

Mayara Martins Cardozo

Impactos do pólen de soja geneticamente modificada (Intacta RR2 PRO®) e do herbicida Roundap sobre colmeias de *Apis mellifera* L.

Dissertação submetida ao Programa de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. PhD. Afonso Inácio Orth.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Cardozo, Mayara Martins

Impactos do pólen de soja geneticamente modificada (Intacta RR2 PRO®) e do herbicida Roundup sobre colmeias de *Apis mellifera* L. / Mayara Martins Cardozo ; orientador, Afonso Inácio Orth - Florianópolis, SC, 2017.

143 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Abelhas. 3. Soja transgênica. 4. Roundup. 5. Cidade das Abelhas, Saco Grande, Florianópolis. I. Inácio Orth, Afonso. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Este trabalho é dedicado especialmente aos meus amados pais, Sérgio e Márcia e a minha irmã e melhor amiga Aline.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais Sérgio e Márcia, e à minha irmã e melhor amiga Aline, pelo apoio, carinho e amor de vocês que foi por todo o tempo a minha maior motivação para seguir em frente;

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela experiência de vida, crescimento profissional e pessoal;

Ao professor Afonso Inácio Orth, pela amizade e por todas as contribuições e ensinamentos durante a orientação em dois anos de mestrado e também no estágio de conclusão de curso;

Ao professor César Assis Butignol, por todos os ensinamentos passados, e, principalmente, pela amizade;

À minha amiga linda e comilona, Yasmin Sbruzzi, que me ajudou muito no trabalho árduo no apiário e nas análises de laboratório e aos amigos Lucilene de Abreu, Márcia Regina Fanta, Dylan Thomas Talles, Lucas Solle e Willian Goldoni que também me ajudaram bastante, sem vocês nada disso seria possível, obrigada de coração;

Aos amigos dos momentos de descontração Aurora Jimenez, Bruna Marconsoni, Elias Francisco Ramos, Franci Ellen Fin, Mariana Pimenta, Marlon Borba, Pedro Henrique Di Palma, Rebeca Molina e Thiago Andrade (Jappa), que estiveram presentes nos melhores momentos da minha vida, e, principalmente, durante esta caminhada. Obrigada por todas as risadas, pela companhia, e por me permitirem ser amiga de vocês;

A todos os meus amigos, colegas e aos professores que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional;

Muito obrigada!

RESUMO

Ao sumiço das abelhas, que não tinha causa aparente conhecida, utilizou-se o termo Colony Collapse Disorder (CCD). São diversos os fatores citados como causas, entre eles a utilização de agrotóxicos e de plantas transgênicas. Contudo, poucos estudos avaliam os efeitos subletais desses fatores sobre a sanidade apícola. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os impactos da alimentação proteica artificial contendo farinha de soja orgânica, convencional e transgênica (Intacta RR2 PRO®) sobre indivíduos de *A. mellifera*, além da alimentação energética contaminada com herbicida Roundup®. O experimento foi realizado no apiário experimental da Cidade das Abelhas, Saco Grande, Florianópolis-SC, de março a agosto de 2016. Foram utilizadas 20 colmeias submetidas aos seguintes tratamentos: xarope de açúcar invertido, sem adição de substância proteica (CT); xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica (CO); xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional (CC); xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica Intacta RR2 PRO® (CTR); e por último, xarope de açúcar invertido contaminado com Roundup® (CR). Foram analisados no tempo 0, 30, 60, 120 e 150 dias: a qualidade das colmeias, o comportamento higiênico das abelhas (CH); o índice de infestação pelo ácaro *Varroa destructor* e a intensidade de infecção por *Nosema* spp. Para a avaliação do CH foi utilizada a técnica de perfuração de células de crias operculadas; para a intensidade de infecção por *Nosema* spp. foi realizada a contagem de esporos desse fungo utilizando câmara de Neubauer (hemocitômetro); e para avaliar o índice de infestação de *Varroa* em crias de operárias e operárias adultas foi realizada contagem dessas e do número de ácaros. Os resultados mostraram que colmeias submetidas à alimentação transgênica e contaminada com herbicida, estão sujeitas a terem seu CH reduzido, devido aos efeitos subletais diretos ou indiretos sobre as abelhas. A longevidade das abelhas pode ser diminuída quando estas são submetidas à alimentação transgênica ou contaminado com herbicida. Quando isso acontece, percebe-se uma diminuição no índice de infecção, visto que a maioria das abelhas presentes na população são jovens, que podem não se infectaram ainda ou apresentaram intensidade de infecção muito baixa. Colmeias submetidas à alimentação transgênica e contaminada com herbicida têm sua quantidade de cria e abelhas adultas reduzidas significativamente, fazendo com que os ácaros fiquem aglomerados nos poucos indivíduos existentes, o que pode causar sérios danos às colmeias. Os efeitos causados sobre a população

de abelhas submetidas a alimentos contaminados com transgênicos e herbicidas, não são imediatos. São necessárias algumas gerações para que sejam observados resultados significativos sobre a qualidade, comportamento e sanidade das colmeias.

Palavras-chave: Comportamento Higiênico, *Varroa destructor*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, Sanidade apícola.

ABSTRACT

The term Colony Collapse Disorder (CCD) was used to describe the disappearance of honey bees, which has yet no known cause. Several factors are cited as causes, among them the use of pesticides and transgenic plants. However, few studies assess the sublethal effects on honey bees health. Thus, the aim of this study was to evaluate the impact of artificial protein feed with organic, conventional and transgenic soybean flour (Intacta RR2 PRO®) on *A. mellifera*, as well as sugar syrup contaminated with Roundup® herbicide. The experiment was carried out in the experimental apiary from the Cidade das Abelhas, Saco Grande, Florianópolis-SC, from March to August 2016. Twenty hives were submitted to treatments: inverted sugar syrup, without addition of protein substance (TC); Inverted sugar syrup and organic soybean flour (CO); Inverted sugar syrup and conventional soy flour (CC); Inverted sugar syrup and Intacta RR2 PRO® transgenic soy flour (CTR); And finally, inverted sugar syrup contaminated with Roundup® (CR). The periods 0, 30, 60, 120 and 150 days were analyzed: the quality of the hives, the hygienic behavior of the bees (CH); The rate of *Varroa destructor* mite infestation and an infection intensity by *Nosema* spp. To evaluate the CH, a technique used was to drill small holes into operculated pupae cells; To evaluate the infection intensity of *Nosema* spp. the fungus spore were counted using the Neubauer chamber (hemocytometer); and to evaluate the rate of infestation of *Varroa* into honey bee brood adult workers and workers we counted the number of bees and the number of mites. The results showed that the hives submitted to contaminated food with transgenic and herbicides are subject to reduced CH, due to the direct and indirect effects on honey bees. Bees' longevity may be decreased when they are submitted to transgenic feed or contaminated with herbicide. When this happens, a decrease in the infection index is observed, since the majority of worker bees present in the population are young, who can not have had time to get infected or have very low infection intensity. Beehives submitted to contaminated feed with transgenic and herbicide, has its population of young offspring and adult worker bees reduced significantly, causing the mites to become agglomerated in the few existing individual, which can cause serious damage to the hives. The effects caused on a population of honey bees subjected to contaminated food with transgenics and herbicides are not immediate. Some generations are needed to be observed significant results on the quality, behavior and the health of hives.

Key words: Hygienic behavior, *Varroa destructor*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, honey bees health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Diferentes fases do ciclo de vida das abelhas <i>A. mellifera</i>	26
Figura 2 Esporos de <i>N. apis</i> (A) e esporos de <i>N. ceranae</i> (B) vistos em microscópio de luz (Barras: 5 µm).....	34
Figura 3 Vista dorsal de uma fêmea adulta de <i>V. destructor</i> parasitando uma pupa de abelha operária (<i>Apis mellifera</i>). A foto foi tirada em lente objetiva de microscópio (Nikon achromatic 10x 160/0.25).....	39
Figura 4 Vista dorsal de um ácaro macho adulto de <i>V. destructor</i> . A foto foi tirada em lente objetiva de microscópio (Nikon achromatic 10x 160 / 0,25) com tubos de extensão de 100 mm + adaptador.....	39
Figura 5 Imagem da fêmea do ácaro <i>V. destructor</i> observado em microscópio de fluorescência invertido modelo IX81 da marca Olympus ®, com aumento de 10 vezes. (A). Desenho esquemático das partes do ácaro (B).....	40
Figura 6 Ácaro <i>Varroa</i> sobre o corpo de uma abelha – fase forética (A). Fonte: Alex Wild. Ácaro <i>Varroa</i> buscando células de larvas com idade de empupar – fase reprodutiva (B).	41
Figura 7 Ciclo reprodutivo de <i>Varroa destructor</i> em <i>Apis mellifera</i> . Em azul: desenvolvimento da abelha - os números indicam os dias de célula operculada. Em vermelho: desenvolvimento do ácaro da varrose - a letra ômega indica as desovas.....	42
Figura 8 Fórmula estrutural do glifosato.....	51
Figura 9 Temperatura média de abril a agosto de 2016 em Florianópolis.	58
Figura 10 Precipitação total (mm) mensal de abril a agosto em Florianópolis.	59
Figura 11 Umidade relativa (%) média observadas de abril a agosto em Florianópolis.....	60
Figura 12 Preparo do alimento contendo xarope de açúcar e farinha de soja. Foram misturados 30g de farinha de soja (A) em 120g de xarope de açúcar (B) até que formasse uma pasta homogênea (C)...	63
Figura 13 Colmeia do tipo Langstroth com coletor de pólen encaixado no alvado.....	64
Figura 14 Procedimento realizado para análise de nosemose em <i>A. mellifera</i> . 60 abelhas separadas da amostra (A). Abdômens separados do restante do corpo (B). Maceração dos abdômens em cadinho de porcelana (C e D). Macerado sendo peneirado (E). Solução resultante do macerado em agitador (F). Câmara de Neubauer (G). Imagem dos 25	

quadrados grandes da câmara, vistos em microscópio óptico (10x) (H). Imagem do procedimento de contagem dos esporos (I).	68
Figura 15 Procedimento para diagnose e monitoramento de <i>V. destructor</i> em <i>A. mellifera</i>	70
Figura 16 Farinha de soja produzida através da trituração de grãos – LabEnto, Florianópolis - SC.	76
Figura 17 Fitas do kit QuickStix da Enviroligix com resultado negativo à presença de proteína Cry1Ac (A). Tira com resultado positivo à presença de proteína Cry1Ac (B) na farinha de soja transgênica – LabEnto, Florianópolis - SC.	77
Figura 18 Alimento proteico não recolhido pelas abelhas operárias 24 horas após a introdução da primeira alimentação (todas as colmeias se apresentaram de forma semelhante) – Cidade das Abelhas, Florianópolis - SC.	78
Figura 19 Teste realizado no material proteico coletado das colmeias CTR, após 5 meses da introdução dos tratamentos nas colmeias. Todos apresentaram resultado positivo para a proteína Cry1Ac através da análise realizada com fitas do kit QuickStix da Enviroligix – LabEnto, Florianópolis – SC.	79
Figura 20 Abelha nascendo com as asas deformadas em colmeia com tratamentos CR (A). Abelha deformada com abdômen atrofiado em colmeia com tratamentos CR (B), Cidade das abelhas, Florianópolis - SC.	85
Figura 21 Flutuação do CH de abril a agosto nos tratamentos CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido com resíduo de roundup.	86
Figura 22 Intensidade alta (A) e muito alta (B) de esporos de <i>Nosema</i> spp., obtidos através da maceração do intestino de apenas uma abelha, observados em microscópio óptico com aumento de 40x.	91
Figura 23 Flutuação da intensidade de infecção pelo fungo <i>Nosema</i> spp., de abril (antes da introdução dos tratamentos) a agosto nos tratamentos CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com herbicida.	92

Figura 24 Flutuação no índice de infestação pelo ácaro *V. destructor*, em crias de operárias, de abril (antes da introdução dos tratamentos) a agosto nos tratamentos CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com herbicida..... 97

