

Estudo de alguns métodos usados para avaliar o comportamento higiénico de ecotipos locais de abelhas Portuguesas

Study of some methods used for proving the hygienic behaviour of Portuguese local bee ecotypes

S. M. A. Pires*¹, A. Josa², A. Martins¹, A. Costa¹

¹Escola Superior Agrária de Bragança, Departamento de Zootecnia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança - Portugal

²Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Departamento de Patología Animal, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza - España

Resumo: O comportamento higiénico em colónias da espécie *Apis mellifera* L., de origem Portuguesa foi examinado no sentido de avaliar se estas demonstram um forte instinto de limpeza. Para tal foram aplicadas duas técnicas de campo em 20 colmeias existentes num apiário experimental pertencente à Escola Superior Agrária de Bragança e situada no Nordeste de Portugal. Em ambos os ensaios, interessou a rapidez com que as abelhas detectaram, desopercularam e removeram a criação dos alvéolos. Em ambos os testes controlou-se e registou-se a proporção de criação que foi desoperculada e extraída de ambos os lados de cada quadro, em cada colmeia, às 24 horas, às 48 horas e às 120 horas. O tempo total necessário para a extracção completa de todos os alvéolos com criação morta por congelação foi menor, uma vez que, todas as colónias apresentavam uma remoção completa às 48 horas. Enquanto que o tempo total necessário para a remoção da totalidade da criação morta por punção variou entre 24 horas, com remoção completa, e mais de 72 horas, com extracção incompleta. No entanto, demonstrou-se a eficácia da técnica de morte por punção para a avaliação do comportamento higiénico às 24 horas, dado que, na maioria das colónias estudadas obtivemos um χ^2 significativo ($p < 0,001$).

Palavras-chave: *Apis mellifera*, comportamento higiénico, criação morta por punção, criação morta por congelação

Summary: To study the hygienic behaviour of bees from *Apis mellifera* colonies and to determine which colonies may show a strong cleaning instinct, we have done two cleaning tests in 20 hives of an experimental apiary, owned by Escola Superior Agrária de Bragança, in the North-East part of Portugal. In both tests, we were interested in the speed with which the bees began to uncapped the cells and extracted the prepupae. We monitored and wrote down, in both tests, the proportion of brood, which was uncapped and extracted from both sides of each frame in each hive within 24 hours, 48 hours and 5 days. Within a period of 5 days, 100% of the colonies completed the removal of freeze-killed brood in 48 hours while the time required for removal of all the pin-killed brood varied from 1 day with complete removal to more than three with incomplete extraction. We used the chi-square test to evaluate the hygienic behaviour within 24 hours and obtained a significant χ^2 ($P < 0.001$) in most of the colonies we studied.

Keywords: *Apis mellifera*, hygienic behaviour, pin-killed brood, freeze-killed brood

Introdução

O conceito de comportamento higiénico tem sido referido por vários autores, como Message (1979), Gilliam et al. (1983), Milne (1985a, 1985b), Moritz e Southwick (1992), Spivak et al. (1995) e Kefuss et al. (1996). É definido como a capacidade de algumas abelhas para detectar, desopercular os alvéolos com criação morta e/ou doente e efectuar a sua remoção. Este comportamento é avaliado de acordo com a rapidez de cada colónia para remover uma amostra de criação morta e/ou doente. Kefuss et al. (1996) consideraram que uma colónia era higiénica quando limpava uma amostra de 5x5 cm (2x2 polegadas) de criação morta em menos de 48 horas; aquelas que necessitavam de um período superior não eram consideradas higiénicas. Este é o princípio geral das técnicas utilizadas para avaliar o comportamento higiénico. Porém, existem variações na metodologia utilizada relativas à técnica de morte (por congelação, punção, gás cianídico ou inoculação de determinadas doenças), à área da amostra, ao tempo de congelação, ao tempo de remoção da criação, etc.

O objectivo deste trabalho foi estudar o comportamento higiénico das abelhas locais e determinar quais as colónias que apresentavam um elevado instinto de limpeza, no sentido de as seleccionar e posteriormente desenvolver um programa de selecção e criação de abelhas tolerantes a determinadas patologias.

