

Comportamento higiénico de *Apis Mellifera Iberica* em células de criação de obreiras artificialmente infestadas com o parasita varroa

Hygienic behaviour of *Apis Mellifera Iberica* in brood cells artificially infested with varroa mites

J. M. Flores Serrano¹, S. M. Afonso Pires², F. Puerta Puerta¹

¹ - Centro Andaluz de Apicultura Ecológica. Campus Universitario de Rabanales, 14071. Cordoba - España.
Correio electrónico: ba1pupuf@lucano.uco.es

² - Escola Superior Agrária de Bragança (Departamento de Zootecnia)
Apartado 172, 5300-855 Bragança Codex - Portugal. Correio electrónico: spires@ipb.pt

Resumo: Este estudo teve como objectivo investigar a resposta de colónias de *Apis mellifera iberica*, relativamente a células de obreiras artificialmente infestadas com o parasita varroa, com o fim de aplicar os resultados obtidos no desenvolvimento de técnicas dirigidas à detecção e selecção de abelhas tolerantes ao parasita.

Alvéolos com criação de obreiras de 7 dias após a operculação foram artificialmente infestados com o parasita varroa. A resposta higiénica das abelhas, relativamente a estas células, foi medida num período de 24 horas. As abelhas manifestaram dois comportamentos diferentes. No primeiro, limpavam completamente as células, retirando os ácaros e as crias das abelhas. No segundo, desopercularam e reopercularam os alvéolos, retirando os ácaros, mas a cria permaneceu nas células.

O primeiro destes comportamentos foi mais constante e assegura um maior êxito relativamente à eliminação dos ácaros que se encontram a reproduzir nas células da criação. Os resultados foram analisados com o objectivo de propor futuras técnicas para localizar e seleccionar abelhas tolerantes à varroose.

Palavras-Chave: *Apis mellifera*, comportamento higiénico, tolerante, varroa.

Summary: The objective of this study was to investigate the response of colonies of *Apis mellifera iberica*, relatively to worker brood cells artificially infested with the varroa mite, with the aim of applying the obtained results in the development of techniques directed to the detection and selection of bees tolerant to the mite.

Cells with worker brood, 7 days after operculation were artificially infested with varroa mites. The hygienic behaviour of the bees, relatively to these cells was measured after a period of 24 h. The honeybees demonstrated two different behaviours. In the first, cleaned completely the cells, removing both brood and mites from the cells. In the second, bees uncapped and recapped the cells, removing the mites, but not the brood. The first of these behaviours was more constant than the second and assures a larger success relatively to the removal of the mites reproducing in the brood cells. The results were analysed with the propose of future techniques to localise and select bees tolerant to the mite.

Key-Words: *Apis mellifera*, honeybee, hygienic behaviour, tolerance, varroa.

Introdução

O parasita *Varroa destructor* (Anderson e Trueman, 2000) é um dos principais problemas da patologia apícola ocidental. É um ácaro elipsoidal, de cor castanha avermelhada. No seu ciclo de vida temos que distinguir entre uma fase forética, sobre as abelhas adultas e outra reprodutiva dentro das células de criação operculada (coberta por uma cúpula de cera, sobre a qual se produzirá a metamorfose da abelha). Em ambas as fases o ácaro alimenta-se sugando a hemolinfa do hospedeiro originando graves danos às abelhas. Durante a fase reprodutiva o ácaro produz várias fêmeas e um macho, que fecundará as suas próprias irmãs, de tal forma que quando a nova abelha nasce com ela emergem da célula o parasita progenitor e parte da sua descendência. O ciclo descrito anteriormente sucede-se várias vezes ao longo da vida do parasita, pelo que o crescimento da população é rápido sempre que exista criação disponível.