Figura 25 Flutuação do índice de infestação pelo ácaro *V. destructor*, em operárias adultas, de abril (antes da introdução dos tratamentos) a agosto nos tratamentos CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com herbicida..... 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ciclo evolutivo das diferentes castas de <i>A. mellifera</i> , em dias.	26
Tabela 2 Classificação de colmeias, de acordo com sua população de abelhas adultas, de cria aberta e fechada, e reservas de alimento energético.	61
Tabela 3 Intensidade de infecção de <i>Nosema</i> spp. em <i>Apis mellifera</i>	69
Tabla 4 Classificação da qualidade das colmeias do apiário experimental da Cidade das Abelhas, Saco Grande, Florianópolis, do período de abril a agosto de 2016.	75
Tabla 5 Médias do comportamento higiênico (%) observadas em colmeia de <i>A. mellifera</i> , durante os meses de maio a agosto de 2016, Florianópolis, SC.	83
Tabla 6 Médias da intensidade de infecção pelo fungo <i>Nosema</i> spp. observadas nos tratamentos durante os meses de maio a agosto de 2016, Florianópolis, SC.	89
Tabla 7 Médias do índice de infestação, em crias de operárias, pelo ácaro <i>V. destructor</i> observadas nos tratamentos durante os meses de maio a agosto de 2016, Florianópolis, SC.	94
Tabela 8 Médias do índice de infestação, em operárias adultas, pelo ácaro <i>V. destructor</i> observadas nos tratamentos durante os meses de maio a agosto de 2016, Florianópolis, SC.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB = Cria pútrida americana
AMPA = Ácido aminometilfosfônico
Bt = *Bacillus thuringiensis*
CC = Tratamento com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional
CCA = Centro de Ciências Agrárias
CCD = Colony Collapse Disorder
CH = Comportamento higiênico
CO = Tratamento com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica
CR = Tratamento com xarope de açúcar invertido contaminado com Roundup®
Cry = δ -endotoxinas ou Insecticidal Crystal Proteins
CT = Tratamento com xarope de açúcar invertido, sem adição de substância proteica
CTR = Tratamento com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica Intacta RR2 PRO®
DCC = Desordem do Colapso de Colônias
EAG = Eletroantenograma
EPAGRI = Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
EPSPs = 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase
EUA = Estados Unidos da América
FAO = Food and Agriculture Organization – Organização das Nações para Alimentação e Agricultura
g = Grama
Kg = Kilograma
Labento = Laboratório de Entomologia Agrícola
Nº = Número
PECA = Parque ecológico Cidade das Abelhas
OGM = Organismo geneticamente modificado
Ppm = partes por milhão
R\$ = Reais
SC = Santa Catarina
UFSC = Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	ABELHAS (<i>Apis mellifera</i> , Hymenoptera: Apoidea)	25
2.1.1	Biologia de <i>Apis mellifera</i>	25
2.1.2	Colony Collapse Disorder (CCD).....	28
2.1.3	Comportamento higiênico.....	29
2.1.4	<i>Nosema</i> spp.	32
2.1.5	<i>Varroa destructor</i>	36
2.2	A CULTURA DA SOJA (<i>Glycine max</i>)	44
2.2.1	Soja.....	44
2.3	ROUNDUP®	50
2.4	EFEITO DOS AGROTÓXICOS SOBRE ABELHAS.....	52
2.5	ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL.....	54
3	OBJETIVOS	56
3.1	OBJETIVO GERAL	56
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	56
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	DADOS METEOROLÓGICOS	58
4.2	QUALIDADE DAS COLMEIAS DE <i>A. mellifera</i>	60
4.3	PREPARO DO ALIMENTO ARTIFICIAL	61
4.4	FORNECIMENTO DO ALIMENTO PROTEICO PARA AS ABELHAS	64
4.5	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO.....	65
4.6	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>Nosema</i> spp.....	66
4.7	AVALIAÇÃO DA INFESTAÇÃO POR <i>Varroa destructor</i>	69
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
5	RESULTADOS E DICUSSÃO.....	72
5.1	QUALIDADE DAS COLMEIAS	72
5.2	5.2 ALIMENTAÇÃO	76

5.3	COMPORTAMENTO HIGIÊNICO	82
5.4	FLUTUAÇÃO DA INTENSIDADE DE INFECÇÃO POR <i>Nosema</i> spp.	88
5.5	FLUTUAÇÃO DO ÍNDICE DE INFESTAÇÃO PELO ÁCARO <i>V. destructor</i>	93
6	CONCLUSÃO.....	103
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	104
8	REFERÊNCIAS.....	105

1INTRODUÇÃO

A polinização é um dos serviços ambientais de maior importância para os seres humanos, uma vez que um terço dos principais produtos agrícolas, utilizados direta ou indiretamente na alimentação humana, depende da ação dos polinizadores (McGREGOR, 1976; KLEIN et al., 2007). Estima-se que 33% das culturas utilizadas como alimento dependem da polinização das abelhas (BERNAL et al., 2011).

Cerca de 200 mil espécies de animais são polinizadoras de mais de 250 mil espécies de plantas no mundo, incluindo alguns vertebrados, pássaros e mamíferos (INGRAM et al., 1996). Entretanto, os insetos são os maiores polinizadores e as abelhas são consideradas os mais eficientes (DEVILLERS, 2002). De acordo com a FAO (2004), aproximadamente 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo são polinizadas por alguma espécie de abelha.

O valor estimado dos serviços prestados pelos polinizadores no mundo, era de 153 bilhões de euros por ano (GALLAI et al., 2009). Mesmo em culturas que não dependem da polinização entomófila, ocorre a produção de frutos em maior quantidade e qualidade quando ela está presente (FREE, 1993).

A alta dependência das abelhas para a polinização resulta em grande preocupação, visto que há um recente declínio na população das mesmas, o que pode causar declínio na produção, além de danos ao ecossistema natural (PINHEIRO; FREITAS, 2010). Ao sumiço das abelhas que aconteceu nos EUA, em 2006, inicialmente sugeriu-se que se tratava de um patógeno novo e altamente virulento. A característica principal desse fenômeno foi a inabilidade das abelhas campeiras de retornarem às suas colmeias. Mais tarde, o sumiço das abelhas, também foi relatado na Europa, Ásia, África, Oriente Médio, Austrália (STOKSTAD, 2007; NEUMANN; CARRECK, 2010) e Brasil (GONÇALVES, 2012).

Contudo, na ausência de uma causa conhecida, utilizou-se o termo Colony Collapse Disorder (CCD) ou Desordem do Colapso das Colônias (DCC) (STOKSTAD, 2007). O primeiro relatório anual do Comitê Diretivo da Desordem do Colapso da Colônia nos EUA, publicado em julho de 2009, sugeriu que é improvável que a CCD seja causada por um patógeno previamente desconhecido, mas poderia ser causada por uma combinação de vários agentes entre pragas e patógenos conhecidos, baixa variabilidade genética e condições climáticas desfavoráveis que diminuem o forrageamento das abelhas. Alguns autores citam também que agrotóxicos e plantas transgênicas podem

atuar como agentes de enfraquecimento das colmeias, destacando que seus efeitos subletais sobre os organismos não-alvo, devem ser avaliados como parte do risco ambiental. Outros fatores, tais como alimentação deficiente, alterações no agroecossistema, além do estresse causado pelo transporte de longa distância de colmeias para as fontes de néctar ou locais de polinização também são considerados como fatores causadores da CCD (OLDROYD, 2007; VANENGELSDORP et al., 2007; DE JONG; MESSAGE, 2008; SPIVAK, 2008; ROMEIS et al., 2008; LOVEI et al., 2009; RATNIEKS; CARRECK, 2010; THEN, 2010; ROMEIS et al., 2011).

As doenças e pragas nas abelhas *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), exercem efeitos deletérios sobre o seu desenvolvimento, produtividade e polinização, o que pode causar prejuízos aos agricultores e também ao ecossistema. Os principais problemas na apicultura mundial, são a doença da nosebose e a praga da varroose, causadas pelos fungos *Nosema apis* (Zander, 1909), ou *Nosema ceranae* (Fries et al., 1996), e pelo ácaro *Varroa destructor* (Anderson e Trueman), 2000 (PEREIRA et al., 2003).

No Brasil, o uso de variedades transgênicas aumentou pelo menos 5 vezes nos últimos 12 anos. Em 2013, foram cultivados 26,9 milhões de hectares de soja transgênica, o que corresponde a 92,4% da área plantada com soja no País (EMBRAPA, 2014). A soja (*Glycine max* L. Merrill) Intacta RR2 PRO® produzida pela empresa Monsanto Ltda, expressa a proteína Cry1Ac recombinante (rCry1Ac) que apresenta proteção às pragas-alvo primárias, bem como a enzima 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase, que proporciona a planta transgênica ser resistente a doses comerciais de herbicidas a base de glifosato. O uso em larga escala, deste tipo de variedade, pode representar um risco para a biodiversidade, pelos possíveis efeitos sobre organismos não-alvo, o que torna mais importante os estudos que avaliem tal interação (SILVA, 2013). É importante mencionar que as sequências inseridas são distintas das sequências naturais encontradas no doador dos genes. Assim, em plantas transgênicas são expressas proteínas recombinantes, já que o gene introduzido também é recombinante (ex: rCry1Ac). No presente estudo, as plantas transgênicas utilizadas expressam, entre outros, o núcleo inseticida recombinante da proteína Cry1Ac.

Outro fator que tem causado muito debate é a utilização de herbicidas. Embora eles sejam, muitas vezes, considerados inofensivos para as abelhas, pesquisas têm mostrado seu efeito subletal, visto que eles estão potencialmente biodisponíveis para as abelhas forrageiras a

partir do pólen, do néctar e da água (TAPPARO et al., 2012; KRUPKE et al., 2012).

As melhores práticas de manejo na agricultura para o uso sustentável e a conservação dos polinizadores são o controle do uso de pesticidas nas culturas; análise do fluxo gênico nas culturas transgênicas; a proposição de protocolos de biossegurança; práticas agrícolas amigáveis com a conservação dos polinizadores, incluindo a preparação da terra a fim manter ninhos das abelhas sociais e solitárias que ocorrem no solo; manejo da paisagem agrícola de modo a manter suas bordas com vegetação nativa, ou cercas vivas que possam oferecer recursos aos polinizadores; manejo integrado de pragas; diminuição do uso dos herbicidas nas culturas agrícolas, pois as plantas ruderais auxiliam a conservação de polinizadores fornecendo recursos alimentares durante o ano todos (DIAS et al., 1999).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os impactos da alimentação proteica artificial contendo farinha de soja orgânica, convencional e transgênica (Intacta RR2 PRO®) sobre indivíduos de *A. mellifera*, além da alimentação energética com resíduo de herbicida Roundup®.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ABELHAS (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apoidea)

As abelhas melíferas pertencem ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem, Hymenoptera, subordem Apocrita, superfamília Apoidea, família Apidae, gênero *Apis*, espécie *Apis mellifera* (RUTTNER, 1988).

2.1.1 Biologia de *Apis mellifera*

As abelhas (*A. mellifera*) possuem três tipos diferentes de castas de indivíduos: rainha, operária e zangão, onde morfologicamente o maior indivíduo é a rainha, seguido pelo zangão e pela operária (GALLO, 2002). Todas as castas possuem um ciclo evolutivo que passa por 4 diferentes fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1) (READICKER-HENDERSON, 2009), apesar disso, cada uma possui um ciclo com diferentes durações (Tabela 1).

Figura 1 Diferentes fases do ciclo de vida das abelhas *A. mellifera*.

Fonte: Adaptado de Cardozo, 2014.

Tabela 1 Ciclo evolutivo das diferentes castas de *A. mellifera*, em dias.

Fases \ Castas	Castas		
	Rainha	Operária	Zangão
Ovo	3	3	3
Larva	5	6	6,5
Pré-pupa e Pupa	7	12	14,5
Totais	15	21	24

O ovo tem forma cilíndrica, cor branca e, no momento da postura, fica em posição vertical no fundo do alvéolo. Logo após a oviposição, as abelhas nutrizas depositam um pouco de geleia real dentro dos alvéolos e a partir do segundo dia, depositam mel e pólen. Esse tipo de alimentação dará origem às abelhas operárias e zangões (GALLO, 2002). Três dias após a postura dos ovos, ocorre o nascimento da larva, que tem cor branca, formato vermiforme e fica posicionada no fundo do alvéolo, com corpo recurvado em forma de "C" (PEREIRA et al., 2003).