Materiais e métodos

Local do estudo

Este estudo foi realizado num apiário experimental pertencente à Escola Superior Agrária de Bragança e situado no Parque Natural de Montesinho, com latitude 41°54'46"N e longitude 6°40'12"W. Os ensaios

*Correspondência: spires@ipb.pt
Tel: +351 273303306; Fax: +351 273325405

foram realizados entre o Verão de 1995 e o Verão de 1996. As vinte colónias testadas estavam alojadas em colmeias do modelo Lusitana, um modelo nacional. A origem do apiário é simples uma vez que foi constituído com enxames comprados a apicultores locais, nos quais não existe controlo da fecundação e não se realiza a prática de apicultura migratória ou transumante.

Técnicas de campo para avaliar o comportamento higiénico

A metodologia utilizada baseou-se na aplicação de duas técnicas de campo. Todas as operações executadas foram registadas em fichas para o controlo individual de cada colmeia. A zona de criação foi desenhada em folhas de acetato e os quadros marcados no sentido de proceder à sua identificação.

Técnica de morte de criação por congelação. A técnica de morte da criação por congelação (Técnica 1) consistiu em cortar uma secção quadrada do favo com criação operculada com a medida de 10x10 cm, em cada colmeia (correspondendo aproximadamente a 150 células). Seguindo a metodologia descrita por Newton et al. (1975), essas amostras foram colocadas em sacos de plástico fechados hermeticamente e rotulados com a sua origem e data de recolha, e foram congeladas durante 48 horas. Foi criado um ficheiro para cada colmeia onde se registou todos os dados (origem da colmeia, localização, produtividade, comentários particulares). As amostras foram mantidas a -20 °C e, posteriormente, à temperatura ambiente durante 12 horas, como descrevem Cardenal Galván et al. (1988). Em seguida, as amostras foram inseridas no espaço vazio do quadro, que foi marcado na parte superior e colocado de novo em cada colmeia, respectivamente.

Os quadros seleccionados para os dois ensaios foram quadros típicos de criação com reservas de pólen e mel nas extremidades, e uma área de criação compreendida em cerca de dois terços (2/3) de criação operculada e um terço (1/3) de criação desoperculada em todos os estados. Os alvéolos de criação foram seleccionados na fase de operculação contendo pré-pupas e pupas jovens, sendo a idade determinada pela observação da forma do corpo e cor dos olhos.

Técnica de morte da criação por punção. Ao mesmo tempo, executou-se a segunda técnica (Técnica 2), que consistiu na morte de 21 crias operculadas com um alfinete entomológico, como descreveram Newton e Ostasiewski (1986). Foram mortos por punção três grupos de sete larvas operculadas situadas em diferentes zonas do quadro. Para uma melhor identificação, colocaram-se alfinetes coloridos duas células acima de cada grupo.

Em ambos as técnicas interessava a rapidez com que as abelhas amas iniciam a desoperculação dos alvéolos

e a remoção das pré-pupas e pupas. Assim, registou-se e controlou-se, nos dois ensaios, a quantidade de criação que foi desoperculada e extraída em ambos os lados do quadro, em cada colmeia num período de 24 horas, 48 horas e 120 horas. Para se obter a percentagem de alvéolos desoperculados, dividiu-se o número de alvéolos desoperculados na amostra em cada uma das observações pelo número total de alvéolos operculados inicialmente. A percentagem de criação removida em cada observação, foi calculada pelo quociente entre o número de alvéolos vazios em cada observação e pelo número total de alvéolos inicialmente operculados.

No teste da morte por congelação, para determinar o número de alvéolos inicialmente operculados teve que subtrair-se o número de alvéolos que estavam inicialmente vazios em algumas amostras do quadrado de favo.

Em ambos os ensaios, considerou-se que uma colónia era higiénica quando limpava a criação morta no período de 48 horas. As colónias em que o período de remoção total da criação dos alvéolos era superior a 48 horas, não foram consideradas higiénicas.

Análise estatística

No sentido de comparar as frequências obtidas das técnicas de morte por punção e congelação, para a determinação do comportamento higiénico, usou-se o teste do χ^2 (Snedecor e Cochran, 1980).

Resultados

Os resultados obtidos basearam-se na observação efectuada pela aplicação de ambas as técnicas (morte por punção e congelação), simultaneamente, uma vez que interessava a rapidez com que as abelhas desoperculavam a criação e removiam a criação morta. Também se pretendia avaliar a eficácia das duas técnicas no período de 24 horas.