A presença da varroa tem provocado enormes perdas, obrigando à utilização de tratamentos químicos de síntese para evitar a morte das colmeias e dos apiários. Estes tratamentos têm ajudado a controlar a situação, mas por sua vez têm originado novos problemas, especialmente o aparecimento de resíduos nos produtos apícolas e de resistências do parasita a algumas das moléculas utilizadas (Milani, 1999 e Wallner, 1999). Distintas vias alternativas de luta estão a ser estudadas, entre as quais se destaca a selecção de abelhas tolerantes ao parasita, entendendo-se por tolerância a capacidade que as abelhas têm em conviver com a varroa. No nosso caso concreto, este termo, significa que a população de varroas nas colmeias pode crescer mais lentamente, pelo que se pode prolongar o período entre dois tratamentos ou podem ser tratadas com produtos menos agressivos. Neste sentido, como modelo de trabalho utiliza-se a relação da varroa com o seu hospedeiro originário, a abelha asiática *Apis cerana* Fabr. Entre esta abelha e o ácaro existe um equilíbrio, de tal forma que não existem riscos para a sobrevivência das colónias, e não é necessário o tratamento químico. Uma das características que permitem este equilíbrio é o comportamento higiénico da abelha *Apis cerana*. Esta

espécie é capaz de localizar as células de criação das obreiras onde se introduziu a varroa para se reproduzir, e limpá-las interrompendo o ciclo reprodutivo do parasita (Peng *et al.*, 1987; citados por Buchler, 1994; Boecking e Spivak, 1999 e Rath, 1999). Neste sentido, foram registados dois comportamentos em *Apis cerana*: no comportamento I, as abelhas detectaram e limpam completamente as células parasitadas, retirando os parasitas e a criação das abelhas, enquanto que no comportamento II as abelhas retiraram os parasitas e reopercularam as células, permitindo que prosseguisse o ciclo biológico da criação (Rath e Drescher, 1990; Rosenkranz *et al.*, 1993).

Estes mesmos comportamentos foram descritos na nossa abelha *Apis mellifera* L. (Boecking e Drescher, 1994). Este estudo teve como objectivo investigar a resposta de colónias de *Apis mellifera iberica*, relativamente a células de obreiras artificialmente infestadas por *Varroa destructor*, com o fim de aplicar os resultados no desenvolvimento de técnicas dirigidas à detecção e selecção de abelhas tolerantes ao parasita.

Material e Métodos

Os ensaios foram realizados em Córdoba (Espanha), em dois períodos diferentes do ano de 1999: verão (entre 21/5 a 8/7), coincidindo com as florações do girassol (*Helianthus annuus*) e do eucalipto (*Eucalyptus sp*) e inverno (entre 17/11 a 23/12), coincidindo com um aporte de néctar limitado. Foram utilizadas colónias de *Apis mellifera iberica* (Goetze, 1964), alojadas em colmeias Langstroth com 10 quadros, cobrindo as abelhas entre 9 e 10 quadros no verão e entre 7 e 9 no inverno. Nos ensaios utilizamos células contendo crias de obreiras com 7 dias após a operculação, em estado de pupas brancas, com olhos pardos (Rembold e Kramer, 1980). Para conhecer a idade da cria marcava-se o momento da operculação numa lâmina de plástico transparente, num período máximo de 24 horas. As varroas foram obtidas de abelhas adultas procedentes de colmeias dadoras, altamente parasitadas. Estes ácaros foram capturados utilizando açúcar em pó (Boecking e Ritter, 1993). Foram aplicados 3 tratamentos: no primeiro, células artificialmente infestadas com três varroas vivas; no segundo, que funcionou como o grupo testemunha I, as células foram abertas e fechadas sem introduzir parasitas e no terceiro, que funcionou como o grupo testemunha II, as células não foram manipuladas. Os parasitas foram introduzidos nas células através de uma pequena abertura na parte lateral do opérculo (De Ruijter, 1987; Boecking e Ritter, 1993). Os ensaios realizaram-se em 9 colmeias. Um total de 23 repetições foram efectuadas. Para cada tratamento e cada repetição foram utilizadas 10 células. Em 4 colónias realizaram-se, pelo menos, 3 repetições, nas restantes foram realizadas 1 ou 2. Nos resultados avaliaram-se dois comportamentos: comportamento I, no qual as abelhas limpam completamente as células parasitadas, retirando os parasitas e a criação e comportamento II, no qual as abelhas abriram e fecharam as células, retirando um ou mais parasitas

(no caso do ácaro não ter abandonado as células) mas não a criação. No estudo estatístico utilizaram-se testes não paramétricos. Para comparar os resultados dos diferentes tratamentos aplicamos o teste ANOVA de Friedman quando trabalhamos em simultâneo com os 4 tratamentos, e o teste Wilcoxon matched pairs quando foram comparados 2 a 2. Para estudar a correlação entre os comportamentos I e II aplicamos o Pearson Product Moment Correlation. As diferenças entre estações foram analisadas pelo teste Mann-Whitney U e as diferenças entre colmeias foram analisadas por ANOVA Kruskal-Wallis.