Os indivíduos que, durante todo o seu desenvolvimento larval, receberem geleia real, darão origem às abelhas rainhas. No final da fase larval a célula é operculada, a larva fica reta e imóvel passando para a fase de pré-pupa (PEREIRA et al., 2003).

Na fase de pupa exarata pode-se fazer a distinção de cabeça, tórax e abdômen, e pode-se observar os olhos, pernas, asas, antenas e partes bucais. Os olhos e o corpo passam por mudanças de coloração até a saída da abelha adulta de dentro do alvéolo. Todas as mudanças pela qual a abelha passa até chegar ao estágio adulto chama-se metamorfose (RAMOS; CARVALHO, 2007).

A rainha é a única fêmea fértil da colmeia, ela possui o dobro do tamanho de uma operária e é criada dentro de um alvéolo modificado,

denominado de realeira (PEREIRA et al., 2003). As larvas destinadas a serem rainhas, são alimentadas apenas com geleia real pelas abelhas operárias (RIOTTE, 2012), uma substância branca que faz com que, ao atingirem a fase adulta, se tornem sexualmente maduras. A rainha inicia sua vida reprodutiva 5 a 7 dias após seu nascimento, com o voo nupcial. Centenas a milhares de zangões voam à espera de uma rainha, contudo, somente os zangões mais rápidos e fortes conseguem copular uma rainha, que pode ser fecundada por dezenas de zangões, o que confere grande variabilidade genética no acasalamento. Ao retornar a colmeia, após o voo nupcial, a rainha não sairá mais para copular, o sêmen utilizado para a fecundação dos óvulos é armazenado na espermateca, a rainha inicia a postura de ovos 3 a 7 dias após a cópula. (PEREIRA et al., 2003; SCHACKER, 2008).

Uma abelha rainha pode viver e colocar ovos por um período maior do que três anos. Em climas tropicais, ela é capaz de colocar 1000 ovos por dia pelo período de, aproximadamente, um ano. Depois desse período, a capacidade de postura diminui. Por isso, recomenda-se aos apicultores que substituam suas rainhas anualmente. Os ovos podem ou não ser fecundados, esse controle é feito pela rainha (PEREIRA et al., 2003). Os ovos fecundados darão origem à uma rainha ou às operárias, e os não fecundados darão origem à um zangão (READICKER-HENDERSON, 2009). A rainha realiza a postura de um ovo por alvéolo (PEREIRA et al., 2003).

As operárias compõem 99% da colmeia, são indivíduos do sexo feminino, estéreis e têm muitos postos de trabalho, sendo que o principal é o de forrageamento em busca de néctar, pólen, água e outros recursos (GALLO, 2002; PEREIRA et al., 2003). As abelhas recém-nascidas possuem diferentes tarefas dentro da colmeia (BENJAMIN, 2009). Até o seu 5º dia de vida elas realizam a limpeza dos alvéolos. Do 5º ao 10º dia, elas são denominadas de nutrizes, já que ficam responsáveis pela alimentação das larvas. Nessa fase, elas apresentam grande desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, capazes de produzir a geleia real. Do 11º ao 20º dia, as abelhas apresentam grande desenvolvimento das glândulas ceríferas, e por isso, possuem grande capacidade de produzir cera para a construção de favos. Elas também têm a função de receber e desidratar o néctar trazido pelas abelhas campeiras, produzindo o mel. Até o 21º dia, as abelhas têm função de defesa da colmeia, por isso apresentam órgãos de defesa bem desenvolvidos e com grande acúmulo de veneno. Nessa fase elas também podem participar no controle da temperatura dentro da colmeia. A partir do 22º dia até a morte, as abelhas realizam a coleta de néctar,

pólen, resinas e água, nessa fase elas são chamadas de campeiras (PEREIRA et al., 2003).

Os zangões são os indivíduos masculinos, não possuem ferrão, corbícula (para armazenar pólen), nem glândulas ceríferas, sua função é fertilizar a rainha no voo nupcial (VETTER; VISSCHER, 1997). Eles podem viver até 3 meses, desde que não acasalem e se houver alimento na colmeia, já que no período de escassez de comida, as operárias expulsam ou matam os zangões. Durante o período à espera da rainha, eles ficam dentro da colmeia descansando e sendo alimentados, geralmente, pelas abelhas operárias. O voo nupcial pode ocorrer a partir do 12º dia de vida, quando os zangões atingem a maturidade sexual. Depois da fecundação o zangão morre rapidamente, já que seu órgão genital fica preso ao órgão genital da rainha (GALLO, 2002; SCHACKER, 2008).

2.1.2 Colony Collapse Disorder (CCD)

O aumento contínuo na perda de colmeias é uma questão preocupante desde que o CCD foi relatado pela primeira vez, em 2006, na costa leste dos Estados Unidos (GIFFORD, 2011). Mais tarde, ele também foi relatado na Europa, Ásia, África, Oriente Médio, Austrália (STOKSTAD, 2007; NEUMANN; CARRECK, 2010) e Brasil (GONÇALVES, 2012).

Inicialmente acreditava-se que se tratava de um patógeno novo e altamente virulento (STOKSTAD, 2007). Contudo, o primeiro relatório anual do Comitê Diretivo da Desordem do Colapso da Colônia nos EUA, publicado em julho de 2009, sugeriu que é improvável que o CCD seja causado por um patógeno previamente desconhecido e na ausência de uma causa conhecida, utilizou-se o termo Colony Collapse Disorder (CCD) ou Desordem do Colapso das Colônias (DCC) (STOKSTAD, 2007).

O CCD é um fenômeno caracterizado pela a inabilidade das abelhas campeiras de retornarem às suas colmeias. Ele provoca uma rápida diminuição das abelhas operárias de dentro da colmeia, contudo, poucas ou nenhuma abelha operária morta é observada dentro ou próximo a elas. Apesar disso, observa-se a presença de larvas, pupas, alimento, podendo ser encontrada também uma pequena quantidade de operárias jovens aglomeradas próximo à rainha (GIFFORD, 2011).

Nas colmeias com CCD, observa-se uma quantidade de cria maior do que a de operárias, além de uma relutância das abelhas em

consumir o alimento energético ou proteico fornecido e a presença da rainha (EMBRAPA, [S.d]).

Atualmente, é consenso na comunidade científica que a CCD não é causada apenas por um único fator, mas por um conjunto de agentes que pode ocorrer simultaneamente e pode se influenciar mutuamente. Devido a isso, são muitas as teorias que cercam o recente declínio da população de abelhas, como estressores naturais que incluem pragas e patógenos conhecidos, baixa variabilidade genética e condições climáticas desfavoráveis que diminuem o forrageamento das abelhas. Alguns fatores antropogênicos também são citados como possíveis causadores da CCD como: aumento da exposição a pesticidas, aumento da área cultivada com plantas transgênicas, alimentação deficiente, inseminação artificial de rainhas utilizando sêmen de variabilidade genética limitada, alterações no agroecossistema, perda de habitat, além do estresse causado pelo transporte de longa distância de colmeias para as fontes de néctar ou locais de polinização também são considerados como fatores causadores da CCD (OLDROYD, 2007; VANENGELSDORP et al., 2007; DE JONG; MESSAGE, 2008; ROMEIS et al., 2008; SPIVAK, 2008; LOVEI et al., 2009; RATNIEKS; CARRECK, 2010; THEN, 2010; GIFFORD, 2011; ROMEIS et al., 2011). Foi sugerido ainda que o aumento do uso do telefone celular pode estar interferindo no sistema imunológico das abelhas e/ou na sua capacidade de forragear (GIFFORD, 2011).

A diminuição das populações de polinizadores é motivo de grande preocupação em muitos países (JOHNSON et al., 2010; POTTS et al., 2010), visto que além dos danos econômicos pode causar danos ao ecossistema natural (PINHEIRO; FREITAS, 2010). O desaparecimento das abelhas é uma crise que não podemos ignorar (VANENGELSDORP et al., 2008).

2.1.3 Comportamento higiênico

As abelhas (*A. mellifera*) desenvolveram mecanismos de imunidade social baseados em mecanismos comportamentais para reduzir o risco de doenças na colmeia (CREMER; ARMITAGE; SCHMID-HEMPEL, 2007). Entre eles, o comportamento higiênico (CH), que consiste na capacidade das operárias identificarem e removerem crias mortas, doentes, danificadas ou parasitadas encontradas dentro das células de crias, sendo este um traço genético hereditário das operárias (WILSON-RICH et al., 2009). Sua base genética foi sugerida pela primeira vez por Rothenbuhler et al. (1964),

que propôs um modelo de dois loci para explicar a herança de comportamento higiênico. Desde então, esse comportamento tem sido reconhecido como um exemplo da influência dos genes mendelianos herdados sobre o comportamento, onde um locus (u) foi pensado por estar envolvido na desorpeculação das células e outro (r) na remoção (JONES; ROTHENBUHLER, 1964; HOMPSON, 1964; MOMOT; ROTHENBUHLER, 1971; SPIVAK; GILLIAM, 1998). Mais tarde, um modelo de três loci foi desenvolvido para melhor ajustar os dados originais (MORITZ, 1988).

Alguns autores expandem a capacidade do comportamento higiênico, e sugerem que as abelhas têm a capacidade de identificarem a presença de patógenos em abelhas campeiras por exemplo, sendo essas proibidas de regressar ou são expulsas da colmeia. Segundo Wilson-Rich et al. (2009) o comportamento higiênico é o mecanismo natural mais importante de resistência das abelhas melíferas a doenças e parasitas.

A primeira observação sobre o comportamento higiênico em *A. mellifera* foi registrada por Park et al. (1937) quando se tentava determinar a existência de resistência das abelhas à Cria Pútrida Americana (AFB), uma doença causada pela bactéria *Paenibacillus larvae* (White, 1906). Em 1943, Woodrow e States constataram que as abelhas operárias tinham a habilidade de descobrir e remover crias atacadas pelo *P. larvae*, antes de ocorrer a esporulação (GRAMACHO et al., 1999b). Mais tarde, foi também considerado como um mecanismo de defesa à varroose (PENG et al., 1987; BOECKING; DRESCHER, 1992; SPIVAK, 1996; SPIVAK; GILLIAM, 1998; BOECKING; SPIVAK, 1999; FLORIS et al., 2001), onde as abelhas têm a capacidade de identificar a presença do ácaro *V. destructor*, nos alvéolos de crias, retirando a larva parasitada da colmeia (MORETTO; GONÇALVES; DE JONG, 1993). Quando uma pupa infestada é removida da colmeia, o ácaro fêmea adulto (e descendência) pode ser removido juntamente com a cria (AUMEIER; ROSENKRANZ, 2001). Os ácaros imaturos acabam morrendo (HARRIS; DANKA; VILLA; 2012), e os adultos, muitas vezes, sobrevivem à remoção das pupas hospedeiras, visto que, geralmente se fixam à abelha que está removendo a cria (AUMEIER; ROSENKRANZ, 2001). Eles podem também se desprender, na hora da remoção da cria, e andar livremente sobre o quadro. Muitos autores dizem que fora da célula de cria os ácaros são detectados com maior facilidade e acabam sendo danificados pelas abelhas operárias (BOECKING; SPIVAK, 1999; THAKUR; BIENEFELD; KELLER, 1997).

O comportamento higiênico é realizado por abelhas jovens de meia-idade (15-20 dias) (ARATHI et al., 2000). Esta limpeza é realizada por duas ações diferentes, primeiro as abelhas operárias desoperulam a célula de cria e depois removem as pupas do alvéolo (BOUTIN et al., 2015).

A hipótese é de que o comportamento higiênico, de desoperulação e remoção da cria parasitada, seja mediado por sinais olfativos: as abelhas podem detectar o odor emitido pela cria doente ou morta (TITERA; KOKKORIS, 1994; SPIVAK; DOWNEY, 1998; GRAMACHO et al., 1999a; NAZZI; MILANI; VEDOVA, 2004), ou pelo odor dos parasitas (AUMEIER; ROSENKRANZ, 2001; MARTIN et al., 2001; 2002). Spivak et al., (2003), apoiam esta hipótese devido a estudos que eles realizaram utilizando o registro de eletroantenograma (EAG) e a resposta a extensão probóscide. Seus estudos demonstraram que as abelhas operárias coletadas de uma colmeia com um bom comportamento higiênico exibiam uma maior sensibilidade olfativa a pupas infectadas com cria giz, uma doença fúngica (MASTERMAN et al., 2001). Estímulos ou sinais mecânicos, como movimentos e/ou vibrações anormais da cria no interior do alvéolo, podem também ser detectados pelas abelhas, além de alguns sinais acústicos (BOECKING; DRESCHER, 1994). Alguns autores admitem também o envolvimento de sinais térmicos, onde as abelhas teriam a capacidade de detectar diferenças entre o calor produzido por uma pupa saudável e uma doente ou parasitada (GRAMACHO; GONÇALVES; ROSENKRANZ, 1997).