Para se comparar a eficácia de ambas as técnicas às 24 horas, relativamente ao instinto de limpeza das abelhas amas, usou-se o teste do χ^2 para provar a hipótese nula de que se a danificação das células operculadas estimula o instinto de limpeza das abelhas amas então a resposta destas à criação operculada e morta em ambas as técnicas deveria ser a mesma. Os valores de p encontrados para o χ^2 entre as técnicas estudadas figuram no Quadro 1.

Na maioria das colmeias, obteve-se um resultado significativo ($p < 0,001$; $n=40$) pelo que rejeitamos a hipótese nula; existem diferenças significativas entre as duas técnicas utilizadas e portanto uma é mais eficaz que a outra.

Apesar disso, convém salientar alguns aspectos. Embora tenha sido demonstrada a eficácia da Técnica 2 (morte por punção) na avaliação do comportamento

higiênico no período de 24 horas em quatro das colmeias do apiário (1, 3, 10 e 20), todas as amostras estavam limpas. Por outro lado, também se realça o elevado grau de significância obtido na colmeia 2 ($p < 0,001$), e a similaridade nas frequências obtidas entre as colmeias 6, 8, 13 e 14, verificando-se que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a eficácia de ambas as técnicas, nestas colmeias.

Quadro 1 - Valores do χ^2 e P entre as duas técnicas de limpeza (criação morta por congelamento e criação morta por punção)

Técnica 1/ Técnica 2	χ^2	Valores de P
Colmeia 1	–	–
Colmeia 2	114,961	0,001
Colmeia 3	–	–
Colmeia 4	87,770	0,001
Colmeia 5	46,914	0,001
Colmeia 6	0,113	NS
Colmeia 7	17,921	0,001
Colmeia 8	3,150	NS
Colmeia 9	30,721	0,001
Colmeia 10	–	–
Colmeia 11	24,175	0,001
Colmeia 12	20,275	0,001
Colmeia 13	3,150	NS
Colmeia 14	3,150	NS
Colmeia 15	46,914	0,001
Colmeia 16	4,711	0,005
Colmeia 17	4,253	0,005
Colmeia 18	12,500	0,001
Colmeia 19	32,062	0,001
Colmeia 20	–	–

NS – Não significativo para $p > 0,05$

Discussão

Estes resultados demonstram que na mesma colônia, as obreiras são mais eficientes na remoção de criação morta por punção e coincidem neste ponto com os resultados obtidos por Newton e Ostasiewski (1986), os quais sugerem que esta diferença no tempo de remoção pode ser causada pela técnica usada para matar a criação (uma vez que os processos de morte são distintos) ou pela quantidade de alvéolos a ser limpa.

A nossa opinião relativamente a este aspecto é a de que, provavelmente, a técnica usada na morte da criação por punção pode levar a uma detecção mais rápida da criação morta possivelmente como consequência da perfuração do opérculo e, talvez também, pela perda de fluidos corporais da criação perfurada. Adicionalmente, nesta técnica as abelhas amas apenas necessitam limpar 21 alvéolos, contrariamente ao que ocorre com a utilização da técnica 1, na qual, mediante a congelamento a

criação morre mas, como não existe nenhum orifício no opérculo do alvéolo, as pré-pupas ou jovens pupas permanecem intactas.

Assim, os nossos resultados parecem confirmar a hipótese de que existe uma correlação entre a técnica de punção e o comportamento de desoperculação e remoção, como propuseram Milne (1985b), Newton e Ostasiewski (1986) e Murray (1993). Talvez isto se deva ao efeito do pequeno orifício permitir uma detecção mais rápida dos fluidos corporais.

No entanto, Milne (1985a, 1985b) sugeriu a hipótese de que o pequeno orifício foi feito sem danificar o ocupante, enquanto que Newton e Ostasiewski (1986) afirmaram que o acto de perfurar o opérculo do alvéolo com um alfinete entomológico e matar o ocupante é um procedimento diferente porque o orifício no opérculo permanece após a retirada do alfinete e a pré-pupa no alvéolo pode perder fluido corporal. Para o comprovar, estes autores realizaram dois ensaios e, apesar de não terem obtido uma resposta clara, observaram que existia uma elevada percentagem de remoção da criação desoperculada coberta com hemolinfa.

