. Y. Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie*, v. 45, p. 618–625, 2014.
- WANG, R. W.; LIU, Z. Q.; DONG, K.; ELZEN, P. J.; PETTIS, J.; HUANG, Z. Y. Association of novel mutations in a sodium channel gene with fluvalinate resistance in the mite, *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, v. 41, p. 17–25, 2002.
- WANG, Y. K.; LIND, Y.; RAUWALD, H. W.; FANG, L.; QIAO, H.; KUCHTA, K. A phytosterol enriched refined extract of *Brassica campestris* L. pollen significantly improves benign prostatic hyperplasia (BPH) in a rat model as compared to the classical TCM pollen preparation Qianlie Kang Pule'an Tablets Ruwei. *Phytomedicine*, v. 22, p. 145–152, 2015.

- WEHLING, K.; NIESTER, C.; BOON, J. J.; WILLEMSE, M. T. M.; WIERMANN, R. p-Coumaric acid- a monomer in the sporopollenin skeleton. *Planta*, v. 179, p. 376-3809, 1989.
- WEIRICH, G. F.; COLLINS, A. M.; WILLIAMS, V. P. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, v. 33, p. 3-14, 2002.
- WENNER, A. M.; WELLS, P. H. Anatomy of a Controversy: The Question of a “Language” Among Bees. New York: Columbia University Press, 1990.
- WILLIAMS, I. H. The dependences of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Zoology Review*, v. 6, p. 229–257, 1994.
- WILLIAMSON, S. M.; BAKER, D. D.; WRIGHT, G. A. Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Invert Neurosci.*, v. 13, n. 1, p. 63–70, 2013.
- WILLIAMSON, S. M.; WILLIS, S. J.; WRIGHT, G. A. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology*, v. 23, p. 1409–1418, 2014.
- WILSON, E. O. *The insect societies*. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 1976. 548p.
- WILSON, W. T.; PETTIS, J. S.; HENDERSON, C. E.; MORSE, R. A. Tracheal mites. In: Honey Bee Pests, Predators and Diseases, Third Edition. AI Root publishing, Medina, Ohio, USA, pp 255–277, 1997.
- WINSTON M. The Biology of the honey bee. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1987.
- WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, v. 300, p. 650– 653, 2003a.
- WOOD, Z. A.; SCHRODER, E.; HARRIS, J. R.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 28, p. 32-40, 2003b.
- WU, Y. D.; LOU, Y. J. A Steroid Fraction of Chloroform Extract from Bee Pollen of *Brassica campestris* Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer PC- 3 Cells. *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 1087–1091, 2007.

- XU, J.; QIAN, W. Q.; SONG, J. D. A comparative study on different doses of Cernilton for preventing the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *Zhonghua Nan Ke Xue*, v. 14, n. 6, p. 533-537, 2008.
- XUE, X.; ZHAO, J.; CHEN, L.; ZHOU, J.; YUE, B.; LI, Y. Analysis of coenzyme Q10 in bee pollen using online cleanup by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography. *Food Chem.*, v. 133, p. 573–578, 2012.
- 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*, v. 134, p. 405–412, 2007.
- ZHANG, X.; HABIB, F. K.; ROSS, M.; BURGER, U.; LEWENSTEIN, A.; ROSE, K.; JATON, J. C. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth in vitro. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, n. 4, p. 735-738, 1995.
- ZHOU, T.; ZHOU, W.; WANG, Q.; DAI, P. L.; LIU, F.; ZHANG, Y. L.; SUN, J. H. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pest Biochem. Phys.*, v. 100, p. 35-40, 2011.
- ZHU, W.; SCHMEHL, D. R.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L. Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e77547, 2014.
- ZLOTKIN, E. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 44, p. 429 – 455, 1999.

APÊNDICE

Apêndice 1. Sequencia dos primers, relativos aos genes relacionados ao sistema de defesa antioxidante de *Apis mellifera*, utilizados nas reações de qPCR.

ALVO	SEQUÊNCIA (5' - 3') forward/reverse	ALVO	SEQUÊNCIA (5' - 3') forward/reverse
GSTD1	GGGGAAACTATGTGGCAGGG	SOD1	AAGCAGTGTGCGTTCTTCAGGGT
	AAAGTGAGACAGTGGATACGATGC		TCACGGAATTGGTACTCTCCGGTT
GSTS3	AGGGAGGCGAGCAAGTAGTG	SOD2	AGCTGTCGCCAAAGGTGATGT
	AGCGGTTGTCTTTCCGTCATT		GCAGCGTCTGGTTTACCGCC
GSTS4	TGGGATTAGGAGAACCCATCAGGT	PRX5	GTACCAGGAGCTTTTACACCAGGA
	CCGAACGGGGTCGTTGGCTT		TGTGCTTTACCCCATGCTGCC
CAT	ATCCACTCATTCCTGTTGGTAAGTT	TPX1	TTGCCTTTTCTGATCGTGCTGATGA
	GCCGGATCGAAGGCTATTTGC		CCACCTTGCTTACGTGGTGTGTT
VG	ACCCAAACTGGAACGGGACCT	TPX5	CCAGTTGATTGGAAGATAGGTGAAGAAGT
	GTGGCGGCGGTGTTGAGGAA		ACAGCGGTTGCGATACAATGCG
CYP6S3	GCGTCATTGGAGCGTTACTGTTCG	TPX3	CAAGAATCTGGAATTGCTTTACGAGGC
	AATTGTTTCGTTTTCTCGGCCAGTG		TGTTTCATCTACGCTTCTACCTACTGG
CYP9Q2	GCAAGAGCGTGGACCCGATG	TPX4	TGGCAAGGAGATTCATGGGTTGT
	AGGTGAAGGTGGGCGAAAGCA		GCCAAACGTCCTAATTCAGTGGTGC

Apêndice 2. Sequencia dos primers, relativos aos patógenos mais comuns de *Apis mellifera*, utilizados nas reações de qPCR.

ALVO	SEQUÊNCIA (5'- 3') forward/reverse
ABPV	TCCCAAGATTGGAATAAGACAGTTAG
	TTCCATAATGCAAAACATTCAAAGATCC
BQCV	CGAAGCGTTTTCCTGG
	GCTGTCGAGAGTCAGAGTT
CBPV	ACTGCTGCCCTCGATAG
	TGTGTTGAGGCAGGTTGG
DWV A	GTCTTGTGGATGAAGGTTATATAACTGG
	TCCGTAGAAAGCCGAGTTG
IAPV	GCTAATACCAAGACACCAATCACGGACC
	TCTCGACCCTGAGCATCTGTG
KBV	ACCAACGCGTGTCGTTCTCG
	ACAAGTGGTTGGTCCCGTCG
LSV	TCATCCCAAGAGAACCACT
	CGCGTGTGCATGGAA
SBV	TACGAATCGTGATTTCGATTCATT
	ACGGGTCTGACGCAAC
DWV B (VDV)	ACCAACGCGTGTCGTTCTCG
	ACAAGTGGTTGGTCCCGTCG
NOSEMA UNIVERSAL	AGCAGCCGCGTAATACTTGTTTC
	GTTCGTCCAGTCAGGGTCGT
Espécies de Tripanosomatídeos	GAGTGTGGCAGGACTACCC
	TGCACCAACCACGAAATGA

Decision on your submission (TJAR-2015-0006R1) to Journal of Apicultural Research

De : Journal of Apicultural Research
<em@editorialmanager.com>

Qua, 24 de Fev de 2016 10:38

Remetente : em tjar 0 4968ed 80f7d731
<em.tjar.0.4968ed.80f7d731@editorialmanager.com>

Assunto : Decision on your submission (TJAR-2015-0006R1) to
Journal of Apicultural Research

Para : Igor de Mattos <igormmattos@usp.br>

Responder para : Journal of Apicultural Research <tjar-
peerreview@informa.com>

CC: norman.carreck@btinternet.com

Feb 24, 2016

Ref.: Ms. No. TJAR-2015-0006R1
ANALYSIS OF THE EFFECTS OF COLONIES' POPULATION SIZE AND FEEDING SUPPLEMENTATION ON
BEE-POLLEN PRODUCTION.
Journal of Apicultural Research

Dear Mr. de Mattos,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Journal of Apicultural Research.

It was accepted on Feb 24, 2016

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Norman Carreck
Senior Editor
Journal of Apicultural Research

Comments from the Editors and Reviewers:

Analysis of the effects of colonies' population size and feeding supplementation on Bee-pollen production

Igor M de Mattos^{a*}, Jairo de Souza^a, and Ademilson E E Soares^a

^aGenetics Department, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14.049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Keyword: Bee-pollen, *Apis mellifera*, Beekeeping, Africanized honey bee, production

*Corresponding author: Email: igormmattos@usp.br

Summary

Today more than 1,500 tons of bee-pollen is produced per year worldwide. Despite the importance of this niche within the apiculture industry, several aspects of the bee-pollen production system have been poorly studied. The most suitable population size for productive colonies, as well as the efficacy of carbohydrate and protein supplementation, have raised many questions and divergent conclusions are drawn in literature. This research attempted to elucidate some questions of the bee-pollen productive system by measuring the bee-pollen production of colonies that presented different population sizes and feeding treatments. Our results suggest that mid-sized population (between 19,000 and 30,000) colonies seem to ally productivity and low frequency of problems of crammed grid boards. The carbohydrate supplementation should be used regularly and the protein supplementations must be restricted to periods of pollen scarcity. Although this information will be helpful for beekeepers engaged in pollen production, a great number of questions concerning bee-pollen production remain without the deserved scientific analysis.

Introduction

In the last 20 years the demand for bee-pollen in the USA, UK, and Germany has substantially increased. This growing consumption can be partially explained by the increasing incorporation of this product into human diets. Its favorable nutritional components, including up to 30 percent of protein (frequently comprising all the essential amino acids), a full spectrum of vitamins and minerals, lipids, hormone precursors, enzymes, carbohydrates, flavonoids, carotenoids, and many minor constituents, depending upon which plants the bees have been foraging (FAO, 2009); have been making the bee-pollen a popular nutritional supplement. Bee pollen has also been related to beneficial results against diseases, especially prostatic ones (Buck et al., 1989; Habib et al., 1990; Zhang et al., 1995; Hana et al., 2007; Dhar and Shoskes, 2007; Wu and Lou, 2007; Xu et al., 2008; Wang et al., 2015); as well as enhanced performance of athletes (Maughan and Evans, 1982). Livestock production systems can also benefit from the incorporation of bee pollen as a feeding source (Turner et al., 2006; Attia et al., 2011; Attia et al., 2014; El-Asely, 2014).