As análises para avaliar o comportamento higiênico são, geralmente, realizadas através dos métodos de perfuração ou congelamento das células com crias de operárias operculadas, que não apresentam diferenças entre os resultados obtidos, mas a eficácia na remoção de crias mortas, dependerá do tempo em que o teste permanecer em desempenho em ambos os métodos (GRAMACHO, 1995; PIRES et al., 2006; PEREIRA, 2008).

Para que uma colmeia seja considerada como higiênica é necessário que as abelhas operárias removam 80% ou mais das crias mortas no prazo de 24 horas, as colmeias que não atingem esse valor são consideradas como não higiênicas (GRAMACHO; GONÇALVES, 1994). Trabalhos mais recentes, apresentam uma nova classificação para a higiene das colmeias. Boutin et al. (2015), classificaram as colmeias como: não-higiênicas (remoção de crias mortas < 50%), comportamento higiênico intermediário (remoção de crias mortas entre 50% e 90%) e altamente higiênicas (remoção de crias mortas > 90%).

Outro comportamento de imunidade é o grooming, que é ato de limpar o seu próprio corpo ou de um outro indivíduo do mesmo grupo. É denominado de comportamento de imunidade social, quando a abelha operária tem a capacidade de detectar e remover parasitas de outras abelhas (*allo-grooming*) (WILSON-RICK et al., 2008) e comportamento de imunidade individual quando a abelha operária tem a capacidade de detectar e remover parasitas do seu próprio corpo (*auto-grooming*), além da defesa mecânica, fisiológica e imunológica (EVANS, 2006; SCHMID et al., 2008; WILSON-RICK; DRES; STARKS, 2008).

2.1.4 *Nosema* spp.

A origem dos microsporídios pode ter ocorrido há 200 milhões de anos, embora só tenham sido descobertos há cerca de 150 anos (KEELING et al., 2005).

Estes microrganismos são capazes de infectar uma variedade de tipos celulares de hospedeiros invertebrados, como aracnídeos, crustáceos, principalmente insetos, onde apresentam a maior diversidade de espécies. Entretanto, são capazes de infectar também vertebrados (WITTNER; WEISS, 1999; IRONSIDE, 2007; FOKIN et al., 2008). Entre os mamíferos, os microsporídios foram reportados, pela primeira vez, como agente causal da paralisia motora em coelhos, em 1922 (*Encephalitozoon cuniculi*), e desde então, têm sido identificados como agentes patogênicos em roedores, carnívoros e primatas não-humanos (KHAN; DIDIER, 2004).

A classificação microsporíδια sofreu muitas transformações durante os anos devido, basicamente, ao progresso científico e tecnológico que continuamente desenvolve novas técnicas de análise que permitem novos pontos de associação. Primeiramente, os microsporídios identificados em insetos, foram classificados dentro do grupo dos organismos parasitas formadores de esporas, o Sporozoa. Essa classificação se baseou em características morfológicas grosseiras visíveis em microscopia óptica (SARLO, 2010). Contudo, a partir dos anos 80 os estudos nesse filo se intensificaram devido ao advento de técnicas moleculares e por ser reconhecido como um grupo de parasitas gastrointestinais oportunistas, causadores de diarreias (SHADDUCK; GREELEY, 1989; ORENSTEIN, 1991; SCHUITEMA et al., 1993; SCHWARTZ; et al., 1994), o que conduziu a uma revisão completa da classificação dos microsporídios, até que Cavalier-Smith, em 1998, inclui no seu artigo “A revised six-kingdom system of life” o filo Microsporídio dentro do reino Fungi (SARLO, 2010).

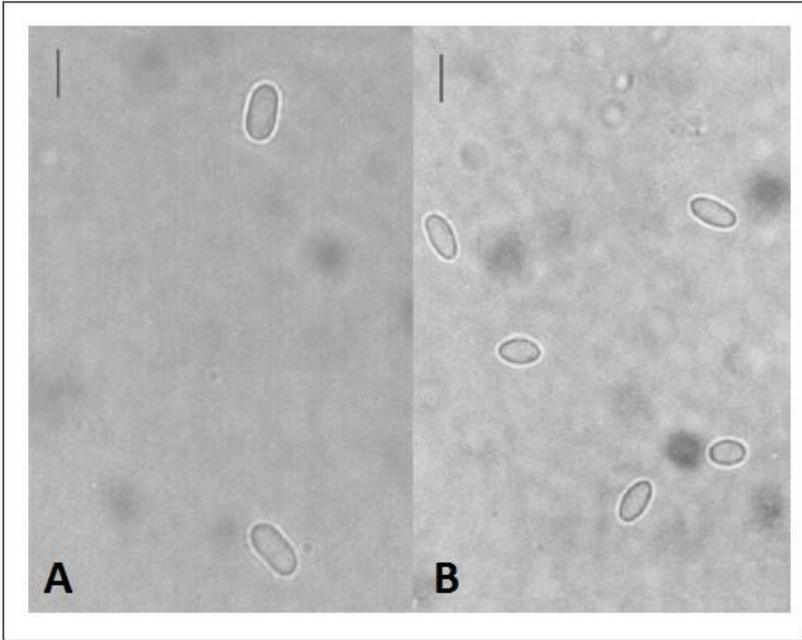
Os microsporídios são organismos parasitas intracelulares obrigatórios, que pertencem ao reino Fungi, filo Microspora. Embora sejam considerados eucariontes, eles possuem características muito semelhantes aos organismos procariontes, pois têm ausência de mitocôndrias e peroxissomas (FRANZEN; MÜLLER, 1999).

A maioria dos microsporídios entomopatogênicos pertence ao gênero *Nosema*, onde estão descritos mais de 150 gêneros e cerca de 1200 espécies (KEELING; FAST, 2002) e que são encontrados em, pelo menos, doze ordens de insetos (BECNEL; ANDREADIS, 1999). Dentre elas, Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera e Coleoptera. A maioria dos gêneros que tem sido descoberto se deve ao fato de serem parasitas de espécies de animais com importância comercial (CALI; WEISS; TAKVORIAN, 2005).

Dentro do filo Microspora, os microrganismos causadores de nosebose, encontram-se classificados dentro da classe Diahaplophasea, ordem: Dissociodiahaplophasida, família Nosematidae e gênero *Nosema* (CAVALIER-SMITH, 1998). Dois fungos microsporídios são capazes de infectar abelhas *A. mellifera*, *N. apis* e, estudos recentes mostram que *N. ceranae* - primeiramente, isolada de abelhas asiáticas - também é capaz de infectar *A. mellifera* (HIGES; MARTÍN-HERNÁNDEZ; MEANA, 2006; HUANG et al., 2008; OIE, 2013), e podem ser responsáveis pelo aumento da incidência da doença observada em alguns países europeus (HIGES; MARTÍN-HERNÁNDEZ; MEANA, 2006). *Nosema* spp. são parasitas obrigatórios do tecido intestinal de abelhas europeias (*A. mellifera*) adultas (DE GRAAF et al., 1994), que causam infecções intestinais sistêmicas, contudo, os aspectos patogênicos da doença variam de acordo com a espécie afetada e com sua competência da resposta imune (FRANZEN; MÜLLER, 1999). Apesar de todas as castas de *A. mellifera* serem suscetíveis, as operárias são mais facilmente infectadas (PERNAL, 2012).

Os esporos de *Nosema* spp. têm cerca de 5-7 µm de comprimento e 3-4 µm de largura, contudo, *N. ceranae* (Figura 2B) é ligeiramente menor do que *N. apis* (Figura 2A). Eles são completamente ovais com uma borda escura. Seu conteúdo, consistindo de núcleo, esporoplasma e tubo polar, não pode ser visto (OIE, 2013).

Figura 2 Esporos de *N. apis* (A) e esporos de *N. ceranae* (B) vistos em microscópio de luz (Barras: 5 μ m).



Fonte: FRIES et al., 2006.

N. apis, normalmente, atinge sua incidência clínica máxima no outono, baixando ou até mesmo desaparecendo no verão. Já *N. ceranae*, não apresenta sazonalidade podendo ser identificada em amostras em qualquer época do ano (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007). Além de não apresentar sazonalidade, apresentam outras características que fazem o fungo de *N. ceranae* ser potencialmente mais perigoso que o de *N. apis*, como ocorrência em maior amplitude térmica, com preferência por temperaturas mais altas, também há uma maior resistência dos seus esporos no meio ambiente e sua reprodução produz maior carga de esporos (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007; FRIES, 2010; HIGES et al., 2013). Nos períodos com baixas temperaturas a transmissão é maior e a infecção tende a aumentar, visto que as abelhas operárias têm menos oportunidades para os voos de higiene e diminuem a frequência de forrageamento, forçando-as a defecar no interior da colmeia por onde os esporos são expulsos (OIE, 2013).

A estratégia de infecção desses microrganismos é única e complexa, sendo capaz de sobreviver fora da célula na forma de esporos

(WITTNER; WEISS, 1999). Eles são responsáveis pela transmissão da doença que ocorre através ingestão de esporos presentes no ambiente, no mel, água ou outros alimentos infectados ingeridos durante o forrageamento. Dentro da colmeia, ela pode ocorrer no momento da remoção de abelhas mortas ou doentes da colmeia, através do contato com fezes eliminadas pelo hospedeiro contaminado ou através do contato com abelhas infectadas esmagadas durante o manejo (HIGES et al., 2009, OIE, 2013). Esses esporos residuais, presentes no favo, podem continuar a infectar abelhas, mesmo após a limpeza e retomada de voos (PERNAL, 2012), já que os esporos eliminados nas fezes dos indivíduos doentes podem permanecer viáveis por um período maior que um ano (FRIES, 1993).

A infecção inicia quando as abelhas ingerem esporos de *Nosema* spp. Ao chegar ao trato digestivo, o esporo tem condições físicas e químicas ideais, o que promove sua germinação em aproximadamente 30 minutos. Ele, então, desenvolve um filamento longo que, através da injeção mecânica, penetra a membrana das células intestinais exteriores infectando-as (LARSSON, 1986, MUSSEN, 2011; OIE, 2013). Através do filamento, o esporoplasma infeccioso é introduzido no citoplasma da célula hospedeira onde ocorre a replicação do parasita e posterior produção de esporos (LARSSON, 1986). Os esporos começam a se multiplicar em grandes quantidades aproximadamente um dia após a infecção para *N. ceranae* e três dias após a infecção para *N. apis*, (FORSGREN; FRIES, 2010). A infecção coloniza gradualmente todo o intestino, dentro de 2 semanas (OIE, 2013), o que causa a dilatação do abdômen. Logo os esporos passam pelo reto e são liberados junto com as fezes (diarreia), podendo causar a contaminação de toda a colmeia (SINA et al., 2005; SOMERVILLE; HORNITZKY, 2007)

O esporo, ao penetrar as células do intestino, danifica o sistema digestivo das abelhas, estas ficam debilitadas e têm sua vida útil reduzida, prejudicando assim sua capacidade de realizar suas funções na colmeia como forrageamento, limpeza da colmeia, nutrição das crias, produção de mel e outros produtos (CHEN et al, 2008; HIGES et al, 2008; WHITAKER et al, 2011). As rainhas infectadas são, geralmente, substituídas, mesmo quando a infecção é leve. Quando toda a colmeia é infectada com *N. apis*, há grande probabilidade de ela morrer, pois as abelhas tornam-se lentas para construir na primavera e produzem pouco mel no verão. Os impactos de *N. ceranae* podem ser ainda mais graves (PERNAL, 2012), visto que essa espécie possui uma rápida capacidade para disseminar a infecção entre as células epiteliais, produzindo alta mortalidade (HIGES et al., 2007), o que promove uma redução na

longevidade das abelhas operárias em relação às abelhas infectadas por *N. apis* (PAXTON et al., 2007).