Estas análises sugerem que a grande variabilidade de resposta que existe entre colônias estudadas reflecte a heterogeneidade genética e fenotípica que enfrentamos ao trabalhar com ecotipos de abelhas locais. O que era de esperar, dado o sistema de manejo do apiário, onde a reprodução ocorre naturalmente sem a intervenção do apicultor, e dado o peculiar sistema de acasalamento inerente da espécie.

Após a avaliação das duas técnicas de limpeza no que respeita à quantidade de criação removida no período de 24 horas, pode-se concluir que a técnica de criação morta por punção é o mais eficiente neste período. No entanto, seria interessante avaliar o tempo total necessário para a completa desoperculação e remoção da criação morta nas técnicas de campo utilizadas, uma vez que, quando estas foram executadas, as colônias eram avaliadas como higiênicas apenas se a remoção ocorria até às 48 horas e não higiênicas se três ou mais dias eram necessários para a eliminação de toda a criação morta. Por outra parte, este factor é de grande importância, na medida em que, nos permite obter um método de determinar, de uma forma prática, que colmeias podem apresentar um elevado comportamento higiênico entre as existentes nas explorações apícolas.

Assim, no que se refere ao tempo total necessário para a remoção completa de todos os alvéolos com criação morta por punção, estes resultados sugerem que este varia entre 24 horas com remoção completa até mais de 72 horas com remoção incompleta. Estes resultados são similares aos obtidos por Newton e Ostasiewski (1986). No entanto, ao contrário destes autores, nas primeiras 24 horas observou-se uma elevada percentagem de desoperculação e remoção (Figuras

1 e 2). É de salientar que estes autores apenas encontraram uma pequena percentagem de desoperculação e remoção no primeiro dia, não efectuando observações após os três dias e, além disso, trabalharam com colónias afectadas com Loque Americana.

Por outro lado, nos nossos resultados, os valores da percentagem de desoperculação no período das 48 horas variou entre 4,8% (valor mínimo) e 100% (valor máximo), enquanto que, a percentagem de remoção da criação morta, às mesmas horas variou entre 76% (valor mínimo) e 100% (valor máximo). Cinco dias após o início dos ensaios, ambos os valores foram idênticos uma vez que a totalidade dos alvéolos estava limpa. Devemos ter em consideração que se trabalhou com colónias saudáveis e, possivelmente, com um forte instinto de limpeza, apesar de ser desconhecido, em todos os casos, a percentagem de abelhas com genótipo para a desoperculação e/ou remoção. Assim, estes resultados diferem dos obtidos por Cardenal Galvan et al. (1988), os quais trabalharam com colmeias contaminadas com uma doença fúngica e verificaram que a percentagem de desoperculação da criação morta atingiu o valor mínimo de 4,8% enquanto que o valor máximo foi de 62% no período de 48 horas e 76% no período de 120 horas. Mas, pelo contrário, são similares relativamente ao tempo total considerado para avaliar o comportamento higiénico das colónias.

Do mesmo modo, também se pode observar nas Figuras 3 e 4, a proporção de criação desoperculada e

removida quando é utilizada a técnica de morte da criação por congelação. É interessante salientar que o tempo total necessário para a remoção de toda a criação, em ambos os lados do quadro, foi muito menor ainda que na maioria dos casos houve uma pequena percentagem de desoperculação e remoção às 24 horas, com 1% e 27% de mínimo, respectivamente.

Os nossos resultados diferem dos obtidos por Newton e Ostasiewski (1986), que obtiveram 14 dias como tempo total necessário para a completa remoção da criação morta por congelação, assim como dos obtidos por Newton et al. (1975) os quais observaram que num favo teste com criação morta por congelação, esta era desoperculada e a criação morta removida entre 3 a 6 dias, na colónia com bom instinto de limpeza.

Pelo contrário, são semelhantes a estudos prévios onde já se descreviam as 48 horas como o tempo total considerado para a remoção da criação morta (Gonçalves e Kerr, 1970; Message e Gonçalves, 1980a, 1980b; Taber e Gilliam, 1988; e Spivac e Gilliam, 1993) (Figura 5).