Resultados

Os resultados expressam-se em percentagem média \pm desvio padrão. As abelhas limpam $0,43 \pm 0,43\%$ das células abertas e fechadas sem introduzir os parasitas (testemunhas I), e $2,17 \pm 0,88\%$ das células não manipuladas (testemunhas II). Se considerarmos conjuntamente os comportamentos I e II, $63,63\%$ das células artificialmente infestadas provocaram a resposta das abelhas, das quais $20,55 \pm 4,98\%$ correspondeu ao comportamento I (as abelhas retiraram os parasitas e a criação) e $43,08 \pm 5,41\%$ ao comportamento II (as abelhas retiraram os parasitas, mas não retiraram a criação). Em $68,08 \pm 6,17\%$ das células artificialmente infestadas, em que as abelhas manifestaram o comportamento II (as abelhas retiraram os parasitas e reopercularam as células com criação), permaneceram alguns dos três parasitas depois destas serem reoperculadas. Em relação ao comportamento I, não foram detectadas diferenças significativas entre o grupo testemunha I (células abertas e fechadas não parasitadas) e o II (células não manipuladas) ($p > 0,05$). No entanto, existiram diferenças significativas na resposta higiénica entre as testemunhas I e as células artificialmente infestadas ($p \leq 0,001$) e entre as testemunhas II ($p \leq 0,01$) e as células infestadas. Não existiu correlação estatisticamente significativa entre os comportamentos I e II na resposta das abelhas relativamente às células artificialmente infestadas ($r = -0,09$; $p > 0,05$). A resposta higiénica das abelhas entre os dois períodos em estudo (verão e inverno), foi igual ($p > 0,05$), no que se refere ao comportamento I. Contrariamente, existiram diferenças significativas entre ambas as temporadas quando consideramos o comportamento II ($p \leq 0,01$). De forma similar, não foram observadas diferenças significativas na resposta higiénica das abelhas, entre o verão e o inverno, relativamente às testemunhas I ($p > 0,05$), sendo essas diferenças significativas quando consideramos o grupo testemunhas II ($p \leq 0,05$) (Quadro I). No Quadro II podem ser consultados os valores obtidos nas 4 colmeias, em que foram efectuadas, pelo menos, 3 repetições. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre elas ($p > 0,05$), pode-se comprovar uma grande amplitude de variação na sua resposta e a maior diferença foi observada quando consideramos o comportamento I.

Discussão

Entre a abelha *Apis cerana* (hospedeiro originário do ácaro varroa) e o ácaro *Varroa destructor* existe um equilíbrio, de tal forma que o parasita nunca chega a pôr em perigo a sobrevivência das colónias de abelhas, as quais não necessitam de ser tratadas. Uma das razões que permitem este equilíbrio baseia-se no comportamento higiénico das abelhas relativamente a células de obreiras parasitadas, ou seja, à capacidade das abelhas de detectar e limpar as células da criação de obreiras que se encontram parasitadas pelo ácaro (Peng *et al*, 1987a; Peng *et al*, 1987b; Büchler, 1994; Boecking and Spivak, 1999; Rath, 1999). Este mesmo comportamento foi descrito por Boecking e Spivak, (1999) na abelha *Apis mellifera*, ainda que com uma intensidade menor. No nosso caso, os resultados mostram como o desencadeamento do comportamento higiénico resulta dos parasitas introduzidos e não da manipulação dos opérculos, uma vez que apenas 0,43% das células que se manipularam, mas nas quais não se introduziram parasitas (testemunhas I) foram removidas, comparativamente com 2,17% de células não manipuladas. Por outro lado, na abelha *Apis cerana* descreveram-se dois comportamentos diferentes: as abelhas podem limpar completamente as células parasitadas, retirando os parasitas e a própria criação das abelhas (comportamento I), ou então podem retirar unicamente os parasitas, reoperculando as células e permitindo a sobrevivência da cria das abelhas (comportamento II) (Rath e Drescher, 1990; Rosenkranz *et al.*, 1993). Ambos os comportamentos foram também descritos na abelha *Apis mellifera* (Boecking e Drescher, 1994; Flores *et al.*, 2000), e foram também verificados nos resultados aqui apresentados, ainda que vários aspectos devam ser considerados ao utilizar um ou outro comportamento na avaliação da resposta das abelhas.