Os principais sintomas encontrados em colmeias com alta taxa de infecção de nosebose são: presença de diarreia nas paredes da colmeia, abelhas rastejando no alvado e no chão em frente à colmeia, abdômen dilatado e ausência de reflexo pungente (DGV, 2008).

2.1.5 *Varroa destructor*

O ácaro *V. destructor* é um ectoparasita obrigatório de abelhas pertencente à classe dos aracnídeos, ordem Mesostigmata, família Varroidae, gênero *Varroa* e espécie *V. destructor* (CRANE, 1978; OLDROYD, 1999).

Este ácaro foi relatado pela primeira vez em 1904 por Jacobsoni, que encontrou esses parasitas em abelhas da espécie *A. cerana* indica (Fabricius, 1798), na ilha de Java, Indonésia. Oudemans apresentou uma descrição detalhada do ácaro e o classificou inicialmente como *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904 (DELFINADO; BAKER, 1974). Posteriormente, outros ácaros semelhantes ao *V. jacobsoni* foram encontrados fora da sua área natural de distribuição (MATHESON, 1995), inicialmente, observados em abelhas selvagens e domésticas, em 1949, no sudeste Asiático, e mais tarde foram observados na Índia, Coréia e no extremo oriente asiático (DELFINADO; BAKER, 1974; MATHESON, 1995; OLDROYD, 1999). Na Ásia, durante a primeira parte do século XX, o ácaro mudou do seu hospedeiro natural *A. cerana* para *A. mellifera* e depois se espalhou pelo continente, atingindo a Europa na década de 70 (MATHESON, 1995), onde se espalhou rapidamente, atingindo mais tarde a América do Norte, América do Sul e África (MATHESON, 1995; OLDROYD, 1999).

O ácaro parasitário, inicialmente chamado *V. jacobsoni* e atualmente conhecido como *V. destructor* (ANDERSON; TRUEMAN, 2000), foi descrito como *V. jacobsoni* até o ano 2000. Contudo, em 1987, Delfinado-Baker e Aggarwal perceberam que a fêmea de *V. jacobsoni* que parasitava a abelha *A. cerana* indica era menor que o ácaro fêmea que parasitava a abelha *A. mellifera*. Então, esses mesmos autores afirmaram que existia mais de uma espécie de ácaro da *Varroa*, e que os ácaros encontrados, inicialmente, no sudoeste da Ásia, não eram os mesmos encontrados na ilha de Java (DELFINADO-BAKER; HOUCK, 1989). Mais tarde, através dos estudos de sequências de DNA, confirmou-se a hipótese, de Delfinado-Baker e Aggarwal, de que os ácaros encontrados nestas duas espécies de abelhas apresentavam muitas

diferenças entre si, existindo assim a necessidade de classificá-lo à uma nova designação taxonômica (ANDERSON; FUCHS, 1998). Desta forma, esta nova espécie foi nomeada como *V. destructor* Anderson e Trueman, 2000.

No Brasil, o ácaro *V. destructor* foi introduzido em 1972, por meio da importação de rainhas infestadas vindas do Paraguai. Entretanto, a praga foi identificada pela primeira vez somente em 1978, na região de Piracicaba, Estado de São Paulo (ALVES et al., 1979; DE JONG et al., 1984). Em menos de 10 anos, o *Varroa* se disseminou por todos os estados brasileiros que trabalhavam com *A. mellifera* sendo observado no país inteiro (DE JONG et al., 1984; MORETTO et al., 1991).

Na América do Norte, os ácaros foram observados, primeiramente, no estado de Wisconsin, em 1987. No ano seguinte, foi relatado em mais quatorze estados: Flórida, Illinois, Indiana, Maine, Michigan, Mississippi, Nebraska, Nova Iorque, Ohio, Pensilvânia, Carolina do Sul, Dakota do Sul, Washington e Wisconsin. A origem da introdução desse ácaro nos Estados Unidos é desconhecida, mas as possibilidades mais prováveis são que eles chegaram através de abelhas que entram da América do Sul ou através de abelhas rainhas que vieram ilegalmente da Europa ou da Ásia (DELFINADO; BAKER, 1974).

A varroose se encontra disseminada por várias partes do mundo. Em 1995, Baker e Peng afirmaram que climas temperados propiciavam condições ideais para o desenvolvimento do ácaro *Varroa*. Em algumas regiões temperadas da Europa foram relatadas perdas de até 100% das colmeias devido ao ataque desta praga (DE JONG et al., 1982). Em 1984, De Jong, Gonçalves, Morse, afirmaram que regiões de clima tropical e subtropical o ácaro apresentava níveis baixos de infestação. Contudo, na última década, observou-se um aumento nas taxas de infestação e, em algumas regiões brasileiras, as taxas se aproximam às observadas na Europa (CARNEIRO et al., 2007).

Os ácaros da espécie *V. destructor* podem causar diferentes níveis de danos, isto depende do nível de infestação dentro da colmeia (CRUZAT; BAASCH, 2009; JOHNSON, 2010). Um dos sintomas que é sinal de advertência da ocorrência de varroose é a presença de abelhas com asas deformadas, que não podem voar, além disso, elas têm seu abdômen e tamanho reduzidos até um terço do normal (CRUZAT; BAASCH, 2009), uma vez que esses ácaros sugam a hemolinfa das abelhas, causando danos físicos como a má formação dos órgãos ao diminuir o conteúdo de proteínas e, conseqüentemente, a redução do peso das abelhas, o que compromete a longevidade da população da

colmeia que lentamente, podendo chegar a um ponto em que não se encontra abelhas no seu interior (DUAY et al., 2003; CRUZAT; BAASCH, 2009). A população de ácaros pode prejudicar também a capacidade da rainha de reproduzir e ocasionar a morte das colmeias. Entretanto, em muitos casos, gera apenas perdas de produção, devido ao debilitamento geral da colmeia (CRUZAT; BAASCH, 2009; JOHNSON, 2010). Outro dano causado é o tóxico infeccioso, que se deve a transmissão de microrganismos causadores de doenças virais e bacterianas (CRUZAT; BAASCH, 2009).

É difícil estimar com precisão os danos econômicos causados pelo *Varroa* à indústria apícola. No entanto, pelo fato da varroose ser considerada a maior zoonose no contexto da apicultura de abelhas melíferas (SAMMATARO; GERSON; NEEDHAM, 2000; ROSENKRANZ; AUMEIER; ZIEGELMANN, 2010), pode-se dizer que ela causa perdas diretas na produção de derivados da apicultura e pode também causar quedas na produção hortifrutícola e na produção de sementes de hortaliças, forrageiras e oleaginosas, como consequência de uma baixa polinização entomófila, na qual a abelha é o inseto de maior efetividade (PELDOZA, 1992). O valor econômico estimado dos serviços prestados pelos polinizadores é de 153 bilhões de euros por ano em todo o mundo (GALLAI et al., 2009).

O ácaro *V. destructor* apresenta acentuado dimorfismo sexual, as fêmeas (Figura 3) adultas possuem coloração marrom avermelhada, corpo duro, forma ovalada, plana e achatada dorso-ventralmente. Suas dimensões são em média 1 mm de comprimento e 1,6 mm de largura (DE JONG, 1997; CRUZAT; BAASCH, 2009).

Figura 3 Vista dorsal de uma fêmea adulta de *V. destructor* parasitando uma pupa de abelha operária (*Apis mellifera*). A foto foi tirada em lente objetiva de microscópio (Nikon achromatic 10x 160/0.25).



Fonte: Adaptado de San Martin, 2010.

Os machos (Figura 4) têm coloração um pouco mais amarelada, corpo mole, forma arredondada. Eles são menores em tamanho, medindo entre 0,7 mm de comprimento e 0,7 mm de largura (CRUZAT; BAASCH, 2009; DE JONG, 1997).

Figura 4 Vista dorsal de um ácaro macho adulto de *V. destructor*. A foto foi tirada em lente objetiva de microscópio (Nikon achromatic 10x 160 / 0,25) com tubos de extensão de 100 mm + adaptador.

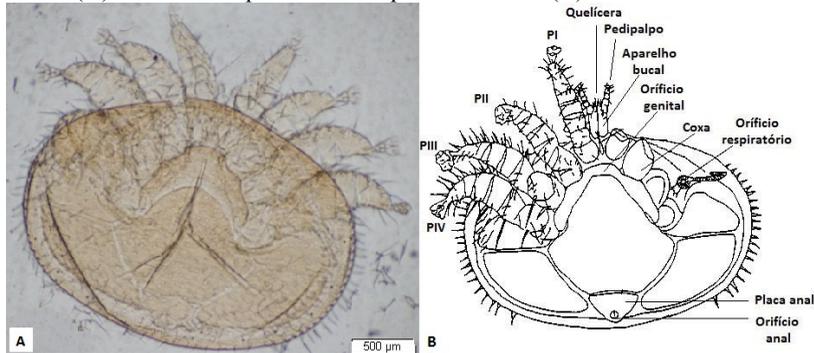


Fonte: Adaptado de San Martin, 2010.

Os ácaros desta espécie possuem 4 pares de pernas, as duas anteriores têm funções táteis e olfativas, e as outras têm função de locomoção (IICA, 2009). A fêmea apresenta quelíceras na parte externa

do seu aparelho bucal, elas são adaptadas para perfurar a quitina das abelhas (Figura 5A e 5B). Os machos não possuem quelíceras, elas são modificadas para o transporte de espermatóforos, já que não se alimentam. (DE JONG, 1997). Os indivíduos dessa espécie podem afetar as três castas de abelhas, desde crias até adultos, tendo preferência pelos zangões (IICA, 2009).

Figura 5 Imagem da fêmea do ácaro *V. destructor* observado em microscópio de fluorescência invertido modelo IX81 da marca Olympus®, com aumento de 10 vezes. (A). Desenho esquemático das partes do ácaro (B).



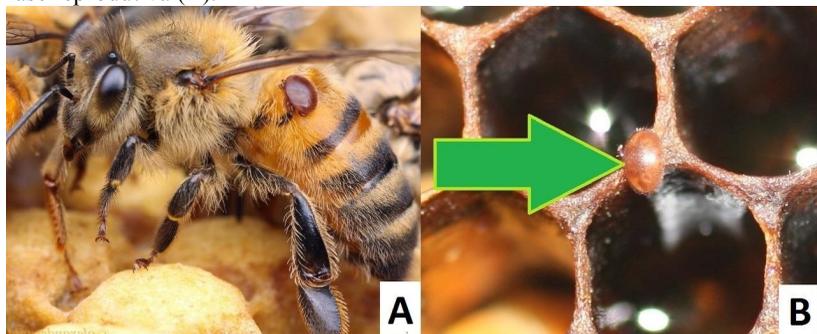
Fonte: Cardozo, 2014.

O ciclo de vida desse ácaro envolve dois estágios distintos: a fase forética, onde pode-se observar a fêmea do ácaro *Varroa* sobre o corpo de uma abelha adulta (Figura 6A). E a fase reprodutiva, onde a fêmea deixa o corpo da abelha adulta e procura uma célula de cria para se reproduzir (Figura 6B) (NAZZI; LE CONTE, 2016).

A invasão da célula com cria, que representa o início da fase reprodutiva do ácaro, ocorre algumas horas antes de uma célula, contendo uma larva de abelha, ser operculada (BOOT, CALIS, BEETSMA, 1992). As fêmeas desse ácaro são capazes de reconhecer os ferômonios liberados pelas larvas que estão próximas de empupar, elas utilizam esses compostos para encontrar seu alvo para alimentação e reprodução (NAZZI; LE CONTE, 2016). *V. destructor* entra em uma célula de cria de operária de 15 a 20 h antes que esta seja operculada e de 40 a 50 h antes que a célula de cria de zangão seja operculada (BOOT, CALIS, BEETSMA, 1992). Dentro da célula ela permanece adormecida, submersa no alimento da larva de abelha, entre a parede da célula e a larva (CASTILLO, 1992). Depois do alimento ser consumido, a fêmea se fixa ao corpo da pré-pupa e começa a sugar a hemolinfa e

deposita seus ovos na superfície da parede da célula (CASTILLO, 1992; NAZZI; LE CONTE, 2016).

Figura 6 Ácaro *Varroa* sobre o corpo de uma abelha – fase forética (A). Fonte: Alex Wild. Ácaro *Varroa* buscando células de larvas com idade de empupar – fase reprodutiva (B).