Today more than 1,500 tons of bee-pollen is produced per year worldwide, especially in Spain, China, Australia, Argentina, and Brazil (FAO, 2009). In Brazil, bee-pollen has also assumed a very important social role; once thousands of

1 50 families relied on this product as their main source of income. Despite this social
2 51 and economic importance, many aspects of bee-pollen production remain
3 52 without the deserved attention of science. As a result, there is no standard
4 53 protocol concerning the most suitable techniques to be applied in bee-pollen
5 54 productive system.
6 55 The relationship between population size and bee-pollen production is one of
7 56 these unsolved questions. Eckert et al. (1994) showed that the proportion of
8 57 pollen foragers was significantly higher in small colonies than in large ones. The
9 58 authors suggest that small colonies must invest in population growth to ensure
10 59 successful overwintering and, for that reason, the proportional number of pollen
11 60 foraging bees in smaller populations tends to be greater. Taha and Saad (2013),
12 61 however, report that the amount of brood and amount of pollen collected are
13 62 positively affected by the colonies population size. The authors suggest that the
14 63 superior performance of stronger colonies can be explained by higher number of
15 64 worker bees performing foraging behavior (resulting in a higher total number of
16 65 pollen foragers).
17 66 It is known that the pollen foraging regulation system is highly complex. The
18 67 number of foragers collecting pollen are positively influenced by quantities of
19 68 larvae and their associated pheromones (Pankiw et al., 1998; Pankiw and Page,
20 69 1999; Pankiw and Rubink, 2002; Pankiw, 2004; Pankiw, 2007; Tsuruda and
21 70 Page, 2009); other stimuli within the nest such as the amount of pollen stored
22 71 presents negative influence on pollen foraging (Barker, 1971; Free and Williams,
23 72 1971; Moeller, 1972; Fewell and Winston, 1992); and the genetics is also an
24 73 influencing factor once it affects the preference of worker bees to forage pollen
25 74 or nectar (Robinson and Page, 1989; Guzmán-Novoa et al., 1994; Page et al.,
26 75 1995; 2000; Calderone and Page, 1998; Rueppell et al., 2004; Chapman et al.,
27 76 2007).
28 77 Outside colony factors also influence pollen foraging. The quantities of food
29 78 resources available, as well as the quality of those sources, were shown to play
30 79 an important role on pollen and nectar foraging (Nunez, 1970; 1982; Seeley,
31 80 1986; Seeley and Levien, 1987; Waddington, 1982; Fewell and Winston, 1996).
32 81 The nectar incoming seems not to be part of a direct regulation of pollen foraging
33 82 but several authors have reported an increased pollen collection when the
34 83 amount of nectar stored is increased (Free, 1967; Fewell and Winston, 1996).
35 84 But in contrast to carbohydrate supplementation, the use of protein
36 85 supplementation is not unanimously recommended. Studies have reported that
37 86 pollen substitutes fail to improve brood rearing or even the amount of pollen
38 87 collected (Doull, 1980; Silva et al., 2010); other studies, however, observed
39 88 improved results when protein supplementation was applied to honey bee
40 89 colonies in pollen-producing systems (Sheesley and Poduska, 1968; Ibrahim,
41 90 1973; Alves et al., 1997).
42 91 Here we attempt to further elucidate the bee-pollen production system by
43 92 providing new and helpful information about some of the main concerns of
44 93 beekeepers performing pollen harvesting, as well as foster the discussion
45 94 concerning the most suitable productive methodologies.
46 95

96 **Material and methods**

97 The study was conducted in the municipality of Ribeirão Preto, São Paulo State,
98 Southeastern Brazil (latitude: - 21° 10' 42", longitude: + 47° 48' 24", altitude: 545

99 m). The experimental apiary was surrounded by an *Eucaliptus* sp abandoned
100 crop and native vegetation. Same-aged sibling African-derived queens headed all
101 tested colonies. The same model of pollen trap with a grid board of 1,426 cm²
102 was installed, between the bottom board and the brood chamber, in all tested
103 colonies.
104 *Population size*
105 The influence of population size on pollen collection was tested by comparing
106 the amount of pollen harvested by 35 colonies with different configurations and,
107 consequently, population sizes (Table 1). All colonies were set using Langstroth
108 hive model. The methodology used to estimate the population size of each colony
109 was the same developed by Burgett and Barikam (1985). All data collection was
110 performed simultaneously for the different groups as described above. By the
111 end of one month, a mean diary pollen production (g/day) was calculated for all
112 tested colonies. The proportion of pollen collected according to each population
113 size was also calculated by the following mathematical equation:
114 Mean Pollen daily production (g/day) x Population size⁻¹ x 10³.
115 *Effects of carbohydrate and protein supplementation*
116 A different group of 40 colonies was equally divided into 4 groups. Those
117 colonies were standardized for their hive configuration as in Group C (Table 1).
118 Those colonies were submitted to different feeding treatments (Table 2) and had
119 their pollen production registered. After one month sampling the bee-pollen
120 production, the average daily bee-pollen production (g/day) was calculated by
121 each colony for further comparisons. All data collections were performed
122 simultaneously for all the different groups.
123
124 **Results**
125 The experimental apiary of the University of São Paulo at Ribeirão Preto is
126 located in an area where the climate is defined by two marked seasons: one cool
127 and dry (April to September) and another hot and rainy (October to March)
128 (Köppen and Geiger, 1928; Silva et al., 2014). The flora surrounding the apiary
129 comprises 289 native and introduced species distributed in 232 genera and 73
130 botanical families; about 67% of those plants presented melittophily as the main
131 pollination syndrome (Aleixo et al. 2014, Silva et al. 2014). Among those species
132 we can find several specimens of *Alternanthera brasiliana*, *Chamissoa altissima*
133 (Amaranthaceae); *Bidens sulphurea*, *Crepis japonica*, *Montanoa bipinnatifida*,
134 *Sphagneticola trilobata*, *Tithonia diversifolia* (Asteraceae); *Eucalyptus citriodora*,
135 *E. grandis*, *E. moluccana*, *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis*, *E.*
136 *uniflora*, *Syzygium cumini*, *S. malaccense* (Myrtaceae); *Paspalum notatum* and
137 *Brachiaria* sp (Poaceae); *Citrus latifolia*, *C. limonia*, *Murraya paniculata*
138 (Rutaceae). According to Almeida-Anacleto et al. (2012) species of the
139 Amaranthaceae, Araliaceae, Asteraceae, Myrtaceae, Poaceae and Rutaceae
140 families are an important source of pollen for *A. mellifera* in São Paulo State. The
141 periods of January to May and late September to December are the ones that
142 presents the greatest abundancy of pollen sources in the region (Barreto et al.,
143 2006).
144 *Population Size*
145 The group G of colonies that presented 78,800 bees as population size had to be
146 discarded from this research once the way into those hives were heavily
147 congested by a great number of worker bees accumulated on the entrance of the

148 trap. Consequently, no bee-pollen was collected and the thermoregulation of
149 those colonies was compromised.

150 The data concerning the pollen collection in different population sizes were not
151 normally distributed (Kolmogorov-Smirnov: $P < 0.001$; Shapiro-Wilk: $P < 0.001$)
152 and thus were analyzed with nonparametric statistics. The colonies from Group
153 C presented the highest mean pollen collected per colony ($40.45 \text{ g/day} \pm 31.19$),
154 followed by the colonies from the group B ($34.64 \text{ g/day} \pm 19.93$) and the ones
155 from the group F ($28.89 \text{ g/day} \pm 28.57$) (Table 3, Figure 1A). The comparison of
156 the amount of pollen collected among the different treatments (population sizes)
157 showed significantly statistically difference (Kruskal-Wallis test: $K = 28.92$; $P <$
158 0.001) (Figure 1A). The Dunn's test was applied as post hoc analysis and
159 revealed significant differences when the groups were pairwise compared
160 (Figure 1B). The distribution of data obtained seems to best fit to a third-degree
161 (cubic) polynomial model ($R = 0.237$; $R^2 = 0.056$; Adjusted $R^2 = 0.049$; $Z = 7.979$; $P <$
162 0.001) (Figure 2).

163 The highest proportion of pollen collected according to the population size was
164 registered in colonies from the group B ($1.78 \text{ g/day} \times \text{population size}^{-1}$),
165 followed by colonies from the group A (1.71) and finally the ones from group C
166 (1.36) (Table 3). An intense negative statistical correlation seems to drive the
167 relationship between the proportion of pollen collected (according to the
168 population size) and the respective estimated population size ($R = -0.926$; $R^2 =$
169 0.858 ; $P = 0.007$) (Figure 3).

170 *Effects of carbohydrate and protein supplementation*

171 The data concerning the pollen collection with different kinds of
172 supplementation also did not meet the assumption of normality (Shapiro-Wilk:
173 $W = 0.896$, $P < 0.001$; Kolmogorov-Smirnov: $D = 0.214$; $P < 0.001$).

174 Colonies fed with carbohydrate supplementation (group 2) presented the
175 highest mean grams of pollen collected per day ($79.59 \pm 68.55 \text{ S.D.}$), followed by
176 colonies that receive both carbohydrate and protein supplementation (group 4),
177 which presented $78.47 \pm 59.42 \text{ S.D.}$ grams per day. Colonies fed with protein
178 supplementation (group 3) presented the lowest mean grams of pollen collected
179 per day ($59.71 \pm 50.36 \text{ S.D.}$). Colonies that did not receive supplementation
180 (group 1) presented $63.44 \pm 63.79 \text{ S.D.}$ grams per day.

181 The comparison through the non-parametric statistical test Kruskal-Wallis
182 confirmed a significant difference among the different treatments applied ($K =$
183 7.971 ; $P = 0.046$). The Mann-Whitney test confirmed that the group 4 presented
184 significant higher pollen production than the ones presented by groups 1 and 3
185 (Figure 4).

186

187 **Discussion**

188 Several authors have addressed the effects of population size on pollen
189 collection, but relatively few studies have discussed the effect of population size
190 on bee-pollen production. In Brazil, beekeepers prioritize smaller colonies or
191 even split bigger colonies into two swarms when aiming bee-pollen productivity
192 (data not shown).

193 Eckert et al. (1994) suggests that small colonies must invest in population
194 growth to ensure successful overwintering and, for that reason, the proportional
195 number of pollen foraging bees in smaller populations tends to be greater. Our
196 data corroborates to that conclusion once the most populated colonies produced

197 proportionally (grams of pollen x population size $^{-1} \times 10^3$) fewer amounts of
198 pollen (Table 3). A high negative linear correlation was also registered (Figure 3)
199 between the proportional amount of pollen collected per worker bee and the
200 estimated population size. However, our data showed significant greater
201 amounts of bee-pollen productive outputs by the mid-sized population colonies.
202 Our findings suggest a relationship between pollen production and the
203 population size to be more likely to fit a third-degree (cubic) polynomial
204 distribution ($P < 0.001$) (Figure 4).

205 Large and mid-sized colonies' population tends to present a greater total number of
206 foragers than smaller colonies. It seems that this greater total number of
207 pollen forager overcomes the greater proportion of pollen foragers in total
208 amount of pollen produced. It is fair to point out that the data regarding the
209 relationship between pollen collection and population size presented a high
210 variability inside groups, which may be due to small number of colonies per
211 treatment. Consequently, further studies are necessary for definitive conclusions.
212 It is also necessary to take into account that the conclusions presented by this
213 paper may be relative to the specific pollen trap model used. The pollen trap
214 model used in this research was provided with a wide grid board of 1,426 cm²
215 for the entrance of foragers returning from the collection trips.

216 The results obtained in this research showed that intermediary size colonies also
217 combine less frequent obstruction of the hive's entrance, caused by excessive
218 number of foragers trying to re-enter the hive, which happened to configurations
219 that comprised population sizes over 30,000 (groups D, E and F). The
220 obstruction was recurrent in foraging peak periods and probably affected the
221 performance of large sized colonies. The obstruction of the entrance is a
222 concerning fact once it can hinder the colonies thermoregulation and influx of
223 food.

224 The number of brood frames used to compose each configuration can also be part
225 of the explanation of Intermediary sized colonies presenting better production
226 than smaller ones. Probably the larger brood area of the mid-sized
227 configurations (group C), worked as stimulus for better pollen foraging
228 outcomes (Fewell and Page, 1993; Eckert et al., 1994; Pankiw and Page, 1999; Le
229 Conte et al., 2001; Pankiw and Rubinik, 2002; Pankiw, 2007; Tsuruda and Page,
230 2009).