- À priori, poderíamos considerar mais interessante o comportamento II, pois as abelhas retiram os parasitas e permitem a sobrevivência da cria. Este comportamento é especialmente interessante, na abelha *Apis cerana*, uma vez que os parasitas que permanecem nos alvéolos com cria de obreiras não conseguem reproduzir-se (Büchler, 1994 e Rath, 1999). O problema coloca-se de forma diferente na abelha *Apis mellifera*, na qual o ácaro consegue reproduzir-se nos alvéolos

com cria de obreiras. Além disso, os nossos resultados mostram como em 68,08% das células parasitadas, abertas e reoperculadas pelas abelhas (comportamento II) permaneceu algum parasita depois da reoperculação. Estes parasitas que permanecem podem completar o seu ciclo, contribuindo, desta forma, para o aumento da população de varroas nas colmeias.

- Por outro lado, seria de esperar que aquelas colónias que apresentaram um elevado grau do comportamento I também o fizessem com o comportamento II e vice-versa. Contrariamente a este facto, não conseguimos encontrar uma correlação significativa quando comparamos os comportamentos I e II nas células artificialmente infestadas com varroas. O que indica que ambos os comportamentos se devem manifestar de forma independente, não sendo possível avaliar um comportamento a partir dos resultados obtidos no outro.
- São de grande interesse os resultados obtidos quando comparamos a resposta higiénica das abelhas nos dois períodos estudados: verão e inverno (Quadro I). Assim, quando consideramos o comportamento I, observamos que foram limpas 24,44% e 18,04% das células infestadas com 3 varroas no verão e inverno respectivamente, não sendo encontradas diferenças estatísticas entre as duas estações ($p > 0,05$). Pelo contrário, não ocorre o mesmo se consideramos o comportamento II, em que 24,44% e 55,06% das células parasitadas foram limpas no verão e inverno respectivamente, existindo claras diferenças quando comparamos a resposta das abelhas entre as duas estações ($p \leq 0,01$), o que indica que este comportamento foi influenciado pela estação do ano e impede comparar colónias avaliadas em diferentes períodos.
- Quando comparamos as 4 colónias testadas, pelo menos, em 3 ocasiões (Quadro II), podemos comprovar que as maiores diferenças foram alcançadas ao considerar o comportamento I. Relativamente, ao comportamento II, as diferenças encontradas são muito mais exíguas, o que nos permite sugerir, uma vez mais, que provavelmente será mais interessante avaliar o comportamento I, quando pretendemos diferenciar colónias, procurando as que apresentam um comportamento higiénico mais eficaz.

Quadro I - Comportamento higiénico da abelha *Apis mellifera iberica* relativamente às células com criação de obreiras artificialmente infestadas com três varroas.

	Células infestadas. Comportamento I	Células infestadas. Comportamento II	Células abertas e fechadas sem parasitas	Células não manipuladas
Verão n=9	24,44±10,29 ^a	24,44±7,47 ^A	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Inverno n=14	18,04±5,09 ^a	55,06±5,59 ^B	0,71±0,71 ^a	3,57±1,33 ^b

Na mesma coluna letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) entre temporadas.

Na mesma coluna letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre temporadas

Quadro II - Comportamento higiénico de 4 colónias de *Apis mellifera iberica* relativamente às células com criação de obreiras artificialmente infestadas com três varroas.