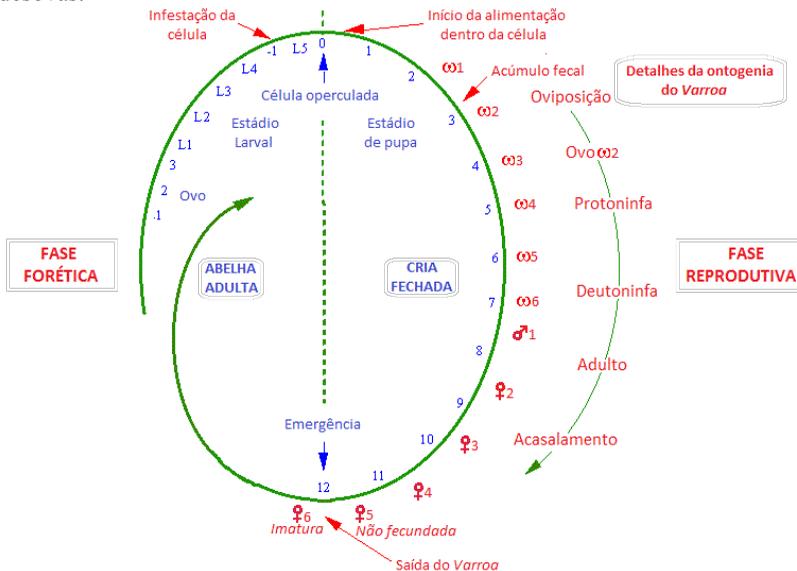
Fonte: Cardozo, 2014.

O desenvolvimento (Figura 7) do ácaro *Varroa* passa pelas fases de ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto (NEIRA, 1992). Nas células das operárias, essa espécie de ácaro é capaz de colocar até cinco ovos, e nas células dos zangões colocam até seis ovos (COLLISON, 2015).

Aproximadamente 60 horas depois que a célula de cria é operculada o ácaro fêmea coloca o primeiro ovo, que dará origem a um ácaro macho, os demais ovos serão colocados em intervalos de 30 horas e darão origem a ácaros fêmeas (IFANTIDIS, 1983). O ciclo completo de desenvolvimento demora cerca de 5½ dias nos machos e 6½ dias nas fêmeas (HARRIS; SHERIDAN; MaCGOWN, 2016), mas fatores como umidade relativa e temperatura podem fazer variar este período. Por isso, em células de abelhas rainhas, não é possível o desenvolvimento do ácaro *V. destructor*, já que elas permanecem operculadas por um tempo menor que 7 dias, o que impede o desenvolvimento dos ácaros (NEIRA, 1992). Ainda dentro das células, o ácaro macho acasala com ácaros fêmeas, sexualmente maduros, de modo que quando a abelha adulta emerge da célula, tanto a fêmea invasora como a fêmea adulta madura e já fertilizada deixam a célula. Os ácaros masculinos não sobrevivem fora da célula e morrem (NAZZI; LE CONTE, 2016). As fêmeas adultas, depois de fertilizadas, abandonam as células de cria fixadas ao corpo da abelha que irá emergir, vivendo sobre esta por cerca de uma semana (CRUZAT; BAASCH, 2009; HARRIS; SHERIDAN;

MaCGOWN, 2016), ou seja, passam para a fase forética antes de entrar em uma célula de ninhada para se reproduzir novamente. Os ácaros fêmea que não acasalaram produzirão apenas descendentes machos (SAMMATARO et al., 2000). O ciclo de vida do ácaro adulto é variável, vivendo em média de 2 a 3 meses no verão e 6 meses ou mais no inverno e outono (SCHLUCK, 1992). Os ácaros fêmeas podem passar por dois ou três ciclos reprodutivos ao longo de sua vida útil (NAZZI; LE CONTE, 2016).

Figura 7 Ciclo reprodutivo de *Varroa destructor* em *Apis mellifera*. Em azul: desenvolvimento da abelha - os números indicam os dias de célula operculada. Em vermelho: desenvolvimento do ácaro da varrose - a letra ômega indica as desovas.



Fonte: Adaptado de Cardozo, 2014.

O ácaro *V. destructor* mostra uma forte preferência pela cria de zangões. Nas colônias de *Apis mellifera carnica* (Pollman, 1879), por exemplo, a cria de zangão é infestada aproximadamente com oito vezes mais frequência que a cria de operária (GALLAI et al., 2009). Esta preferência pode ser devida à presença de maiores quantidades de compostos atrativos nas larvas de zangões (LE CONTE et al., 1989; TROUILLER et al., 1991) quanto nos alimentos larvários contidos nessas células (NAZZI, MILANI, VEDOVA, 2004), bem como à maior

duração do período de invasão (BOOT, CALIS, BEETSMA, 1992). Inversamente, as células da rainha são raramente invadidas por ácaros, sugerindo que essas células podem ser repelentes ao ácaro (CALDERONE; LIN; KUENEN, 2002). Um estudo de laboratório, seguido de uma validação de campo, mostrou que o ácido octanóico, abundante em geleia real e escasso em alimentos larvários de abelhas operárias e zangões, é repelente ao ácaro da *Varroa*, o que pode explicar a infestação reduzida nas realeiras (NAZZI et al., 2009).

Em quadro de cria, é comum encontrar larvas infestadas por dois, três ou mais ácaros, bem como muitas células que não estão infestadas. Esta observação ilustra que a distribuição do ácaro entre as células de cria não é aleatória, mas sim agregada (FLORIS, 1991)

O ácaro *Varroa* vive a uma temperatura correspondente à do ninho de abelhas, que é aproximadamente 34-35°C. Os bioensaios laboratoriais indicaram que *V. destructor* mostra uma clara preferência por temperaturas de aproximadamente 32 ° C ± 2,9 ° C (LE CONTE; ARNOLD, 1988).

A temperatura pode afetar a fisiologia do ácaro. Em um experimento realizado em condições laboratoriais, os ácaros se reproduziram a 34,5 °C, enquanto que nenhuma prole foi observada a 31,5 °C (CHIESA; MILANI; D'AGARO, 1989). Quando secções do favo de cria parasitado foram criadas em diferentes temperaturas, a maior taxa reprodutiva foi obtida entre 32,5 °C e 33,4 °C (LE CONTE; ARNOLD; DESENFANT, 1990).

As condições higrométricas também desempenham um papel importante, com umidade ótima para reprodução variando de 55% a 70%, umidades mais elevadas limitam a reprodução (KRAUS; VELTHUI, 1997). Em suma, os valores de umidade e temperatura ótima para a reprodução do *Varroa* combinam muito bem com aqueles encontrados dentro da colmeia, embora as temperaturas nos quadros de cria podem variar de 30,5 °C a 35,5 °C (BECHER; MORITZ, 2009) e a umidade é mais variável do que normalmente se pensa, variando nos diferentes locais da colmeia. Essa variação ocorre devido à fatores relacionados à população da colmeia e também pode depender dos fatores externos, como a disponibilidade de água (HUMAN; NICOLSON; DIETEMANN, 2006).

2.2 A CULTURA DA SOJA (*Glycine max*)

2.2.1 Soja

O cultivo de soja em larga escala iniciou nos Estados Unidos entre os anos de 1920 e 1930, onde ela era utilizada, principalmente, como um insumo para ração animal (HIN, 2002). No Brasil, ela só foi introduzida por volta de 1960 no estado do Rio Grande do Sul e, até meados de 1970, cerca de 80% da produção nacional concentrava-se na região Sul (SCHNEPF; DOHLMAN; BOLLING, et al., 2001). Desde então, seu cultivo vem se expandido para todo o território brasileiro e sua maior utilização é destinada à alimentação humana e animal e extração de óleo vegetal (MISSÃO, 2006).

Atualmente, o Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial de soja (USDA, 2016), sendo esta a principal commodity agrícola do país (CONAB, 2016). O Estado Unidos é o maior produtor mundial e a Argentina ocupa o terceiro lugar (USDA, 2016). Na safra 2015/2016 a produção de soja no mundo foi de 312,67 milhões de toneladas, desse total o Brasil foi responsável por 96,5 milhões de toneladas (USDA, 2016), com uma área plantada de aproximadamente 33.251,9 mil hectares, um crescimento de 3,48% em relação à safra 2014/2015. O Centro-Sul do Brasil apresentou a maior área cultivada, em torno de 28.797,4 mil hectares seguido pelo Norte-Nordeste, com 4.454,5 mil hectares (CONAB, 2016).

O cultivo de soja apresenta muitas limitações, dentre as principais, encontra-se a ocorrência de pragas, onde destacam-se os lepidópteros do gênero *Spodoptera* e os percevejos da família dos pentatomídeos, que causam danos tanto na cultura da soja como no milho (GOMEZ; ÁVILA, 2001; BRIDI, 2012). Tradicionalmente, o controle dessas pragas é realizado por meio de excessivas aplicações de inseticidas (CORTEZ; TRUJILLO, 1994), o que ocasiona aumento no custo de produção, atinge organismos não-alvo, favorece a seleção de linhagens de pragas com resistência aos inseticidas, além de apresentar consequências indesejáveis ao homem, aos animais e ao meio ambiente em termos de toxicidade (LOGUERCIO; CARNEIRO; CARNEIRO, 2002). Em função desses problemas, surgiram outras estratégias como, por exemplo, as plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos. Em 2009, mais de 14 milhões de produtores agrícolas em 25 diferentes países já cultivavam plantas resistentes a insetos, ocupando uma área de aproximadamente 134 milhões de hectares (JAMES, 2014) que vem aumentando a cada ano.

A soja é atualmente a oleaginosa mais produzida e consumida no mundo (DE SOUSA, 2012). Apesar de ser considerada uma planta autógama (RUBIS, 1970), ou seja, que se autopoliniza, a estrutura da sua flor oferece recursos florais às abelhas, o que favorece a polinização cruzada e promove aumento na produção (ERICKSON; GARMENT, 1979; CRANE; WALKER, 1983).

O comportamento de visita de polinizadores é influenciado pelas características florais, tais como a morfologia, características químicas e recompensas (VARASSIN; TRIGO; SAZIMA, 2001). Robacker et al. (1983) relataram em seus estudos que os fatores edafoclimáticos afetam o número, tamanho, período de abertura, coloração e também a produção de néctar das flores de soja. O néctar é considerado a principal recompensa para o polinizador (DELAPLANE; MAYER, 2000) e sua concentração de açúcares está associada a diferentes tipos de polinizadores, enquanto que a frequência e duração de visitas dependem da taxa de produção de néctar (BIERNASKIE; CATAR; HURLY, 2002; SHAFIR; BECHAR; WEBER, 2003; NICOLSON; NEPI, 2005). Entre as variedades de soja existem respostas diferentes à polinização, onde as flores de coloração branca são consideradas as mais atrativas, visto que secretam quantidades maiores de néctar (CHIARI et al. 2005) e de melhor qualidade, com sólidos solúveis em torno de 37% e em quantidades entre 0 a 0,15 μL (ERICKSON, 1975). Estudos realizados por Lopes (2008), mostram que a flor da soja apresenta em média 12,32 μL /flor de açúcares totais, dos quais 5, 85 μL /flor é de sacarose e 6,69 μL /flor de frutose. Segundo Canto et al. (2008) e Herrera et al. (2009), o tipo de polinizador pode afetar a composição do néctar, os quais induzem modificações na composição de açúcares no néctar, reduzindo a porcentagem de sacarose e aumentando a de frutose e glicose. Os mesmos autores observaram proporções desiguais de glicose e frutose em néctar de flores selvagens e de estufa, eles acreditam que isso se deve a atividade metabólica de leveduras provenientes do aparelho bucal dos polinizadores (BRYSCH-HERZBERG, 2004).