Pode-se também especular que o tempo total necessário para remover a criação morta é variável provavelmente porque, por vezes, quando o alfinete perfura o opérculo da célula, a pré-pupa ou pupa não morre e, conseqüentemente, a sua cor não se altera e não apresenta nenhum sinal de decomposição.

Todas essas hipóteses podem ser válidas e por esta

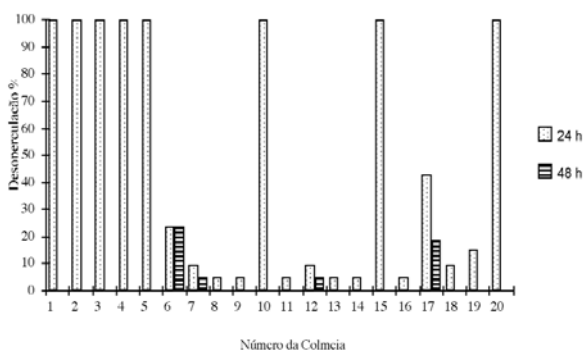


Figura 1 - Percentagem de desoperculação na técnica de morte por punção

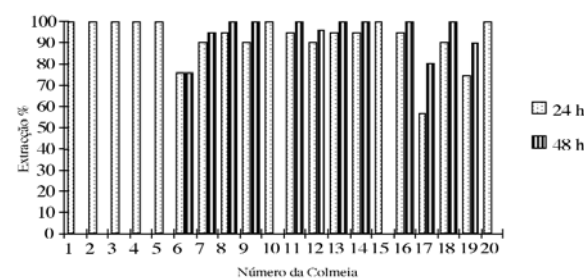


Figura 2 - Percentagem de remoção na técnica de morte por punção

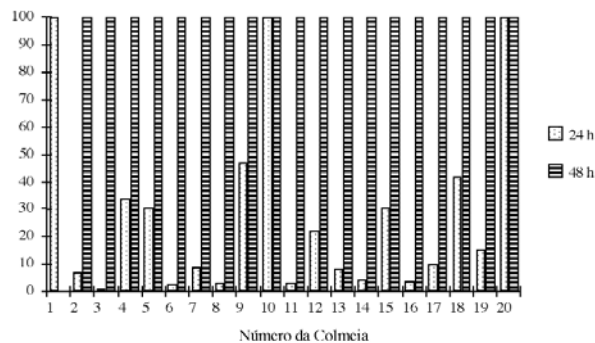


Figura 3 - Percentagem de desoperculação na técnica de morte por congelação

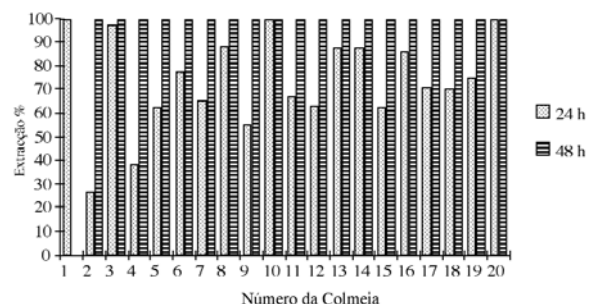


Figura 4 - Percentagem de remoção na técnica de morte por congelação

razão é difícil explicar essas diferenças com mais clareza, sendo necessário continuar as investigações. Por outro lado, podemos reforçar a hipótese de que a técnica da morte, o tamanho da amostra, as condições ambientais, o tipo de manejo, a raça e as especificidades da colônia são alguns dos factores de estudo que devemos considerar em trabalhos posteriores.

Da representação gráfica da Figura 5, podemos deduzir que as abelhas que povoam o apiário do nosso estudo podem ser consideradas com um elevado comportamento higiênico, quando comparamos os valores obtidos neste trabalho para a percentagem de criação removida às 48 horas com ambas as técnicas (100% para a Técnica 1 e 96,9% para a Técnica 2) com os resultados expressos por outros autores, para outras patologias, utilizando as mesmas técnicas. No entanto, devemos realçar o reduzido tamanho da amostra, que lhe confere, provavelmente, um valor mais testemunhal que a possibilidade de inferir desta conclusões válidas para a população apícola da nossa região.