231 The use of carbohydrate supplementation for enhancing pollen foraging seems
232 to be consensual. Many authors have described an improvement on the total
233 amount of pollen collected when honey bees were previously fed with
234 carbohydrate supplementation (Free and Spencerbooth, 1961; Free, 1965;
235 Barker and Jay, 1978; Goodwin, 1994; Silva et al., 2010). Our data agree with that
236 conclusion once groups fed with carbohydrate supplementation (2 and 4)
237 showed the highest mean bee-pollen production (Figure 4). Despite the
238 inexistence of significant statistical difference between groups 2 and 4 (Figure
239 4E) a slight superiority was observed in colonies fed with just carbohydrate
240 supplementation and, for that reason, we suggest the hypothesis that protein
241 supplementation may play an inhibitory role on bee-pollen production. The fact
242 that the group 3, fed only with protein supplementation, presented the lowest
243 bee-pollen production records (lower than the control group) corroborates with
244 that hypothesis. It is important to highlight that these conclusions are relative to
245 the specific supplementation formula tested in this research. The protein

246 supplement used in this research was chosen for its popularity among Brazilian
 247 pollen producers, countrywide availability and affordable prices.
 248 It is known that a strong genetic component affects the “choice” between pollen
 249 and nectar foraging. Although individuals can switch between nectar and pollen
 250 foraging according to colony’s needs (Calderone and Page, 1991; Fewell and
 251 Page, 1993; Fewell and Winston, 1996), pollen foragers specialists tend to carry
 252 relatively more pollen and less nectar and vice versa (Hunt et al., 1995; Page et
 253 al., 2000). Once nectar collection by honey bees seems to be controlled primarily
 254 by nectar quality and availability (Nunez, 1970; 1982; Seeley, 1986; Seeley and
 255 Levien, 1987; Waddington, 1982, Fewell and Winston, 1996); possibly the high
 256 availability of carbohydrates induced by this research must have encouraged the
 257 shift of nectar foragers into pollen foragers. Free (1967), Fewell and Winston
 258 (1996) also found a slight but significant increase in pollen foraging and/or
 259 pollen load size with changes in nectar levels.
 260 Keller et al. (2005) gather a very rich review of the recent studies related to the
 261 regulation of the pollen foraging behavior. The authors highlight the complexity
 262 of the pollen-foraging regulation system and the difficulty in predicting how a
 263 given parameter would change the pollen-foraging responses. The hypothesis
 264 that protein supplementation inhibits the pollen collection through the volatiles
 265 also present in stored pollen is not discarded but is probably not the main
 266 reason. Dreller and Tarpy (2000) showed that olfactory stimulation within the
 267 colony is insufficient to increase or decrease the foraging effort, but suggest that
 268 a more complex individual regulation system must play an important role on this
 269 regulatory mechanism. Camazine et al. (1998) supports the hypothesis that
 270 nurse bees provide pollen foragers with reliable information concerning the
 271 colony’s need for pollen, which they use to modulate their level of pollen
 272 foraging activity. As the primary consumers and dispensers of both pollen and
 273 proteinaceous supplements, nurse bees integrate information about the colony’s
 274 pollen supply and demand. Information about pollen supply is gathered as they
 275 search for, and consume pollen (and protein rich feeding); information about
 276 pollen demand is available as they provide pollen and jelly to brood and adult
 277 bees which need proteinaceous nourishment (Camazine et al., 1998). The high
 278 availability of protein source feeding inside the hive (apparently measured by
 279 nurse bees) seems to interact as a regulatory mechanism that tends to reduce
 280 pollen foraging. As a consequence of this regulation system, colonies regularly
 281 fed with protein supplement tend to increase brood production but decrease
 282 relative foraging effort (Fewell and Winston, 1992). Camazine (1993) showed
 283 that many pollen foragers respond to the addition of pollen by switching to
 284 nectar foraging or by remaining in the hive and ceasing to forage at all.
 285 Our data allows us to lean into the hypothesis that protein supplementation
 286 present a negative effect into bee-pollen production as well as into a complex
 287 pollen-foraging regulatory system that also involves nurse bees as a fundamental
 288 trigger. Keller et al (2005) also emphasize that honey bees may benefit from
 289 supplementary protein feeding only when the natural pollen supply is critically
 290 low. Considering southeastern Brazilian blooming periods and weather
 291 conditions, we may suggest that periods of scarcity might be more frequent
 292 during autumn and winter (specially within June to August) (Barreto et al.,
 293 2006). In this period the amount of pollen stored in hive may reduce, thus
 294 protein supplementation can be required for maintaining colonies healthy.

295 In ideal bee-pollen productive systems only colonies that present a pronounced
296 ability to collect great amounts of pollen should be used. Additionally, the trap
297 should retain just a part of the pollen incoming with foragers (usually 30% to
298 70%) allowing by that way an adequate provision for brood and adults nutrition
299 (Magalhães, 2005; Milfont et al., 2011). Those colonies must also be installed in
300 places where a great amount of pollen is regularly available. If all those measures
301 were adopted the use of protein supplementation must be restricted to eventual
302 periods of scarcity.

303 In conclusion, this research brings important information concerning the
304 development of a more effective bee-pollen productive system. The use of bee-
305 pollen traps containing broad grid boards, as the one used in this research, is
306 highly recommended. Mid-sized population (between 19,000 and 30,000)
307 colonies seem to ally productivity and low frequency of problems of crammed
308 grid boards, but further studies are necessary for a definitive conclusion about
309 the ideal population size. The carbohydrate supplementation should be used
310 regularly and the protein supplementations must be restricted to periods of
311 pollen scarcity. Although this information must be helpful for beekeepers aiming
312 pollen production, a great number of questions concerning bee-pollen remain
313 unsolved. Future studies addressing the quality of the pollen produced in diverse
314 types of traps, the economic viability of supplementation as well as the
315 relationship of pollen-hoarding syndrome and pollen producing traits is
316 extremely necessary.

317

318 **Aknowledgements**

319 The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
320 Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
321 Superior) for financial assistance, and Dr. David Tarpy for comments that greatly
322 improved the manuscript.

323

324 **References**

325

- 326 Aleixo, K P; De Faria, L B; Garófalo, C A; Fonseca, V; Silva, C; (2013) Pollen
327 Collected and Foraging Activities of *Frieseomelitta varia* (Lepeletier)
328 (Hymenoptera: Apidae) in an Urban Landscape. *Sociobiology*, 60(3):266-276.
329 Alves, M (2013) Produção de Pólen Apícola. *Pesquisa & Tecnologia*, 10: 1-6.
330 Attia, Y A; Abd Al-Hamid, A E; Ibrahim, M S; Al-Harthi, M A; Bovera, F; Sh.
331 Elnaggar, A (2014) Productive performance, biochemical and hematological
332 traits of broiler chickens supplemented with propolis, bee pollen, and mannan
333 oligosaccharides continuously or intermittently. *Livestock Science*, 164: 87-95.
334 Attia, Y A; Al-Hanoun, A; Tag El- Din, A E; Bovera, F; Shewika, Y E (2011) Effect of
335 bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits.
336 *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95: 294-303.
337 Barker, R G; Jay, S C (1978) Effect of various sugar and honey treatments on the
338 foraging activity of honey bees. *Manitoba entomologist*, 12:15-24.
339 Barker, R J (1971) The influence of food inside the hive on pollen collection.
340 *Journal of Apicultural Research*, 10: 23-26.
341 Barreto, L M R C; Funari, S R C; Orsi, R O; Dib, A P S (2006) Produção de pólen no
342 Brasil. Cabral Editora e Livraria Universitária: Taubaté, São Paulo. 100pp.

1 343 Buck, A C; Rees, R W; Ebeling, L (1989) Treatment of chronic prostatitis and
2 344 prostatodysnia with pollen extract. *British Journal of Urology*, 64: 496 –499.
3 345 Burgett, M; Burikam, I (1985) Number of Adult Honey Bees (Hymenoptera:
4 346 Apidae) Occupying a Comb: A Standard for Estimating Colony Populations.
5 347 *Journal of Economic Entomology*, 78: 1154-1156
6 348 Calderone, N W; Page Jr., R E (1991) Evolutionary genetics of division of labor in
7 349 colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). *American Naturalist*, 138: 69-92.
8 350 Calderone, N W; Page Jr., R E (1998) Genotypic variability in age polyethism and
9 351 task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).
10 352 *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22, 17-25.
11 353 Camazine, S; Craillsheim, K; Hrassnigg, N; Robinson, G E; Leonhard, B (1998)
12 354 Protein trophallaxis and the regulation of pollen foraging by honey bees (*Apis*
13 355 *mellifera* L.). *Apidologie*, 29: 113-126.
14 356 Camazine, S. (1993) The regulation of pollen foraging by honey bees: how
15 357 foragers assess the colony's need for pollen. *Behavioral Ecology and*
16 358 *Sociobiology*, 323: 265-272.
17 359 Chapman, N; Oldroyd, B; Hughes, W (2007) Differential responses of honeybee
18 360 (*Apis mellifera*) patrines to changes in stimuli for the generalist tasks of
19 361 nursing and foraging. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61: 1185–1194.
20 362 DeGrandi-Hoffman, G; Wardell, G; Ahumada-Segura, F; Rinderer, T; Danka, R;
21 363 Pettis, J (2008) Comparisons of pollen substitute diets for honey bees:
22 364 consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations.
23 365 *Journal of Apicultural Research*, 47: 265-270.
24 366 Dhar, N B; Shoskes, D A (2007) New therapies in chronic prostatitis. *Current*
25 367 *Urology Reports*, 8: 313-8.
26 368 Doull, K M (1980) Relationships between consumption of a pollen supplement,
27 369 honey production and broodrearing in colonies of honeybees *Apis mellifera* L.
28 370 *Apidologie* 11: 361–365.
29 371 Dreller, C; Tarpy, D R (2000) Perception of the pollen need by foragers in a
30 372 honeybee colony. *Animal Behaviour*, 59: 91–96.
31 373 Eckert, C D; Winston, M L; Ydenberg, R C (1994) The relationship between
32 374 population size, amount of brood, and individual foraging behaviour in the
33 375 honey bee, *Apis mellifera* L. *Oecologia*, 97: 248–255.
34 376 El-Asely, A M; Abbass, A A; Austin, B (2014) Honey bee pollen improves growth,
35 377 immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against
36 378 infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunology*, 40: 500-506.
37 379 FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009) Bees and
38 380 Their Role in Forest Livelihoods: A guide to the services provided by bees and
39 381 the sustainable harvesting, processing and marketing of their products, by
40 382 Nicola Bradbear, Rome – Italy.
41 383 Fewell, J H; Page, R E (1993) Genotypic variation in foraging responses to
42 384 environmental stimuli by honey bees, *Apis mellifera*. *Cellular and Molecular*
43 385 *Life Science*, 49: 1106–1112.
44 386 Fewell, J H; Winston, M L (1992) Colony state and regulation of pollen foraging in
45 387 the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 30:
46 388 387-393.
47 389 Fewell, J H; Winston, M L (1996) Regulation of nectar collection in relation to
48 390 honey storage levels by honey bees, *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology*, 7: 286-
49 391 291.

Free, J B (1965). The effect on pollen collection of feeding honey-bee colonies with sugar syrup. *The Journal of Agricultural Science*, 64: 167-168.

Free, J B; Spencerbooth, Y (1961) Effect of feeding sugar syrup to honey-bee colonies. *Journal of Agricultural Science*, 57:147-151.

Free, J B; Williams, I H (1971) The effect of giving pollen and pollen supplement to honeybee colonies on the amount of pollen collected. *Journal of Apicultural Research*, 10: 87-90.

Free, J. B. (1967) Factors determining the collection of pollen by honeybee foragers. *Animal Behaviour*, 15: 134-144.

Goodwin, R M; Ten-Houten, A; Perry, J H (1994) Effect of feeding pollen substitutes to honey bee colonies used for kiwifruit pollination and honey production. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22: 459-462.

Guzmán-Novoa, E; Page, R E; Gary, N E (1994) Behavioral and lifehistory components of division of labor in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34: 409-417.

Habib, F K; Ross, M; Buck, A C; Ebeling, L; Lewenstein, A (1990) In vitro evaluation of the pollen extract, cernitin T-60, in the regulation of prostate cell growth. *British Journal of Urology*, 66: 393-397.

Hana, L H Y; Shanb, S; Zhanga, X; Wanga, N L; Lub, X P; Yao, X S (2007) Down-regulation of prostate specific antigen in LNCaP cells by flavonoids from the pollen of *Brassica napus*. *Phytomedicine*, 14: 338-343

Hunt, G J; Page Jr., R E; Fondrk, M K; Dillum, C J (1995) Major quantitative trait loci affecting honey bee foraging behavior. *Genetics*, 141: 1537-1545.

IBM Corp. Released. (2013). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Ibrahim, S H (1973) Effect of feeding on pollen collection of honey bee colonies. *Bulletin de la Société entomologique d'Égypte*, 57: 227-230.