Juliano (1976), estudando a variedade de soja Santa Rosa, relatou um aumento no número de vagens de 37,95% e no peso médio das vagens de 39,85% em relação a soja livre de polinizadores. Nogueira-Couto e Pereira (1983) e Nogueira-Couto, Pereira, De Jong (1998), observaram um aumento na produção de vagens e sementes de 55,8% e 44,7%, respectivamente, na presença de *A. mellifera*. Erickson (1975), Abrams et al. (1978) e Erickson et al. (1978), encontraram um aumento de 5 a 20% na produção de soja com a colocação de colmeias de *A. mellifera* em experimentos com gaiolas. Issa et al. (1984), observaram

um aumento no número de vagens e sementes no tratamento com polinizadores em relação ao sem polinizadores. O aumento no peso das sementes foi de 81% para a variedade IAC- 5115 e de 9% para a variedade IAC-3, em relação ao controle. Moreti et al. (1998), trabalhando com polinização com *A. mellifera* em soja, observou que o número e peso de vagens e sementes foram maiores nas plantas cobertas com gaiolas de abelhas em relação as plantas ensacadas, livres da visita de polinizadores. As plantas de soja, v. IAC-114, mostraram aumento no número de vagens e sementes de 58,58% e 82,31%, respectivamente, quando visitadas pelas abelhas. Este trabalho concluiu que a introdução de *A. mellifera* para polinização pode elevar a produtividade em mais de 25%, principalmente devido ao aumento no percentual de vagens com três grãos. Chiari (2008), estudando a variedade BRS-133 de soja, observaram que o número de vagens por planta foi maior na área coberta por gaiola com abelhas (38,28%) e área livre (32,65%), quando comparado com o da área coberta por gaiola sem abelhas (21,19%). Ao fim do ciclo, obteve-se benefício na produção de grãos quando foi permitida a visita de abelhas. Ela chegou a 2.757,40 kg ha-1 em área coberta por gaiola com abelhas, e 2.828,47 kg ha-1 em área livre para visita de insetos, em ambas a produção foi superior à obtida em área coberta por gaiola sem abelhas (2.000,53 kg ha-1).

Moreti et al. (1998), trabalhando com soja, observou que esta espécie é atrativa para as abelhas melíferas e elas concentram seu forrageio na coleta de néctar no turno da manhã. Todas as colmeias utilizadas nesse trabalho, produziram mel ao final do florescimento (30 dias) e a produção média por colmeia foi de $10,1 \pm 0,86$ kg. Milfont (2012), estudando visitantes florais em soja, também observaram que as abelhas campeiras visitam as flores, preferencialmente, no período das 10 às 13 horas da tarde, sendo que a partir das 15 horas não se observou mais a visita desses polinizadores. O horário com maior temperatura, 12 horas, foi o que obteve o maior número de visitas por abelhas nas flores de soja. (ISSA et al., 1984). Nogueira-Couto (2000), observou que a abelha *A. mellifera* é o visitante floral mais frequente em flores de soja e o período de atividade de forrageamento pelas abelhas campeiras, está entre 7 e 15 horas, sendo que o horário de maior visita foi entre 11 e 13 horas. Segundo Jung et al. (2013), as condições climáticas interferem no comportamento das abelhas campeiras, sendo que elas têm preferência pelos períodos mais quentes e ensolarados do dia para a atividade de forrageamento, o que coincide com período de abertura das flores de soja.

2.2.2 Soja transgênica - Intacta RR2 PRO®

Somente em 1987, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas resistentes a insetos, devido à complexidade no processo de transformação, mediante a inserção de genes Cry recombinantes que codificam a síntese de proteínas inseticidas recombinantes. As primeiras plantas a receberem essa tecnologia foram as de tomate (proteína rCry1Ab) e tabaco (proteína rCry1Ac) (POLANCZYK; SILVA; FIUZA, 2003). Desde então, muitos genes rCry foram inseridos em diversas plantas como algodão, arroz, milho, batata, canola e soja (MACRAE et al., 2005; HOMRICH et al., 2008).

Em relação à soja, desde de 1990, tem se buscado alternativas para o controle de lagartas desfolhadoras, através do avanço da biotecnologia (BERNARDI, 2012). O primeiro relato de inserção bem-sucedida de um gene Cry em soja, ocorreu em 1994, com a proteína rCry1Ab (PARROTT et al., 1994). Posteriormente, foram desenvolvidas linhagens experimentais de soja que expressam a proteína Cry1Ac (HOMRICH et al., 2008).

A soja (*Glycine max* L. Merrill) Intacta RR2 PRO® produzida pela empresa Monsanto Ltda está liberada para cultivo comercial em vários países do mundo. Para obtenção da nova variedade de soja INTACTA RR2 PRO®, duas linhagens com eventos diferentes foram cruzadas para obter o evento de soja estaqueado MON 87701 × MON 89788 que expressa tanto a proteína inseticida rCry1Ac como a EPSPS. Segundo os proponentes da tecnologia, essa proteína tóxica rCry1Ac, expressa proteção às pragas-alvo primárias, como a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*, Hübner, 1818) e a lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*, Walker, 1857 e *Rachiplusia nu*, Guenée, 1852), broca das axilas, também conhecida como broca dos ponteiros (*Crociosema aporema*, Walsingham, 1914), lagarta das maçãs (*Heliothis virescens* Fabricius, 1781), supressão à lagarta do tipo Elasm (*Elasmopalpus lignosellus*, Zeller, 1848) e Helicoverpa (*Helicoverpa zea*, Boddie, 1850 e *Helicoverpa armigera*, Hübner, 1809), além de sua tolerância aos herbicidas a base de glifosato, proporcionado pela tecnologia Roundup Ready (RR), já presente na soja transgênica de primeira geração (AGROESTE, 2014).

No Brasil, o uso de transgênicos aumentou pelo menos 5 vezes nos últimos 12 anos. Em 2013, foram cultivados 26,9 milhões de hectares de soja transgênica, de acordo com a Céleres Consultoria, o que corresponde a 92,4% da área plantada com soja no País (EMBRAPA, 2014). O uso em larga escala pode representar um risco para a

biodiversidade pelos possíveis efeitos sobre organismos não-alvo, o que torna mais importante os estudos que avaliem tal interação (SILVA, 2013). Sabugosa-Madeira e Abreu (2009) argumentam que um dos fatores especulados para este declínio é a proteína Cry presente em plantas geneticamente modificadas, produzidas por genes recombinantes a partir de genes isolados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bt). Essas proteínas são nocivas aos insetos, visto que as abelhas estão expostas à essas toxinas através de diversas rotas. Desta forma, tais toxinas poderiam ser uma das causas da CCD.

2.2.2.1 Proteína Bt

O *B. thuringiensis*, comumente abreviado por *Bt*, facultativa aeróbico é uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete capaz de formar endósporos de vida longa (ENTWISTLE et al., 1993; DE MAAGD et al., 2003).

Esta espécie tem sido muito estudada e utilizada comercialmente há anos devido à sua capacidade de sintetizar proteínas com propriedades inseticidas (OECD, 2007). Foi na França, em 1938, que preparações de isolados naturais de *B. thuringiensis* foram usadas como agrotóxico comercial pela primeira vez (BERNARDES, 2011).

Atualmente, preparações microbianas de *B. thuringiensis* estão aprovadas para uso no mundo inteiro. Estas preparações contêm uma mistura de pesticidas microbianos que interagem extensivamente entre si para influenciar a toxicidade e especificidade de insetos (OECD, 2007).

As proteínas inseticidas produzidas por *B. thuringiensis* exibem uma variedade enorme no que diz respeito ao modo de ação, à especificidade do alvo, e o mecanismo de expressão (OECD, 2007).

Atualmente, são conhecidas inúmeras espécies de bactérias associadas a doenças em insetos (ALVES, 2011), mas nem todas apresentam as características desejáveis à aplicação do controle biológico de insetos-praga das plantas cultivadas (FIUZA, 2001). Entre essas bactérias capazes de exercer controle sobre insetos, o gênero *Bacillus* apresenta especial importância no controle biológico de pragas, destacando-se o *B. sphaericus* e o *B. thuringiensis* (PRIEST, 1992; CRICKMORE et al., 2016).

As proteínas inseticidas de *Bt* matam os insetos por um processo que inclui as etapas de processamento de solubilização do cristal, transformação para a forma ativa da protoxina, a aderência com os receptores do intestino médio e sua inserção irreversível na membrana

apical (JENKINS et al., 1999, WHALON; WINGERD, 2003) formando canais de íons ou poros. Estes poros causam a perda da regulação osmótica e lise da célula ocasionando a morte do inseto. Além disso, a morte do inseto também pode ocorrer em função de uma segunda causa associada à primeira, que é a multiplicação bacteriana na hemolinfa, determinando um processo septicêmico (GILL et al., 1992).

2.2.2.2 Ação inseticida de OGMs em organismos não-alvo

As espécies expostas às proteínas *Bt* por um longo tempo, mas que não são alvos diretos das culturas *Bt* (ANDOW; HILBECK, 2004) são definidas como organismos não-alvo. Estes organismos podem estar expostos às toxinas de plantas GM de forma direta quando estes insetos entram em contato direto com a proteína *Bt* através do consumo da planta ou de produtos das plantas, como néctar e pólen (NUNES, 2010) ou indireta, quando os insetos adquirem a proteína *Bt* através da alimentação de herbívoros ou pelo consumo do “honeydew” de insetos que se alimentaram da planta transgênica (GROOT; DICKE, 2002; FARIA et al., 2006).

O efeito de plantas geneticamente modificadas (GM) sobre organismos não-alvo é amplamente discutido pela comunidade científica. Muitos fóruns internacionais indicam a necessidade de avaliações dos possíveis impactos destes organismos geneticamente modificados, como o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança de Organismos Modificados, vinculado a Convenção sobre Diversidade Biológica, entre outros (CAPALBO et al., 2003). Segundo Kuiper et al. (2001), deve-se avaliar os possíveis riscos ambientais e efeitos na biodiversidade e no ambiente em que a variedade foi ou será liberada, avaliando caso a caso e considerando a modificação genética que a planta apresenta.

Bohn et al. (2008) observaram que *Daphnia magna* alimentadas com milho geneticamente modificado (GM), que expressa a *Bt*-toxina Cry1Ab (*Bt*-milho.) apresentaram maior mortalidade, a proporção de fêmeas que atingiu a maturação foi menor e a produção total de ovos foi menor em comparação com *D. magna* alimentadas com milho isogênico. Hilbeck et al. (1998) observaram que *Chrysoperla carneo* quando criados apenas em dieta artificial contendo toxina Cry1Ab, obtiveram mortalidade imatura significativamente maior (57%) do que no controle não tratado (30%). As larvas de *C. carneo* que receberam Cry1Ab durante seu desenvolvimento larval também morreram em maior quantidade (29%) quando comparado com o respectivo controle (17%).

Estes resultados demonstram que Cry1Ab é tóxico para *C. carneo* a 100 µmg/ml de dieta.

Ramirez-Romero et al. (2008) estudaram os efeitos da proteína Cry1Ab em abelhas e observaram que elas demoram mais para consumir o xarope contaminado. Além disso, as abelhas expostas a 5000 ppb de tiveram seu desempenho de aprendizagem Perturbado. As abelhas continuaram a responder a um cheiro condicionado mesmo na ausência de uma recompensa alimentar. Os resultados mostram que as culturas transgênicas que expressam proteína Cry1Ab a 5000 ppb podem afetar o consumo alimentar ou os processos de aprendizagem e, assim, pode afetar a eficiência da forragem de abelhas.

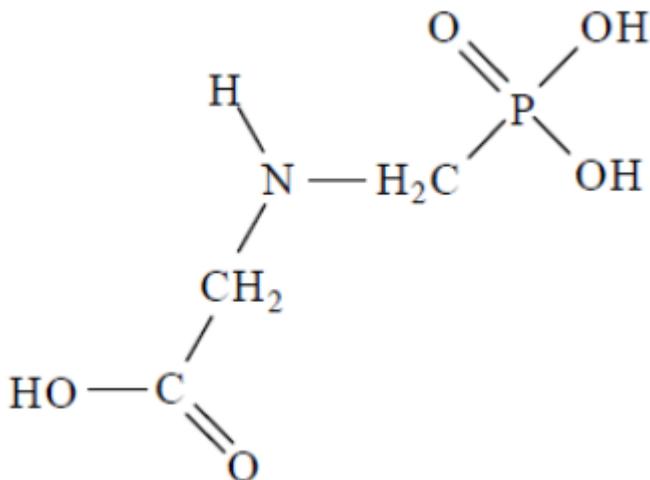
2.3 ROUNDUP®

O Roundup surgiu em 1970 com a síntese do glifosato, ingrediente ativo do herbicida. Ele foi registrado pela primeira vez em 1974 para uso na Malásia e no Reino Unido, dois anos depois foi registrado nos Estados Unidos. Em 1978 o produto chegou ao Brasil, ainda importado, para ser comercializado. No Brasil ele passou a ser produzido no ano de 1984. Atualmente, o Roundup tem registro em mais de 120 países, sendo o mais vendido no mundo para o controle de plantas daninhas em pré-plantio das lavouras (MOURA; MARIN, 2013).