Concluimos que num período de 24 horas, a resposta das abelhas à criação morta operculada foi altamente condicionada pela técnica de morte usada. Deste modo, a técnica de morte por punção é a mais eficiente, neste período, para avaliar o instinto de limpeza das abelhas obreiras. Quando se considera o tempo necessário para a desoperulação e remoção da criação morta em ambos os ensaios, as abelhas locais mostram um bom comportamento higiênico, isto é, uma resposta rápida às técnicas de limpeza executadas.

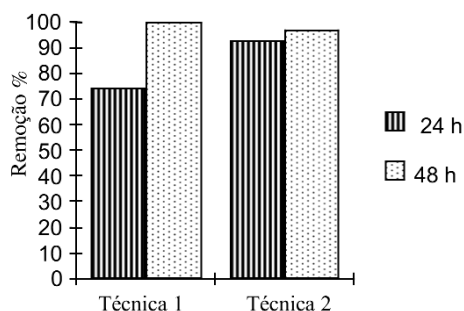


Figura 5 - Percentagem de criação removida nas duas técnicas

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Professor Doutor Dionísio Afonso Gonçalves, presidente do Instituto Politécnico de Bragança, por apoiar este projecto de investigação, assim como ao "Instituto Agronomico Mediterraneo de Zaragoza".

Bibliografia

- Cardenal Galván JA, López-Sepúlveda GEC, Gómez Pajuelo A, Alonso JMR, Mendonza JH e Mendonza MH (1988). Ensayos de control de la Ascoferiosis (Pollo Escayolado) de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.): Estudios de comportamiento higienico I. In: Procedimientos del IV Congreso Nacional de Apicultura - Biología y patología. Editor: Diputación General de Aragón (Saragoça, Espanha), 163-165 p.
- Gilliam M, Taber S e Richardson GV (1983). Hygienic behaviour of honey bees in relation to Chalkbrood disease. *Apidologie*, 14: 29-39.
- Gonçalves LS e Kerr WE (1970). Noções sobre genética e melhoramento em abelhas. In: Procedimentos do 1º Congresso Brasileiro de Apicultura (Florianópolis, Brazil), 8-36 p.
- Kefuss J, Taber S, Van Pouecke J e Rey F (1996). A practical method to test for disease resistance in honey abelhas. *American Bee Journal*, 136: 31-32.
- Message D (1979). Efeito de condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas *Apis mellifera*. MSc. tese, Faculdade de Medicina de Ribeirão, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Message D e Gonçalves LR (1980a). Efeito das condições do favo teste no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). In: Procedimentos do 5º Congresso de Apicultura e III Congresso Latino Ibero-Americano de Apicultura (Viçosa, Brasil), 133-139 p.
- Message D e Gonçalves LR (1980b). Efeito das condições climáticas e da colônia no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). In: Procedimentos do 5º Congresso de Apicultura e III Congresso Latino Ibero-Americano de Apicultura (Viçosa, Brasil), 140-147 p.
- Milne CPJR (1985a). Laboratory tests of honeybee hygienic behaviour and resistance to European foulbrood. *American Bee Journal*, 125: 578-580.
- Milne CPJR (1985b). Estimates of the heritabilities of and genetic correlation between two components of honey bee (*Himenoptera: Apidae*) hygienic behaviour: uncapping and removing. *Annals of the Entomological Society of America*, 78: 841-844.
- Moritz RFA. e Southwick EE (1992). *Bees as super organisms*. Springer Verlag (Berlin).
- Murray R (1993). Chalkbrood disease: the N.Z. experience. *Australasian Beekeeper*, 94: 497-508.
- Newton DC, Cantewell GC e Bourquin EP (1975). Removal of freeze-killed brood as an index of nest cleaning behavior in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). *American Bee Journal*, 115: 388-406.
- Newton DC e Ostasiewski NJJR (1986). A simplified bioassay for behavioral resistance to American Foulbrood in honey abelhas (*Apis mellifera* L.). *American Bee Journal*, 126: 278-281.
- Snedecor GW e Cochran WG (1980). *Statistical method*, 7ª edição. Iowa State University Press (Iowa).
- Spivak M e Gilliam M (1993). Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research*, 32: 147-157.
- Spivak M, Reuter GS e Lamb M (1995). Frequency of hygienic behaviour in naturally mated daughters of a hygienic breeder queen. *American Bee Journal*, 135: 830-831.
- Taber S e Gilliam M (1988). Breeding honey bees for resistance to diseases. *Apiacta*, 23: 3-8.