Keller, I; Fluri, P; Imdorf, A (2005) Pollen nutrition and colony development in honey bees – Part II. *Bee World*, 86: 27-34.

Köppen, W; Geiger R (1928) *Klimate der Erde*. Justus Perthes: Gotha, Germany.

Magalhães, E O (2005) Manejo para produção de pólen apícola no Nordeste. In: Seminário Nordestino de Pecuária. Fortaleza, Ceará.

Matilla, H R; Otis, G W (2006) Influence of pollen diet in spring on the development of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*, 99: 604-613.

Maughan, R J; Evans, S P (1982) Effects of pollen extract upon adolescent swimmers. *British Journal of Sports Medicine*, 16: 142-145.

Milfont, M O; Freitas, B M; Alves, J E (2011) Pólen Apícola: manejo para produção de pólen no Brasil. Aprenda Fácil Editora: Viçosa, Minas Gerais. 102pp.

Moeller, F E (1972) Honey bee collection of corn pollen reduced by feeding pollenin the hive. *American Bee Journal*, 112: 210-212.

Nabors, R (2000) The effects of spring feeding pollen substitute to colonies of *Apis mellifera*. *American Bee journal*, 140: 322-323.

Nunez, J A (1970) The relationship between sugar flow and foraging and recruiting behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) *Animal Behaviour*, 18: 527-538.

439 Nunez, J A (1982) Honeybee foraging strategies at a food source in relation to its
 440 distance from the hive and the rate of sugar flow. *Journal of Apicultural*
 441 *Research*, 21: 139-150.
 442 Page, R E (2013) The Spirit of the Hive: The Mechanisms of Social Evolution.
 443 Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts. 226pp.
 444 Page, R E; Fondrk, M K; Hunt, G J; Guzman-Novoa, E; Humphries, M A; Nguyen K;
 445 Greene, A S (2000) Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging
 446 behavior. *Journal of Heredity*, 91: 474-479.
 447 Page, R. E., Waddington, K. D., Hunt, G. J., & Fondrk, M. K. (1995) Genetic
 448 determinants of honey bee foraging behaviour. *Animal Behaviour*, 50, 1617-
 449 1625.
 450 Pankiw, T (2004) Brood Pheromone Regulates Foraging Activity of Honey Bees
 451 (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97: 748-751.
 452 Pankiw, T (2007) Brood pheromone modulation of pollen forager turnaround
 453 time in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Behavior*, 20: 173-
 454 180.
 455 Pankiw, T; Page, R E (1999) The effect of genotype, age, sex, and caste on
 456 response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis*
 457 *mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 185: 207-213
 458 Pankiw, T; Page, R E; Fondrk, M K (1998) Brood pheromone stimulates pollen
 459 foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*,
 460 44, 193-198.
 461 Pankiw, T; Rubink, W L (2002) Pollen foraging response to brood pheromone by
 462 Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.). *Annals of*
 463 *Entomological Society of America*, 95: 761-767.
 464 Robinson, G E; Page, R E (1989) Genetic determination of nectar foraging, pollen
 465 foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and*
 466 *Sociobiology*, 24: 317-323.
 467 Rueppell, O (2014) The architecture of the pollen hoarding syndrome in honey
 468 bees: implications for understanding social evolution, behavioral syndromes,
 469 and selective breeding. *Apidologie*, 45: 364-374.
 470 Seeley, T D (1986) Social foraging by honeybees: how colonies allocate foragers
 471 among patches of flowers. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19: 343- 354.
 472 Seeley, T D; Levien, R A (1987) Social foraging by honeybees: how a colony
 473 tracks rich sources of nectar. In: Neurobiology and behavior of honeybees
 474 (Menzel R, Mercer A, eds). New York: Springer-Verlag; 38-53.
 475 Sheesley, R; Poduska, B (1968) Supplemental feeding of honeybees. *Glean. Bee*
 476 *Culture*, 96: 678-683.
 477 Silva, C I; Imperatriz-Fonseca, V L; Groppo, M; Bauermann, S G; Saraiva, A M;
 478 Queiroz, E P; Evaldt, A C; Aleixo, K P; Castro, J P; Castro, M M N; de Faria, L B;
 479 Caliman, M J F; Wolff, J L; Paulino-Neto, H F; Garófalo, C A; (2014) Catálogo
 480 polínico das plantas usadas por abelhas no campus da USP de Ribeirão Preto.
 481 1. ed. - Ribeirão Preto, SP: Holos, 153 pp.
 482 Silva, D F; Araujo, I G; Welter, J H; Wagner, R B; de Menezes, L F; Arboitte, M Z;
 483 (2010) Development and pollen production in hives of Africanizeds *Apis*
 484 *mellifera* L. maintained in sunflower culture. *Revista Agrarian*, 3: 147-151.
 485 Taha, E K A; Saad, N A K (2013) Relationship between Population Size and
 486 Productivity of Honey Bee Colonies. *Journal of Entomology*, 10: 163-169.

- 487 Tsuruda, J M; Page Jr., R E (2009) The effects of young brood on the foraging
488 behavior of two strains of honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and*
489 *Sociobiology*, 64: 161–167
- 490 Turner, K K; Nielsen, B D; O'Connor, C I; Burton, J L (2006) Bee pollen product
491 supplementation to horses in training seems to improve feed intake: a pilot
492 study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90: 414–420.
- 493 Waddington, K D (1982) Honey bee foraging profitability and round dance
494 correlates. *Journal of Compared Physiology*, 148: 297–301.
- 495 Wang, Y K; Lind, Y; Rauwald, H W; Fang, L; Qiao, H; Kuchta, K (2015) A
496 phytosterol enriched refined extract of *Brassica campestris* L. pollen
497 significantly improves benign prostatic hyperplasia (BPH) in a rat model as
498 compared to the classical TCM pollen preparation Qianlie Kang Pule'an
499 Tablets Ruwei. *Phytomedicine*, 22: 145–152.
- 500 Wu, Y D; Lou, Y J (2007) A Steroid Fraction of Chloroform Extract from Bee
501 Pollen of *Brassica campestris* Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer PC-
502 3 Cells. *Phytotherapy Research*, 21: 1087–1091.
- 503 Xu, J; Qian, W Q; Song, J D (2008) A comparative study on different doses of
504 Cernilton for preventing the clinical progression of benign prostatic
505 hyperplasia. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 14: 533–537.
- 506 Zhang, X; Habib, F K; Ross, M; Burger, U; Lewenstein, A; Rose, K; Jatton, J C (1995)
507 Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen
508 extract, which inhibits cancerous cell growth in vitro. *Journal of Medicinal*
509 *Chemistry*, 38: 735–738.

Table

Table 1. The different configurations used in all 6 treatment-groups for testing the effects of population size on bee-pollen production.

		Configuration					
		Brood Chamber			Super		Population size
Group	Number of tested colonies	Brood frames	Food frames	Frames covered by bees	Food frames	Frames covered by bees	
A	5	6	2	6	-	-	14,580
B	5	8	2	8	-	-	19,440
C	5	8	2	8	10	8	29,680
D	5	16	4	16	-	-	38,880
E	5	16	4	16	10	8	49,120
F	5	16	4	16	20	16	59,300
G	5	16	4	16	30	24	78,800

Table 2. The different feeding treatments used in the research.

Group		Feeding treatment	Number of colonies
1	Control	-	10
2	Carbohydrate supplementation	500 ml Sucrose solution (50%)	10
3	Protein supplementation	200 g of a doughy blend made of 70% of powdered sugar, 20% of commercial amino-acids animal supplement (Aminopan ©) and 10% of vanilla extract	10
4	Carbohydrate + Protein supplementation	500 ml Sucrose solution (50%) plus 200 g of the 20% Aminopan © blend	10

Table 3. The different groups tested and its respective population size (approximate number of worker honey bees*), the mean amount of pollen collected (grams of pollen per day), the standard deviation (S.D.) and the proportion of mean pollen collected divided by the population size.

Group	Population Size*	Mean Pollen Collected	S. D.	Pollen g/day x Population size⁻¹ x 10³
A	14,580	24.95	14.83	1.71
B	19,440	34.69	19.93	1.78
C	29,680	40.45	31.19	1.36
D	38,880	20.71	14.53	0.53
E	49,120	25.10	19.37	0.51
F	59,360	28.89	28.57	0.48

*The methodology used to estimate the colony population was developed by Burgett and Barikam (1985)

Figure

Figure 1. **A.** Comparison among the different tested groups concerning the respective mean amount of pollen collected and the population size in those tested hives. **B.** The statistical comparison (Dunn's multiple comparison test) of the mean amount of pollen collected in paired tested groups.

Dunn's multiple comparison test: *Adjusted P value < 0.05; **Adjusted P value < 0.01

Figure

Figure 2. Non-linear regression of the data concerning the amount of pollen collected (g/day) and the respective population size estimation.

Figure

Figure 3. Linear regression of the proportion of pollen collected per 10,000 worker bees, and the respective population size.

Figure 4. **A.** Comparison between the amount of pollen collected (g/day), and the standard error, in colonies fed with carbohydrate supplement (2) and colonies that did not receive any supplement (1); **B.** Comparison between the amount of pollen collected and in colonies fed with protein supplement (3) and colonies that did not receive any supplement; **C.** Comparison between the amount of pollen collected in colonies fed with carbohydrate and protein supplements (4) and colonies that did not receive any supplement; **D.** Comparison between the amount of pollen collected in colonies fed with carbohydrate supplement and colonies fed with protein supplement; **E.** Comparison between the amount of pollen collected in colonies fed with carbohydrate and protein supplements and colonies fed with carbohydrate supplement; **F.** Comparison between the amount of pollen collected in colonies fed with carbohydrate and protein supplements and in colonies fed with protein supplement; **G.** Bee-pollen production in all feeding treatments compiled

*Mann-Whitney test: $P < 0.05$; nsMann-Whitney test: $P > 0.05$

Mitigating effects of pollen during Paraquat exposure on oxidative stress and pathogen prevalence in *Apis mellifera* L.

Igor Medici de Mattos^a, Deniz Chen^b, ^aAdemilson Espencer E. Soares, David R. Tarpy^b

^aDepartment of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14.049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^bDepartment of Entomology, College of Agriculture and Life Science, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695, USA.

Abstract

Honey bee (*Apis mellifera* L.) populations have been experiencing notable mortality in Europe and North America. No single cause has been identified for these dramatic losses, but rather multiple interacting factors are likely responsible (such as pesticides, malnutrition, habitat loss, and pathogens). Paraquat is one of the most widely used non-selective herbicides, especially in developing countries such as China and India. This herbicide is a highly effective inducer of oxidative stress in a wide range of living systems, including honey bees, and has been used for empirical research to test means to mitigate it. Here, we test the effects of Paraquat on the expression of antioxidant-related genes as well as on the dynamics of pathogen titers. Moreover, we tested the effects of pollen as mitigating factor to Paraquat exposure. Our results show significant changes in the expression of several antioxidant genes in the presence of Paraquat, such as PRX5, SOD2, and GSTS4. Moreover, we observed an increase of certain pathogens (Nosema, DWV, and SBV) when exposed to different concentrations of Paraquat. Finally, we demonstrate a mitigating effect of pollen on reducing oxidative stress and improving survival of bees exposed to Paraquat. The presence of pollen in the diet was also correlated to a reduced prevalence of *Nosema* and viral pathogens. We discuss the importance of honey bees' nutrition, especially the availability of pollen, on colony losses chronically reported in USA and Europe.

Keywords

Apis mellifera, oxidative stress, Paraquat, Pollen, bee bread, Virus

1. Introduction

Honey bees (*Apis mellifera* L.) are essential to the functioning of natural and agricultural ecosystems, as they ensure the proper reproduction of many plants through their pollination services (Delaplane and Mayer, 2000; Klein et al., 2007; Gallai et al., 2009). In turn, honey bees benefit from pollination by acquiring the necessary nutrients for their growth and health, found in nectar and pollen (Winston, 1987; Di Pasquale et al., 2013). The main source of protein for honey bees, known as “bee bread,” consists of fermented natural flower pollen (the male gametophyte of flowers) mixed with nectar and bee secretions. Bee bread is also the primary source of important nutrients such as lipids, vitamins, minerals (Zn, Cu and Fe), flavonoids, carotenoids, and terpenes for developing bees (Winston et al., 1987; Almaraz-Abarca et al., 2007; Campos et al., 2010; Omnia et al., 2014).