	Número de repetições	Células infestadas. Comportamento I	Células infestadas. Comportamento II
Colónia 1	6	35,19±13,29	41,30±12,27
Colónia 2	3	6,67±6,67	40,00±25,17
Colónia 3	3	6,06±6,06	42,12±14,72
Colónia 4	3	11,11±11,11	45,56±17,88

- Outro factor a ter em atenção é o menor tempo que é necessário utilizar para a avaliação de cada colmeia quando registamos o comportamento I relativamente ao II. Este factor tem grande importância quando queremos testar um número elevado de colónias, sendo possível anotar os resultados deste comportamento no mesmo apiário, apenas com recurso à utilização de folhas de acetato onde foram marcadas as células em estudo. Pelo contrário, para registar os resultados do comportamento II, é necessário, além disso, a utilização da lupa binocular, o que dificulta este tipo de trabalho.
- Finalmente, após todas estas considerações, pensamos que o comportamento I (remoção da criação e parasitas) é o mais interessante para desenvolver técnicas que permitam detectar e seleccionar abelhas tolerantes ao parasita. No entanto, são necessários estudos posteriores para comprovar que as colónias que mostram de uma forma mais evidente este comportamento são as que apresentam um crescimento mais lento da população de parasitas.

Conclusão

Tal como na abelha *Apis cerana*, nas nossas abelhas pudemos observar dois tipos de comportamentos: I) as abelhas limpam completamente as células parasitadas, retirando os parasitas e a criação e II) as abelhas retiraram os parasitas (ou eles abandonaram as células ao serem desoperculadas pelas abelhas) e reopercularam os alvéolos, respeitando a vida da criação.

O comportamento I mostrou-se mais eficaz e apresentou uma menor variabilidade entre estações. Por isso, pensamos que é o comportamento mais adequado para detectar e seleccionar abelhas com alta capacidade higiénica em relação às células com criação de obreiras parasitadas.

São necessárias novas investigações para comprovar que as colónias seleccionadas desta forma são as que apresentam um crescimento mais lento da população de parasitas.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo "Instituto Nacional de Investigación Agraria", no âmbito do Programa

Apícola Nacional Espanhol (projectos API 98-003, API 99-007 Y API 99-008), assim como pelos FUNDOS FEDER (projecto 1FD97-1061).

Bibliografia

- ANDERSON, D.L. & TRUEMAN, J.W.H., (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & Applied Acarology*, 24, 165-189.
- BOECKING, O. & DRESCHER, W. (1994). Rating of signals that trigger *Apis mellifera* L. bees to remove mite-infested brood. *Apidologie*, 25, 459-465.
- BOECKING, O. & RITTER, W. (1993). Grooming and removal behaviour of *Apis mellifera intermissa* in Tunisia against *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 32, 127-134.
- BOECKING, O. & SPIVAK, M (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud.. *Apidologie*, 30, 141-158.
- BÜCHLER, R. (1994). *Varroa* tolerance in honey bees occurrence, characters and breeding. *Bee World*, 75, 54-70.
- DE RUIJTER, A. (1987). Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive brood cycles of the honeybee. *Apidologie*, 18, 321-326.
- FLORES, JM; RUIZ, JA; RUZ, JM; PUERTA, F; CAMPANO, F. (2000). Tolerancia a *Varroa*. El comportamiento higiénico de las abejas. *El Colmenar*, 57, 44-49.
- GOETZE, G. (1964). Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchttause. Paul Parey Hamburg, RFA.
- MILANI, N. (1999). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*, 30, 229-234.
- PENG, YS; FANG, Y; XU, S; GE, L. (1987A). The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49, 54-60.
- PENG, YS; FANG, Y; XU, S; GE, L; NASR, M.E. (1987B). Response of foster Asian honey bee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 49, 256-264.
- RATH, W. (1999). Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud.. *Apidologie*, 30, 97-110.
- RATH, W. & DRESCHER, W. (1990). Response of *Apis cerana* Fabr. towards brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud. and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie*, 21, 311-321.
- REMBOLD, H. & KRÄMER, J.P. (1980). Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Apidologie*, 11, 29-38.
- ROSENKRANZ, R; TEWARSON, N.C.; SINGH, A; ENGELS, W. (1993). Differential hygienic behaviour towards *Varroa jacobsoni* in capped worker brood of *Apis cerana* depends on alien scent adhering to the mites. *Journal of Apicultural Research*, 32 (2), 89-93.
- WALLNER, K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30, 235-248.