Recent increased mortality in bee populations, most notably in both Europe and North America, have prompted concern among beekeepers and scientists alike (Ellis et al., 2010; Potts et al., 2010; vanEngelsdorp and Meixner, 2010). No single cause has been identified for the dramatic losses, but it is generally held that multiple interacting factors are responsible, including pesticides, malnutrition, habitat loss, and pathogens (vanEngelsdorp et al., 2009; Brodschneider and Crailsheim, 2010; vanEngelsdorp and Meixner, 2010; du Rand et al., 2015). Among the screened pathogens in honey bees, viruses such as Deformed Wing Virus (DWV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Sacbrood Virus (SBV), Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), Kashmir Bee Virus (KBV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), and Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) are frequently related to colony weakening and economic damage (Chen and Siede, 2007; Desai and Currie, 2015). In addition, a wide range of pesticides have been proved to induce oxidative stress in honey bees, eventually leading to colony collapse (Papadopoulos et al., 2004; James and Xu, 2012). Weakening of the immune system caused by oxidative stress (including pesticides, malnutrition, and management) can increase the prevalence of pathogens and parasites (e.g., Boncristiani et al., 2012).

Paraquat[®] (1,1-dimethyl-4,4-bipyridium dichloride) is one of the most widely used, non-selective bipyridinium herbicides in the world, especially in developing countries such as China and India (Chen et al., 2010). This herbicide is known as an oxidative-stress inducer in a wide range of

living systems, including honey bees. As such, Paraquat has been frequently applied in laboratorial trials as a model for oxidative stress induction (Farrington et al., 1973; Ilett et al., 1974; Angelova et al., 2005; Dinis-Oliveira et al., 2008; Chen et al., 2010). Despite the fact that Paraquat was considered to be slightly toxic to adult bees (FAO, 2003), Cousin et al. (2013) showed the disruption in larval development of oenocytes at very low concentrations, as well as DNA damage (Lehmann, 2005; Mannuss et al., 2012).

The honey bee genome encodes 38 different important antioxidants as defense mechanisms against oxidative stress (Corona and Robinson, 2006). That defense system includes, among others, superoxide dismutases (SODs), catalase (CAT), glutathione S-transferases (GSTs), and Peroxiredoxins (PRX) (Tang and Tu, 1994; Toba and Aigaki, 2000; Wood et al., 2003a, 2003b; Copley et al., 2004; Corona and Robinson, 2006). Cytochrome P450 (CYP) monooxygenases (P450s) are also an important class of enzymes used by honey bees to metabolize xenobiotics, including phytochemicals (Feyereisen, 2012; Mao et al., 2013).

This research tests the effects of a widely used herbicide on the physiology of honey bees, specifically focusing the effects of Paraquat on the expression of antioxidant-related genes. In doing so, we simultaneously identify the dynamics of pathogen prevalence when bees are exposed to different concentrations of Paraquat. Finally, we investigate the effect of pollen (added to the diet of tested bees) on both oxidative stress and pathogen loads.

2. Material and Methods

2.1 Bees sampling and experimental design

We obtained European honey bee workers from a single colony to control for genotype, which was maintained at the North Carolina State University Lake Wheeler Honey Bee Research Facility (Raleigh, North Carolina, USA; 35.7806° N, 78.6389° W). We performed the experiments on worker bees that were newly emerging from brood cells. Immediately after sampling, we placed 20 bees inside individual plastic cages ('holding cages') and then placed them in an incubator at temperatures near to brood nest conditions (34 °C and ~50% RH). Importantly, we selected only bees that did not have any Varroa mites on them as well as no visual symptoms of viral diseases (such as wing deformities). We established eight treatment groups according to the concentration of Paraquat added to a 50% sucrose solution and

availability of bee bread (fermented pollen collected from the same colony where the emerging bees were sampled). We collected the bee bread with forceps directly from the cells of a common colony, placed it into multiple Eppendorf[®] tubes (1.5 ml) with their lids removed, and placed them inside each holding cage as an additional feeder.

We established eight treatment groups following a 4x2 design, testing four different concentrations of Paraquat (0-30 µg/bee) each with and without beebread. We provided all treatments one feeder containing 50% sucrose solution *ad libitum* but only the even-numbered holding cages received an additional feeder containing bee bread *ad libitum*. Therefore, Control groups 1 (without bee bread) and 2 (with bee bread) received no Paraquat in their sucrose solution, Treatment groups 1 (without bee bread) and 2 (with bee bread) had 10 µg/bee of Paraquat added to their sucrose solution, Treatment groups 3 (without bee bread) and 4 (with bee bread) had 20 µg/bee of Paraquat in their sucrose solution, and Treatment groups 5 (without bee bread) and 6 (with bee bread) had 30 µg/bee of Paraquat. These concentrations of Paraquat were chosen based on an LD₅₀ of 26.3 µg/bee after 72 hours of exposure (FAO, 2003).

After 72 hours in their holding cage, we collected the tested bees, flash-froze them in liquid nitrogen, and stored them at -80 °C until further processing. We conducted the field experiments from August to September 2015, and we repeated all treatments three times each.

2.2 RNA isolation, cDNA synthesis and qPCR methods

We followed RNA extraction and isolation following the methods described by Boncristiani et al. (2012). For each treatment group, we homogenized a total of 10 frozen bees together in a plastic bag with 4000 µl Trizol (Invitrogen, USA). Immediately after homogenization, we took 500 µl of homogenate and added 500 µl Trizol and proceeded with total RNA extraction following the manufacturer specifications. We verified the total RNA recovered from each sample for RNA integrity and diluted to standardized amount of 200 ng/µl RNA on a Nanodrop.

We generated cDNA from 1600 ng (8 µl at 200 ng/µl) of total RNA using a mix of 4 µL Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), 2 nmol of dNTP (deoxyribo- nucleotide triphosphate), and a composite of 2 nmol of poly dT-18 and 0.1 nmol of poly dT(12–18) (Gregorc et al., 2012). Each cDNA sample was diluted with water to a total of 75 µl. We

designed primer pairs to amplify 70–244 bp sections of 17 honey bee genes and 11 pathogens (Supplementary material 1).

We followed standard RT-qPCR protocols (StepOnePlus Real-Time PCR Systems; Applied Biosystems) to measure the expression of oxidative stress related genes and pathogen loads. We conducted the qPCR assays in 96-well plates using 1 µl reaction of cDNA from each of the tested samples as a template for 10 µl qPCR reactions using SYBR green technology (Power SYBR Green Master Mix; Invitrogen) following the manufacturer protocols. We conducted the reactions under thermal protocols of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of a two-step protocol that involves 95 °C for 15s, 59-63 °C for 30s, followed by a melt-curve dissociation analysis to confirm product specificity as in Evans et al. (2006).

2.3 Targets and primers

We analyzed the oxidative stress-related genes Catalase (CAT), Cytochrome P450s (CYP6S3, CYP9Q2), Glutathione S-transferases (GSTD1, GSTS3, GSTS4), Superoxide dismutase (SOD1, SOD2), Peroxiredoxins (PRX5, TPX1, TPX3, TPX4 and TPX5), and Vitellogenin (VG) (Supplementary material 1). Similarly, we screened the viral pathogens Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Deformed Wing Virus subtypes A and B (DWV-A, DWV-B). The subtype B is a closely related virus also known as Varroa destructor Virus (VDV-1) (Erban et al., 2015), Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), Kashmiri Bee Virus (KBV), Lake Sinai Virus (LSV), Sacbrood Virus (SBV), (Supplementary material 1). We also screened the tested bees for the presence of the microsporidian *Nosema* and Trypanosomatid species (*N. apis* and *N. ceranae*, and *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*, respectively). We included four housekeeping genes as controls: Actin (β -actin), Elongation factor (E2F), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and *Apis* noncoding RNA-1 (ANCR1).

2.4 Normalization of the real-time data and statistical analysis

The amplification results were expressed as the threshold cycle number, representing the number of cycles needed to generate a fluorescent signal greater than a pre-defined threshold. In order to accurately measure the level of expression, we normalized each to the four reference genes (β -actin, Ancr1, E2F, and GAPDH) using geNorm (Vandesompele et al. 2002). For display

purposes, we median-normalized transcript abundance values ($CT_{controls} - CT_{target}$) for each gene across each panel of genes and present them as relative scale values using JMP 9 software (SAS Institute Inc., 2009). To evaluate the variation in gene transcript levels among different treatments, we used two-way ANOVA. Data that did not meet the requirement of normal distribution were log₁₀ transformed. We applied a Cox survival test, and we performed post hoc pairwise comparisons using Tukey tests. All P values <0.05 were considered significant and all tests were two-tailed.

3. Results

3.1 Survival analysis

Bee mortality was significantly different among the different treatments tested according to the survival statistics (Wilcoxon – Gehan: 495.905; df= 7; P< 0.001) (Fig. 1). The Cox’s regression model also showed significantly higher rates of survival when bee bread was present in the diet of tested bees (B= 1.206, Exp. B= 0.508; Wald= 138.687, df= 1, P< 0.001). The exposure to Paraquat showed a negative effect on survival; when 10 µg/bee of Paraquat was added to the sucrose solution, we observed a significant reduction of survival (B= -0.677, Exp. B= 3.339; Wald= 28.252, df= 3, P< 0.001). Similar results were observed for bees exposed to 30 µg/l of Paraquat (B= -0.840, Exp. B= 0.432; Wald= 38.938, df= 3, P< 0.001).

The pairwise comparison among the survival curves demonstrates that the control group 1 had a higher survival rate than all the treatment groups (respectively: vs Control 2: Wilcoxon - Gehan= 4.291; df= 1; P= 0.038; vs Treatment 1: 132.619; 1; < 0.001; vs Treatment 2: 37.078, 1, < 0.001; vs Treatment 3: 61.936, 1, < 0.001; vs Treatment 4: 12.643, 1, < 0.001; vs Treatment 5: 161.755, 1, < 0.001; vs Treatment 6: 9.602, 1, 0.002). Control group 2 also presented higher survival rates than most of the treatment groups (respectively: vs Control 1: Wilcoxon - Gehan= 4.291; df= 1; P= 0.038; vs Treatment 1: 99.503; 1; < 0.001; vs Treatment 2: 13.413, 1, < 0.001; vs Treatment 3: 35.002, 1, < 0.001; vs Treatment 4: 0.251, 1, 0.616; vs Treatment 5: 132.255, 1, < 0.001; vs Treatment 6: 0.541, 1, 0.462). Pairwise comparisons also showed that the mortality rates were higher in treatments with higher concentrations of Paraquat, as well as in treatments in which the pollen was not present (Table 1).

In a multiple regression analysis of the expression of oxidative stress-related genes and viral loads, we observed that six were statistically significant and correlated (Pearson's index) to the mortality observed among tested bees (CYP6S3: -0.676, $P < 0.001$; GSTS4: -0.405, $P = 0.025$; PRX5: -0.345, $P = 0.049$; SOD2: -0.448, $P = 0.014$; VG: -0.413, $P = 0.022$; *Nosema*: 0.407, $P = 0.024$). The tested model was statistically significant for explaining the observed variation ($Z = 34.569$, $P = 0.028$; $R^2 = 0.997$, R^2 adjusted = 0.968). Those data, as expected, showed that the mortality rates were negatively correlated to the expression of antioxidant related genes as well as positively correlated to the loads of pathogens such *Nosema sp.*

3.2 Oxidative stress

Among the 14 detoxification-related genes screened, five showed significant responses to Paraquat exposure. The expression of CYP6S3 was significantly influenced by the feeding regime ($F = 14.210$; $P = 0.001$; $DF = 1$; 16), such that honey bees that were fed bee bread presented a higher expression. The concentration of Paraquat did not significantly influence the relative expression of CYP6S3 ($F = 2.019$; $P = 0.151$; $DF = 3$; 16), as well as the interaction between feeding regime and concentration of herbicide ($F = 1.188$; $P = 0.345$; $DF = 3$; 16). The SOD2 expression also was affected by the feeding regime ($F = 9.583$; $P = 0.006$) but was neither affected by Paraquat concentration ($F = 1.964$; $P = 0.160$) nor the interaction between the two variables ($F = 0.909$; $P = 0.458$). The expression of VG, as with the above genes, also was highly influenced by the feeding regime ($F = 14.680$; $P = 0.001$) but was not affected by the interaction of feeding and Paraquat concentration ($F = 1.296$; $P = 0.3090$) or the concentration of Paraquat ($F = 2.395$; $P = 0.106$) (Fig. 2).

The expression of two genes, PRX5 and SOD1, were affected by the concentration of Paraquat (Fig. 3), and GSTS4 was affected by both Paraquat concentration and feeding regime (Fig. 4). The expression of GSTS4 was statistically affected by the feeding regime ($F = 6.627$; $P = 0.020$), as well as the concentration of Paraquat ($F = 3.543$; $P = 0.038$). Once again, the expression of this gene was not influenced by the interaction of feeding regime and concentration of Paraquat ($F = 1.473$; $P = 0.259$).

CAT did not show a statistically significant change during treatment. The expression of PRX5 was significantly affected only by the concentration of Paraquat ($F = 3.543$; $P = 0.038$). The

interaction between the variables tested and the feeding regime did not show significant effects on expression (respectively: $F= 0.113$, $P= 0.950$; $F= 0.851$, $P= 0.369$). Similar results were observed on the tests concerning the gene SOD1. The expression of this gene was significantly affected by the different concentrations of Paraquat added to the sucrose solution ($F= 5.141$; $P= 0.011$).

3.3 Pathogens loads

In the initial screening of 11 pathogen targets (ABPV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, LSV, SBV, VDV, *Nosema sp.*, and trypanosomic species), only 7 showed positive signals by qPCR, including BQCV, CBPV, DWV, IAPV, SBV, *Nosema sp.*, and trypanosomic species.

BQCV was detected less frequently during this study, when compared to other pathogens screened; of the 24 groups sampled, 11 presented the virus. Loads for BQCV were not statistically related to either feeding regime ($F= 0.458$; $P= 0.0508$; $DF= 3$; 16), Paraquat concentration ($F= 1.444$; $P= 0.267$; $DF= 3$; 16), or the interaction between the two ($F= 0.460$; $P= 0.713$; $DF= 3$; 16). Similar results were obtained for the loads of CBPV (feeding regime: $F= 1.291$; $P= 0.272$; Paraquat concentration: $F= 2.870$; $P= 0.069$; Interaction: $F= 0.572$; $P= 0.641$).

The two-way ANOVA showed a significant effect of pollen on the prevalence of three pathogens. Honey bees provided with fermented pollen showed the lowest loads of IAPV in almost all the treatments ($F= 6.806$, $P= 0.019$; $DF= 1$, 16) (Fig. 4). In Control group 2, the bees showed significant lower loads of IAPV when compared to honey bees fed with only sucrose solution (0.227 to 2.400 95% CL). The interaction between the feeding regime and Paraquat concentration was likewise significant ($F= 3.948$; $P= 0.027$, $DF= 3$, 16).

A significant effect of bee bread was also observed on *Nosema* spp loads ($F= 15.610$; $P= 0.001$, $DF= 1$, 16). All the tests performed in pollen-fed honey bees showed lower loads of *Nosema* when compared to bees fed only with sucrose solution. A similar effect was also observed for the loads of trypanosomid species ($F= 7.895$; $P= 0.012$, $DF= 1$, 16) (Fig. 5).

Detection of DWV was the highest among all the pathogens screened and was ubiquitous in all samples. The loads of the virus were higher with increasing concentrations of Paraquat ($F= 10.990$; $P< 0.001$, $DF= 3$; 16). Honey bees fed with sucrose solution with no Paraquat added

(controls) presented significantly lower loads of DWV when compared to the ones treated with Paraquat at 20 µg/bee (-1.333 to -0.60, 95% CL of difference). The loads of SBV were also affected by the concentration of Paraquat applied ($F= 4.251$, $P= 0.021$; $DF= 3, 16$). The interaction of the feeding regime and Paraquat concentration was likewise significant ($F= 8.261$, $P= 0.001$; $DF= 3, 16$).

4. Discussion

Our study indicates that honey bee survival is significantly affected by both Paraquat concentration and presence of fermented pollen during early adulthood. Higher Paraquat concentrations were associated with higher mortality rates, which can possibly be explained by changes in the expression of several genes related to oxidative stress defense, such PRX5, SOD1, and GSTS4. Glutathione S-transferase is an important gene for preventing mortality from Paraquat exposure. GSTs are multifunctional proteins essential for xenobiotic metabolism and protection against peroxidative damage (Corona and Robinson, 2006). These enzymes are involved in the detoxification of a wide variety of toxic compounds by conjugating them to glutathione and thus facilitating their removal from the organism (Jakoby, 1985; Lee, 1991; Weirich et al., 2002). Another important antioxidant related gene, PRX5, was also down-regulated when bees were exposed to Paraquat, and it was significantly associated with their survival. As a Peroxiredoxin, the major function of PRX5 is for cellular protection against oxidative stress, modulation of intracellular signaling cascades, regulation of cell proliferation, and phospholipid metabolism (Chen et al., 2000; Wood et al., 2003a, 2003b; Nevalainen, 2010; Poole et al., 2011; Jarvis et al., 2012; Manevich et al., 2013; Huaxia et al., 2015). The reduced expression of such an important gene for cell function and antioxidant protection is, quite evidently, a key factor explaining the reduced survival. Nonetheless, little information can be found regarding the specific role of PRX in xenobiotic detoxification, as well as resistance of honey bees to these pesticides. This is the first indication of a role of PRX5 in reducing oxidative stress induced by Paraquat. Since no correlation was found between the presence of pollen and the expression of PRX5, there is no evidence to assert that pollen is able to reduce mortality in bees exposed to Paraquat through the Peroxiredoxins pathway. Further studies would be

important to clarify the role of this gene on the detoxification of pesticides by honey bees as well as a potential biomarker linked to Paraquat exposure.

The titers of pathogens, most notably DWV, were also significantly affected by Paraquat exposure, which is highly concerning because DWV is present in honey bees globally (Wilfert et al., 2016). This picorna-like virus (family Iflaviridae) is characterized by causing malformations in bees, which emerge with deformed wings, bloated and shortened abdomens, and discoloration (Genersch and Aubert, 2010). The ectoparasitic mite *Varroa destructor* plays a key role in the transmission, pathology, and virulence of DWV (Bowen-Walker et al., 1999; Nordstrom et al., 1999; Tentcheva et al., 2004; Gauthier et al., 2007; Yang et al., 2007; Santillán-Galicia et al., 2008; Gisder et al., 2009; Genersch and Aubert, 2010), and the prevalence of this pathogen may be a fundamental factor for winter survival. Higher loads of the virus were detected in increasingly higher concentrations of Paraquat (except for the 30 µg/bee Paraquat-fed group). It is possible that Paraquat acts similarly to *V. destructor*, immunologically suppressing honey bees and promoting an internal host environment favorable to the replication of this virus. Likewise, the SBV prevalence was significantly affected by Paraquat exposure. SBV is known for affecting the developing brood of honey bees, but it has also been reported to infect adult honey bees without any overt symptoms (Gauthier et al., 2007; Dainat et al., 2012; Amiri et al., 2015). Amiri et al. (2015) reports that SBV was present in 75% of sick colonies in Denmark, and that its prevalence is linked to stress at the colony level (Amiri et al., 2015). Again, the oxidative stress as a result of Paraquat exposure may be prompting the replication and prevalence of such viral pathogens.

The cationic characteristics of Paraquat results in high solubility in water (620 g/L) and high mobility in the environment (Concenza, 2012). Thus, this herbicide can be found in bodies of water as a result of infiltration from soil or following its application in agricultural plantings (Nanseu-Njiki et al., 2010). Considering the physicochemical features of Paraquat, as well as the results observed by this study at low doses (including dosages under the oral LD₅₀ according to FAO, 2003), we suggest that Paraquat is potentially hazardous for honey bee, especially in those areas where this herbicide is still used. The reduced mortality rates observed when pollen was added to the diet of the tested bees is an important finding of our study. The mitigating effects of pollen may be used to protect honey bees, as well as foster a discussion about how availability of

pollen for bees on the environment is critical for their ability to withstand environmental stressors. Much research has been reported on the ingestion of pollen as a means of reducing honey bee susceptibility to pesticides and pathogens, which may result in part from the up-regulation of nutrient-sensing and metabolic pathways (Alaux et al., 2010, 2011; Mao et al., 2013). Some constituents of pollen are suggested to be responsible for this up-regulation, such as p-coumaric acid (a component of sporopollenin that comprises the outer wall of pollen grains) and Coenzyme q10 (CoQ10; a lipid-soluble endogenous pro-vitamin found naturally in the mitochondria) (Wehling et al., 1989; Jiang et al., 2004; Alaux et al., 2011; Xue et al., 2012; Mao et al., 2013; Strachecka et al., 2014;). Among the genes associated with the improved survival of bees exposed to Paraquat, Vitellogenin was one of the most significant. This protein is a common yolk precursor in several oviparous taxa (Brandt et al., 2005). The presence of this protein in hemolymph is nutritionally regulated and consequently frequent in young worker bees (specially for the development of the hypopharyngeal glands and production of royal jelly in nurse bees), well-fed older worker bees, and queens (Amdam et al., 2003, 2004; Seehuus et al., 2006; Corona et al., 2007; Alaux et al., 2011; Ament, 2011; Johnson, 2015). Seehuus et al. (2006) also reported that Vitellogenin was able to reduce oxidative stress by scavenging free radicals, extending the life of bees previously injected with Paraquat. Because vitellogenin expression is nutritionally linked, the presence of pollen must be considered essential for the up-regulation of this effective enzyme to mitigate the harmful effects of Paraquat. The presence of pollen also up-regulated other ROS scavenging related genes (such as CYP6S3, GSTS4, and SOD2), which probably lead to general reduced oxidative stress. The positive interaction among pollen and increased expression GSTs is probably a key factor in the improved survival of bees exposed to Paraquat, as GSTS4 seems to play an important role on reducing the specific mechanisms of oxidative stress promoted by this herbicide (Hayaoka and Gauterman, 1982; Kostaropoulos et al., 2001). CYP6S3 was also statistically correlated with the increased survival in tested bees. This gene is one of the P450s and is part of the CYP3 clade, which is commonly involved in insecticide detoxification (Claudianos et al., 2006) and has known functions including insecticide metabolism and resistance in several insects (Berenbaum, 2002; Feyereisen, 2012). The gene responsible for the expression of SOD2 was also up-regulated in the presence of pollen. SODs convert radical superoxides to oxygen and hydrogen peroxide, providing the first line of defense against ROS produced in mitochondria. Our results is in accordance with those

observed by previous researchers (Alaux et al., 2011; Strachecka et al., 2014; Wang et al., 2014) in which SODs were up-regulated in bees fed with pollen or specific pollen constituents (e.g., CoQ10).

The improved survival promoted by pollen seems also to be immune related, as the loads of *Nosema* were significantly correlated to mortality rate. *Nosema* species (*N. ceranae* and *N. apis* Zander) are intracellular endoparasites of adult honey bees infecting the epithelial cells of the midgut (Forsgren and Fries, 2010). This endoparasite is also able to affect the metabolism, enzyme secretion, protein content of hypopharyngeal glands, and levels of fatty acids and vitellogenin in hemolymph (Suwannapong et al., 2010; Alaux et al., 2011; Chaimanee et al., 2012; Goblirsch et al., 2013; Bahreini and Currie, 2015). Antunez et al. (2009) and Di Paquali et al. (2013) also report the immune suppression caused by Nosemosis, which may decrease resistance against other pathogens (including viruses) and abiotic stressors. *Nosema* has been frequently related to colony losses in USA and Europe (Cox-Foster et al., 2007; Oldroyd, 2007; vanEngelsdorp et al., 2007; Higes et al., 2008; Higes, 2010; reviewed in Genersch et al., 2010). Pollen feeding was also able to reduce the loads of IAPV and trypanosome species. IAPV has been correlated with colony losses in the US (Cox-Foster et al., 2007; Michaud et al., 2015), being detected at low titers in honey bee population in the absence of obvious clinical symptoms (Hung et al., 1996; Chen and Evans, 2007; Genersch and Aubert, 2010). Genersch and Aubert (2010) also discuss that in occasions when the immune system of the host is suppressed (as well as in the presence of oxidative stress or nutritional stress), several honey bee viruses (including the IAPV) elevate their titers and can become extremely virulent. It is known that pollen can be an important immune effector, helping honey bees to safeguard themselves against pathogens (Mello and Silva-Filho, 2002; Chen et al., 2007; Munch et al., 2008, Strachecka et al., 2014), and the current findings underscores this significant association.

5. Conclusions

The identification of potential biomarkers related to exposure of different types of xenobiotics is a crucial step in assessing individual and environmental health of honey bees. This research observed significant changes to the expression of several antioxidant-related genes in the presence of Paraquat. PRX5, SOD2, and GSTS4 are responsible for regulating important physiological processes that may, in turn, affect the health and survival of honey bees as well the

response to pathogens. Paraquat was significantly related to increased loads of pathogens such as Nosema, DWV, and SBV. This research also highlights the mitigating effects of pollen on reducing oxidative stress and improving survival of bees exposed to Paraquat through the up-regulation of anti-oxidant genes such as CYPs, SODs, VG, and GSTs, as well as lower loads of IAPV, *Nosema sp.*, and trypanosome species. It is paramount, therefore, to consider the nutrition of honey bees, especially the availability of pollen, when addressing the colony losses chronically reported in USA and Europe. Clearly, more research is required to fully elucidate the role of pollen availability on colony losses, but this research brings to light important information about the potential mitigating effect of pollen on reducing damage of both herbicide exposure and pathogen infection. This indicates that pollen is an antioxidant and immune effector, as well as a key factor in the maintenance of honey bee's health worldwide.

6. Acknowledgements

This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, as well as USDA-APHIS grant 14-8130-0360-CA. We thank Jennifer Keller for her technical support in the field, and Dr. Michael Simone-Finstrom and Dr. Margarita Lopez-Uribe for valuable comments on the experimental design.

7. References

- Ahmad, M., Korayem, Mohamed. M., Khodairy, Abdel-Aal, A. Abdel-Aal, Ayman A.M. El-Sonbaty, A.A.M., 2012. The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. J. Biol. Earth. Sci., B93-B109.
- Alaux, C., Ducloz F., Crauser, D., Le Conte, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. Biology Letters, 6, 562 - 565.
- Alaux. C., Dantec, C., Parrinello, H., Le Conte, Y., 2011. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. BMC Genomics, 12, 496–509.

383 Ali, S., Jain, S.K., Abdulla, M., and Athar, M., 1996. Paraquat induced DNA damage by reactive
 384 oxygen species. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 39, 63–67.

385 Almaraz-Abarca, N., Campos, M.G., Ávila-Reyes, J.A., Naranjo-Jimenez, N., Corral, J.H.,
 386 González-Valdez, L.S., 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral
 387 honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae) *Journal of Food*
 388 *Composition and Analysis*, 20, 119–124.

389 Amdam, G.V., Norberg, K., Fondrk, M.K., Page Jr., R.E., 2004. Reproductive ground plan may
 390 mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc Natl*
 391 *Acad Sci U S A*, 101, 11350-11355.

392 Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2003. Social exploitation of vitellogenin.
 393 *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100,: 1799-1802.

394 Ament, S.A., Chan, Q.W., Wheeler, M.M., Nixon, S.E., Johnson, S.P., et al. 2011. Mechanisms
 395 of stable lipid loss in a social insect. *J. Exp. Biol.*, 214, 3808-3821.

396 Amiri, E., Meixner, M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2015. Four Categories of Viral Infection
 397 Describe the Health Status of Honey Bee Colonies. *PLoS ONE*, 10, e0140272.

398 Angelova, M.B., Pashova, S.B., Spasova, B.K., Vassilev, S.V., Slokoska, L.S., 2005. Oxidative
 399 stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and Pparaquat. *Mycol.*
 400 *Res.*, 109, 150–158.

401 Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., and Higes, M., 2009.
 402 Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae*
 403 (Microsporidia). *Environ. Microbiol.*, 11, 2284–2290.

404 Bahreini, R., Currie, R.W., 2015. The influence of *Nosema* (Microspora: Nosematidae) infection
 405 on honey bee (Hymenoptera: Apidae) defense against *Varroa destructor* (Mesostigmata:
 406 Varroidae). *J. Invertebr. Pathol.* *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 57–65.

407 Berenbaum, M.R., 2002. Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological
 408 interactions. *J. Chem. Ecol.*, 28, 873– 896.

409 Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J., vanEngelsdorp, D., 2012.
 410 Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis*
 411 *mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* *Journal of Insect Physiology*, 58, 613–620.

412 Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J., Gunn, A., 1999. The transmission of deformed wing virus
413 between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud., J.
414 Invertebr. Pathol., (1999) 73, 101–106.

415 Brandt, B.W., Zwaan, B.J., Beekman, M., Westendorp, R.G.J., Slagboom, P.E., (2005.) Shuttling
416 between species for pathways of lifespan regulation: A central role for the vitellogenin gene
417 family?. Bioessays, 27, 339–346.

418 Brodschneider, R., Crailsheim, K., 2010. Nutrition and health in honey bees. Apidologie, 41,
419 278-294.

420 Campos, M., Frigerio, C., Lopes, J., Bogdanov, S., 2010, What is the future of Bee-Pollen? J.
421 ApiProduct ApiMedical Sci., 2, 131–144.

422 Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2012. Differential
423 expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema*
424 *ceranae*. J. Insect. Physiol. 58, 1090–1095.

425 Chen, C.Y., Milbury, P.E., Collins, F.W., Blumberg, J.B., 2007. Avenanthramides are
426 bioavailable and have antioxidant activity in humans after acute consumption of an enriched
427 mixture from oats. J. Nutr., 137, 1375–1382.

428 Chen, J.W., Dodia, C., Feinstein, S.I., Jain, M.K., Fisher, A.B., 2000. 1-Cys peroxiredoxin, a
429 bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. J. Biol.
430 Chem., 275, 28421–28427.

431 Chen, Q., Niu, Y., Zhang, R., Guo, H., Gao, Y., et al., 2010. The toxic influence of Paraquat on
432 hippocampus of mice: Involvement of oxidative stress. Neuro Toxicology, 31, 310–316.

433 Chen, Y.P., Evans, J.D., 2007. Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United
434 States, Am. Bee J., 147, 1027–1028.

435 Chen, Y.P., Siede, R., 2007. Honey bee viruses. Adv. Virus Res., 70, 33–80.

436 Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R.,
437 Feyereisen, R., Oakeshott, J.G., 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity
438 and environmental response in the honeybee. Insect Molecular Biology, 15, 615–636.

439 Copley, S.D., Novak, W.R.P., Babbitt, P.C. 2004. Divergence of Function in the Thioredoxin
440 Fold Suprafamily: Evidence for Evolution of Peroxiredoxins from a Thioredoxin-like
441 Ancestor. Biochemistry 2004, 43, 13981-13995.

442 Corona, M., Robinson, G. E., 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation
443 and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15, 687–701.

444 Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., et al. 2007. Vitellogenin,
445 juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
446 *USA*, 104, 7128–7133.

447 Cousin, M., Silva-Zacarin, E., Kretzschmar, A., El-Maataoui, M., Brunet, J.L., Belzunces, L.P.,
448 2013. Size Changes in Honey Bee Larvae Oenocytes Induced by Exposure to Paraquat at Very
449 Low Concentrations. *PLoS ONE* 8, e65693.

450 Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L.,
451 Briese, T., Hornig, M., et al., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony
452 collapse disorder. *Science* 318, 283–287.

453 Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012. Predictive markers of
454 honey bee colony collapse. *PLoS One*, 7, e32151. doi: 10.1371/journal.pone.0032151

455 Delaplane, K.S., Mayer, D.F., 2000. *Crop Pollination by Bees*. CABI Publishing, New York,
456 NY, USA, 344pp.

457 Desai, S.D., and Currie, R.W., 2015. Genetic diversity within honey bee colonies affects
458 pathogen load and relative virus levels in honey bees, *Apis mellifera* L. *Behav. Ecol.*
459 *Sociobiol.*, 69, 1527–1541.

460 Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., et al., 2013.
461 Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter?
462 *PLoS One*, 8, e72016.

463 Dinis-Oliveira, R.J., Duarte, J.A., Sánchez-Navarro, A., Remião, F., Bastos, M. L., Carvalho, F.,
464 2008. Critical. Paraquat Poisonings: Mechanisms of Lung Toxicity, Clinical Features, and
465 Treatment. *Reviews in Toxicology*, 38, 13–71, 2008

466 du Rand, E.E., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk Z.W.W., Nicolson, S.W., 2015.
467 Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary
468 nicotine. *Scientific Reports*, 5, 11779.

469 Ellis, J.D., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2010. Colony losses, managed colony population decline, and
470 colony collapse disorder in the United States. *J. Api. Res.*, 49, 134–136.

471 Erban, T., Harant, K., Hubalek, M., Vitamvas, P., Kamler, M., Poltronieri, P., Tyl, J., Markovic,
472 M., Titera, D., 2015. In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-

473 complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. Scientific Reports, 5, 13907.
 474 DOI: 10.1038/srep13907.

475 Evans, J., Aronstein, K. A., Chen, Y., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., et al., 2006. Immune
 476 pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. Insect. Mol. Biol., 15, 645–
 477 656.

478 FAO, 2003. FAO Specification and evaluations for agricultural pesticides. Paraquat dichloride,
 479 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride. FAO. 21 p.

480 Farrington, J.A., Ebert, M., Land, E.J., Fletcher, K. 1973. Bipyridylum quaternary salts and
 481 related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen.
 482 Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. Biochimica et Biophysica Acta,
 483 314, 372-381.

484 Feyereisen, R., 2012. Insect CYP genes and P450 enzymes. Insect Molecular Biology and
 485 Biochemistry, ed Gilbert LI (Elsevier/Academic Press, Amsterdam) pp 236–316.

486 Forsgren, E., Fries, I., 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in
 487 individual European honey bees. Veterinary Parasitology, 170, 212–217.

488 Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissiere, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability
 489 of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecol. Econ., 68, 810-821.

490 Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M., 2007.
 491 Edouard, et al. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative
 492 RT-PCR technique. Apidologie, 38, 426–435.

493 Genersch, E., Aubert, A., 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis*
 494 *mellifera* L.) Elke genersch, michel aubert. Vet. Res., 41, 54.

495 Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Buchler, R., Berg, S., Ritter,
 496 W., Muhlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., Rosenkranz, P., 2010. The German bee
 497 monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey
 498 bee colonies. Apidologie, doi: 10.1051/apido/2010014

499 Gisder, S., Aumeier, P., Genersch, E., 2009. Deformed wing virus (DWV): viral load and
 500 replication in mites (*Varroa destructor*). J. Gen. Virol., 90, 463–467.

501 Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., 2013. Physiological and behavioral changes in honey
 502 bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. PLoS ONE, 8, e58165.

Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). J. Insect Physiol., 58, 1042–1049.

Hayaoka, T., Gauterman, W.C., 1982. Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital and pesticides in various housefly strains and its effects on toxicity. Pesticide Biochemistry and Physiology, 17, 113-119.

Huaxia, Y., Wang, F., Yan, Y., Liu, F., Wang, H., Guo, X., Xu, B., 2015. A novel 1-Cys thioredoxin peroxidase gene in *Apis cerana cerana*: characterization of AccTpx4 and its role in oxidative stresses. Cell Stress and Chaperones, 20, 663–672.

Hung, A.C., Shimanuki, H., Knox, D.A., 1996. Inapparent infection of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in the U.S. honey bees. Am. Bee J., 136, 874–876.

Ilett, K.F., Stripp, B., Menard, R.H., Reid, W.D., and Gillette, J.R., 1974. Studies on the mechanism of the lung toxicity of paraquat: Comparison of tissue distribution and some biochemical parameters in rats and rabbits. Toxicol. Appl. Pharmacol., 28, 216– 226.

Jakoby, W.B., 1985. Glutathione transferases: An overview, Methods Enzymol., 113, 495–499.

James, R.R., Xu, J., 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. J. Invertebr. Pathol., 109, 175–182.

Jarvis, R.M., Hughes, S.M., Ledgerwood, E.C., 2012. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells. Free Radic. Biol. Med., 53, 1522– 1530

Jiang, P., Wu, M.H., Zheng, Y.F., Wang, C., Li, Y.H., Xin, J., 2004. Analysis of coenzyme Q10 in human plasma by column-switching liquid chromatography. J. Chromatogr. B., 805, 297– 301.

JMP®, Pro v10.0. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2007.

Johnson, R.M., 2015. Honey Bee Toxicology. Annu. Rev. Entomol., 60, 22.1–22.20

Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. R. Soc. Lond. B., 274, 303-313.

Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. Insect Biochem. Mol. Biol., 31, 313–319.

534 Lee, K., 1991. Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: Induction and
535 inhibition by plant phototoxins and phenols, *Insect Biochem.*, 21, 353–361.

536 Lehmann, A.R. 2005. Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells.
537 *FEBS Lett.*, 579, 873–876.

538 Manevich, Y., Hutchens, S., Tew, K.D., Townsend, D.M., 2013. Allelic variants of glutathione
539 S-transferase P1-1 differentially mediate the peroxidase function of peroxiredoxin VI and alter
540 membrane lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 54, 62–70.

541 Mannuss, A., Trapp, O., and Puchta, H., 2012. Gene regulation in response to DNA damage.
542 *Biochem. Biophys. Acta*, 1819, 154–165.

543 Mao, W., Schuler, M.A., Berenbauma, M.R., 2013. Honey constituents up-regulate
544 detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *PNAS*, 110, 8842–
545 8846.

546 Mello, M., Silva-Filho, M., 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between
547 two distinct defense mechanisms. *Brazilian J. Plant. Physiol.*, 14, 71–81.

548 Michaud, S., Boncristiani Jr., H.F., Gouw, J.W., Strand, M.K., Pettis, J., Rueppell, O., Foster,
549 L.J., 2015. Response of the honey bee (*Apis mellifera*) proteome to Israeli acute paralysis virus
550 (IAPV) infection. *Can. J. Zool.*, 93, 711–720.

551 Munch, D., Amdam, G., Wolschin, F., 2008. Ageing in a eusocial insect: molecular and
552 physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Funct. Ecol.*, 22, 407–421.

553 Nanseu-Njiki, C.P., Dedzo, G.K., Ngameni, E., 2010. Study of the removal of paraquat from
554 aqueous solution by biosorption onto *Ayous (Triplochiton schleroxylon)* sawdust. *Journal of*
555 *Hazardous Materials*, 179, 63–71.

556 Nevalainen, T.J., 2010. 1-Cysteine peroxiredoxin: a dual-function enzyme with peroxidase and
557 acidic Ca²⁺-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie*, 92, 638–644.

558 Nordstrom, S., Fries, I., Aarhus, A., Hansen, H., Korpela, S., 1999. Virus infections in Nordic
559 honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie*, 30, 475–
560 484.

561 Omnia, M.A., Nabila, M.A., Nadia, R.R., 2014. Biochemical effects of propolis and bee pollen
562 in experimentally – induced hyperammonemia in rats. *Benha Veterinary Medical Journal*, 27,
563 8-24.

564 Papadopoulos, A.I., Polemitoua, I., Laifia, P., Yiangoua, A., Tananaki, C., 2004. Glutathione S-
 565 transferase in the insect *Apis mellifera macedonica* kinetic characteristics and effect of stress
 566 on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comput. Biochem. Phys. C.*,
 567 139, 93–97.

568 Poole, L.B., Hall, A., Nelson, K.J., 2011. Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and
 569 redox regulation. *Curr. Protoc. Toxicol.*, 7, Unit7–9.

570 Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., 2010. Global pollinator
 571 declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.*, 25, 345–353.

572 Santillán-Galicia, M.T., Carzaniga, R., Ball, B.V., Alderson, P.G., 2008., Immunolocalization of
 573 deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*, *J. Gen. Virol.*, 89, 1685–1689.

574 Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V., 2006. Reproductive protein
 575 protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
 576 USA, 103, 962–967.

577 Strachecka, A., Olszewski, K., Paleolog, J., Borsuk, G., Bajda, M., 2014. Coenzyme q10
 578 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis*
 579 *mellifera*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 86, 165–179.

580 Suwannapong, G., Maksong, S., Seanbualuang, P., Benbow, M.E., 2010. Experimental infection
 581 of dwarf honeybee with *Nosema ceranae* isolated from *Apis florum* Fabricius 1787: A new
 582 parasite in Thai honeybee. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13, 361–364.

583 Tang, A.H., and Tu, C.P., 1994. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-
 584 transferases D1 and D21. *J. Biol. Chem.*, 269, 27876–27884.

585 Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, et al. (2004) Prevalence and
 586 seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite
 587 populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7185–7191.

588 Toba, G., Aigaki, T., 2000. Disruption of the microsomal glutathione S-transferase-like gene
 589 reduces lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 253, 179–187.

590 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F.,
 591 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging
 592 of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, research0034.1–0034.11.

593 vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., et al., 2009. Colony
 594 Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*, 4, e6481.

- vanEngelsdorp, D., Meixner, M. D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.*, 103, S80–S95.
- Wang, H., Zhang, S.W., Zeng, Z.J., Yan, W.Y., 2014. Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie*, 45, 618–625.
- Wehling, K., Niester, C., Boon, J.J., Willemse, M.T.M., Wiermann, R., 1989. p-Coumaric acid- a monomer in the sporopollenin skeleton. *Planta*, 179, 376-3809.
- Weirich, G. F., Collins, A. M., Williams, V. P., 2002. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33, 3-14.
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H.C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S.J.M., Boots, M., 2016. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science*, 351, 594-597.
- Winston, M.L., 1987. The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, MA
- Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A., 2003a. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, 300, 650– 653.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.R., Poole, L.B., 2003b. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 32-40.
- Xue, X., Zhao, J., Chen, L., Zhou, J., Yue, B., Li, Y., 2012. Analysis of coenzyme Q10 in bee pollen using online cleanup by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography. *Food Chem.*, 133, 573–578.
- Yang, X., Cox-Foster, D., 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge., *Parasitology*, (2007) 134, :405–412.

619 **Table 1.** Pairwise comparison of the survival observed in the different treatments applied.
620 Yellow-shaded treatments are those with bee bread fed *ad lib*, with unshaded treatments not
621 provided bee bread.

	0 µg/bee		10 µg/bee		20 µg/bee		30 µg/bee	
	Control 1	Control 2	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5	Treatment 6
Control 1		0.038	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002
Control 2			< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.616	< 0.001	0.462
Treatment 1				< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.005	< 0.001
Treatment 2					0.005	< 0.001	< 0.001	0.001
Treatment 3						< 0.001	< 0.001	< 0.001
Treatment 4							< 0.001	0.805
Treatment 5								< 0.001
Treatment 6								

622

623

624 **Figure 1.** Survival of honey bees submitted to different treatments.

625

626

627

Fig. 2. Changes in Vitellogenin (VG) gene expression (log10) according to feeding regime (sucrose solution - SS or sucrose solution and bee bread - SS + BB) and concentration of Paraquat added to sucrose solution.

Fig. 3. Changes in mean transcript abundance for target genes analyzed according to feeding regime (sucrose solution - SS or sucrose solution and bee bread - SS + BB) and concentration of Paraquat added to sucrose solution.

Paraquat concentration (µg/bee)

Figure 4. Changes in mean transcript abundance for target genes analyzed according to feeding regime (sucrose solution - SS or sucrose solution and bee bread - SS + BB) and concentration of Paraquat added to sucrose solution.

Paraquat concentration ($\mu\text{g}/\text{bee}$)

Figure 5. Changes in the abundance of viral pathogens according to feeding regime (sucrose solution - SS or sucrose solution and bee bread - SS + BB) and concentration of Paraquat added to sucrose solution.

Fig. 6. Changes in the abundance of pathogens according to feeding regime (sucrose solution - SS or sucrose solution and bee bread - SS + BB) and concentration of Paraquat added to sucrose solution ($\mu\text{g}/\text{bee}$).

TARGET	5'- 3' SEQUENCE (Forward/Reverse)	TARGET	5'- 3' SEQUENCE (Forward/Reverse)
GSTD1	GGGGAAAACATATGTGGCAGGG	TPX5	CCAGTTGATTGGAAGATAGGTGAAGAAGT
	AAAGTGAGACAGTGGATACGATGC		ACAGCGGTTGCGATAACAATGCG
GSTS3	AGGGAGGCGAGCAAGTAGTG	ABPV	TCCAAGATTGGAATAAGACAGTTAG
	AGCGGTTGTCTTTCCGTCATT		TTCCATAATGCAAACATTCAAAGATCC
GSTS4	TGGGATTAGGAGAACCCATCAGGT	BQCV	CGAAGCGTTTTCCGTGG
	CCGAACGGGGTCGTTGGCTT		GCTGTGAGAGTCAGAGTT
CAT	ATCCACTCATTCTGTGGTAAGTT	CBPV	ACTGCTGCCCTCGATAG
	GCCGGATCGAAGGCTATTGTC		TGTGTTGAGGCAGGTTGG
VG	ACCCAACTGGAACGGGACCT	DWV A	GTCTTGTGGATGAAGGTTATATAACTGG
	GTGGCGGCGGTGTTGAGGAA		TCCGTAGAAAGCCGAGTTG
CYP6S3	GCGTCATTGGAGCGTTACTGTTTCG	IAPV	GCTAATACCAAGACACCAATCACGGACC
	AATTGTTTCGTTTTCTCGGCCAGTG		TCTCGACCCTGAGCATCTGTG
CYP9Q2	GCAAGAGCGTGGAACCGATG	KBV	ACCAACGCGTGTGTTTCCTG
	AGGTGAAGGTGGGCGAAAGCA		ACAAGTGGTTGGTCCCGTCG
SOD1	AAGCAGTGTGCGTTCCTCAGGGT	LSV	TCATCCCAAGAGAACCACT
	TCACGGAATTGGTACTCTCCGGTT		CGCGTGTGCATGGAA
SOD2	AGCTGTCGCCAAAGGTGATGT	SBV	TACGAATCGTGATTCGATTCATT
	GCAGCGTCTGGTTTACCGCC		ACGGGTCTGACGCAAC
PRX5	GTACCAGGAGCTTTTACACCAGGA	DWV B (VDV)	ACCAACGCGTGTGTTTCCTG
	TGTGCTTTACCCCATGCTGCC		ACAAGTGGTTGGTCCCGTCG
TPX1	TTGCCTTTTCTGATCGTGCTGATGA	NOSEMA UNIVERSAL	AGCAGCCGCGGTAATACTTGTTT
	CCACCTTGCTTACGTGGTGTGTT		GTTTCGTCCAGTCAGGGTCGT
TPX3	CAAGAATCTGGAATTGCTTACGAGGC	TRYPANOSOTID spp	GAGTGTGGCAGGACTACCC
	TGTTTCATCTACGCTTCTACCTACTGG		TGCACCAACCACGAAATGA
TPX4	TGGCAAGGAGATTCATGGGTTGT	-	-
	GCCAAACGTCCTAATTCAGTGGTGC		-