Roundup® (480 g/L equivalente ácido; 648 g/L sal de isopropilamina de glifosato), desenvolvido pela Monsanto do Brasil Ltda., é um herbicida pós emergente, de ação sistêmica, não-seletivo e de amplo espectro de ação, utilizado no controle de plantas infestantes para uso exclusivo e seletivo em variedades de soja geneticamente modificadas, denominadas Soja Roundup Ready® (ROUNDUP READY®, 2015; ÇAGLAR; KOLANKAYA, 2008). Este herbicida está inserido na classificação toxicológica II (altamente tóxico), e na classificação à proteção do meio ambiente está inserido na classe III (produto perigoso ao meio ambiente) (ROUNDUP READY®, 2015).

Seu princípio ativo é o glifosato (N-fosfonometil-glicina), pertencente à classe dos organofosforados e ao grupo químico das glicinas substituídas. Apresenta fórmula molecular C₃H₈NO₅P com massa molecular relativa de 169,07 g/mol (ANVISA, 2010; ANDRIGHETTI, 2011; IARC MONOGRAPHS, 2015; ROUNDUP READY®, 2015). Além do glifosato, são adicionados à formulação outros ingredientes conhecidos como adjuvantes, a fim de aumentar a eficácia do herbicida (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

Figura 8 Fórmula estrutural do glifosato.



Fonte: Iarc Monographs, 2015.

O glifosato atua em plantas inibindo o seu crescimento através da interferência da produção de aminoácidos aromáticos essenciais. Ele inibe a atividade da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), responsável pela biossíntese do intermediário corismato, precursor na síntese e 3 (três) aminoácidos essenciais: fenilalanina, tirosina e triptofano (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000). Consequentemente, ocorre redução na síntese de proteínas cessando o crescimento e, eventualmente, ocorre rompimento e morte celular (ANADÓN et al., 2009). Os fabricantes do glifosato, consideram que ele é tóxico apenas para plantas e alguns microorganismos, visto que atua em uma via presente, exclusivamente, nestes organismos. Para os demais seres vivos como mamíferos, peixes, pássaros, répteis e insetos, ele é relativamente não tóxico, visto que estas formas de vida não dependem da rota do chiquimato porque retiram da dieta os produtos aromáticos que necessitam (MONSANTO, 1989; GRUYS; SIKORSKI, 1999).

Na ficha de informações de segurança de produtos químicos - FISPQ (2008), disponibilizado pela Monsanto, consta que a DL 50, 48 horas, oral e dérmica para abelhas é de 100 µg de equivalente ácido do glifosato/abelha.

2.4 EFEITO DOS AGROTÓXICOS SOBRE ABELHAS

Muitos autores citam os efeitos subletais dos agrotóxicos, não apenas os inseticidas, mas os herbicidas e fungicidas sobre os polinizadores. Eles podem prejudicar o desempenho das colmeias e a viabilidade a longo prazo das colmeias. Em muitos estudos, observou-se diferenças no crescimento, fecundidade, longevidade, comportamento (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007), índices de desempenho que incluem a taxa da massa da colmeia (FAUCON et al., 2005), na atividade de forrageamento (entrada e saída pelo alvado das colmeias) (DECOURTYE et al. 2004a), quantidade de cria produzida (FAUCON et al., 2005), capacidade de aprendizagem, como encontrar o caminho de volta para a colmeia (DECOURTYE et al., 2001, 2004a, 2004b, 2005; DECOURTYE; LACASSIE; PHAM-DELEGUE, 2003), a taxa de absorção de alimentos (RAMIREZ-ROMERO et al., 2008) e nível de atividade locomotora (LAMBIN et al., 2001). Alguns estudos também demonstram que esses polinizadores ficam mais suscetíveis ao ataque de doenças e pragas quando expostos a agrotóxicos. Outro fato observado é que a produção de mel e cera não depende apenas da disponibilidade de flores no ambiente, mas da qualidade dos alimentos que as abelhas coletam. Agora é claro que as flores contaminadas com pesticidas afetam a saúde das abelhas, na medida em que a sua produtividade diminui (KRUPKE; LONG, 2015). Além disso, a combinação de alguns fungicidas com inseticidas foi revelada mais mortal para as abelhas do que qualquer produto químico sozinho (JOHNSON et al., 2013).

Na maioria das vezes, a exposição das abelhas aos agrotóxicos é através da ingestão de resíduos encontrados no pólen e no néctar das plantas cultivadas ou das ervas daninhas ao redor dos campos que foram contaminadas (SÁNCHEZ-BAYO, GOKA, 2014). Os resíduos de agrotóxicos no pólen e no néctar são levados pelas abelhas forrageiras para as colmeias e permanecem no pão de abelha e no mel por algum tempo (ORANTES-BERMEJO et al., 2010). O alimento contaminado é oferecido às larvas e à rainha, que são afetadas em maneiras similares às abelhas campeiras. Além do alimento, as abelhas também bebem água para manter sua temperatura corporal sob controle (SCHMARANZER, 2000). Os resíduos de agrotóxicos no solo eventualmente se movem para a água e aparecem nos riachos, rios e lagoas próximas de áreas agrícolas (BELDEN et al., 2007). As abelhas gostam de beber de poças, fossos de irrigação, lagoas e riachos, e se

essas águas são contaminadas com resíduos de pesticidas, as abelhas forrageiras as ingerem também (SAMSON-ROBERT et al., 2014).

Embora os herbicidas sejam, muitas vezes, considerados inofensivos para as abelhas, muitas pesquisas mostram o contrário, visto que eles estão potencialmente biodisponíveis para as abelhas forrageiras a partir do pólen, do néctar e da água (TAPPARO et al., 2012; KRUPKE et al., 2012). Além disso, reconhece-se que a utilização extensiva e prolongada de herbicidas conduz a uma menor diversidade de plantas com flores (HALD, 1999; HYVONEN; SALONEN, 2002) o que afeta inevitavelmente as colmeias de abelhas e a sua produtividade (GOULSON et al., 2015).

Papaefthimiou et al. (2002), trabalhando com o herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) encontraram morte celular no átrio do coração de abelha (*Apis mellifera macedonica*) após exposição ao produto. Apenas 1 μM (micro mol) de 2,4-D foi necessário para reduzir a força e a frequência das contrações cardíacas em 70% em 20 minutos. Esta espécie de abelha foi muito mais sensível ao herbicida do que outros insetos testados, incluindo o besouro *Tenebrio molitor*, que exigiu mais de 1000 μM de 2,4-D para produzir o mesmo resultado. Em um estudo anterior, dez diferentes herbicidas foram oferecidos em alimentos (solução de sacarose a 60%) às abelhas para determinar seus efeitos na produção de cria. Picloram, 2,3,6-TBA e dicamba não apresentaram efeitos adversos a 1000 ppm, mas cloramben e dalapon causaram uma redução no desenvolvimento da ninhada e 2,4-D, 2,4,5-T, silvex, 2,4-DB e EPTC reduziram ou eliminaram gravemente a produção de ninhada (MORTON; MOFFETT, 1972).

A Argentina realizou um estudo ambiental em águas lixiviadas de lavouras de soja, no qual identificou o glifosato em concentrações entre 0,10 e 0,7 mg/L (0,10 e 0,7 ppm). Em sedimentos e em solos, os valores encontrados variaram entre 0,5 e 5,0 mg/kg (0,5 e 5,0 ppm) (PERUZZO; PORTA; RONCO, 2008). Sanchis et al. (2012), detectaram a presença do glifosato em 41% das 140 amostras analisadas de água subterrânea coletadas na Catalunia, Espanha. Annett, Habibi e Hontela (2014), reuniram diversas informações descritas em estudos ambientais, nos quais glifosato e AMPA (seu derivado) foram detectados na água superficial de diversos locais dos Estados Unidos, Canadá e França.

Neste sentido, é importante desenvolver estudos sobre os efeitos subletais inerente ao glifosato e aos adjuvantes presentes no produto comercial Roundup®, visto que ele é um dos produtos mais utilizados no mundo nos dias atuais, estando presente no meio ambiente.

2.5 ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL

As abelhas necessitam alimentar-se para suprir às exigências nutricionais de seu organismo. Os nutrientes requeridos são os mesmos requeridos por outros animais, isto é, água, carboidratos (açúcares), proteínas, vitaminas, sais minerais e lipídeos (ácidos graxos, esteróis), para sobreviverem (COUTO, 1998; PEREIRA et al., 2003). Quando as necessidades nutricionais não são satisfeitas, a capacidade reprodutiva e a produção são afetadas. É comum, também, que as abelhas migrem em busca de melhores condições, fazendo com que os apicultores percam seus enxames (PEREIRA et al., 2003; EPAGRI/PECA, 2011; PAULINO, 2013).

Os alimentos utilizados pelas abelhas podem ser naturais ou artificiais, esse último, geralmente, é fornecido em período de escassez de alimento (néctar e pólen) no campo (PAULINO, 2013),

Os alimentos naturais que satisfazem as exigências nutricionais das abelhas provêm, exceto a água, de dois produtos florais básicos: o pólen, que serve como fonte de proteínas, gorduras, vitaminas e minerais; e o néctar ou honeydew, utilizados para a produção do mel, o qual fornece os carboidratos (COUTO, 1998). Juntos, o mel e pólen fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento e à metamorfose larval e ao desenvolvimento e às funções dos adultos (STANDIFER et al, 1977; CHALMERS, 1980; WINSTON, 1987). A água também é um alimento natural e essencial para as abelhas, fazendo parte do metabolismo e sendo utilizada na diluição de alimentos concentrados (KÜHNHOZL; SEELEY, 1997).

Os alimentos artificiais podem ser obtidos de substâncias como a levedura inativada da cana-de-açúcar ou de cerveja, sumo de caju, xarope de açúcar, goma de mandioca, vagem de algaroba, proteína texturizada, farinha ou farelo de soja, entre outros (PEREIRA et al., 2003; EPAGRI/PECA, 2011).

A nutrição artificial torna-se uma medida determinante no êxito ou fracasso da atividade. Por isso, no período de poucas floradas, como por exemplo, entre o outono e o inverno, ou em períodos muito secos, chuvosos ou frios, deve-se fazer a alimentação artificial. Colmeias fracas, colmeias poedeiras em recuperação ou colmeias que sofreram divisão, também devem receber alimentação artificial para seu fortalecimento (PEREIRA et al., 2003; EPAGRI/PECA, 2011).

Há dois tipos de alimentação artificial, a de subsistência, rica em carboidratos, é utilizada visando suprir a falta de alimento natural, em épocas de pouca florada (ALBANEZ, 2010). Esse alimento é formado,

basicamente, por uma mistura de água e açúcar (ZAKARIA, 2007), o qual ajudará as abelhas a manter a temperatura da colmeia (ESPÍNDOLA et al, 2002). Para facilitar a digestão dos açúcares e evitar gastos energéticos, Guy, Huber e Huber (1992) comentam que deve ser oferecido "açúcar invertido", para as abelhas. Ele é obtido da hidrólise da sacarose em meio ácido, que forma glicose e frutose. Geralmente, acrescentam-se ácido cítrico (comercial ou suco de limão) ou tartárico para que ocorra a hidrólise (LEGLER, 2000; PEREIRA et al., 2006). O outro tipo de alimentação é a estimulante, que é composta por substâncias proteicas e energéticas. Ela deve ser realizada cerca de dois meses antes da época de florada para estimular a postura da rainha e, conseqüentemente, aumentar a população do enxame, principalmente no número de abelhas com idade de campeira (ALBANEZ, 2010).

Na escolha dos ingredientes para compor a alimentação suplementar para as abelhas (IOIRICH, 1986), deve-se escolher os alimentos com sabor e aroma agradáveis. Pesquisas demonstram que substitutos do pólen contribuem para que as colônias tenham um desenvolvimento adequado, quando oferecidos como uma dieta balanceada e de forma atrativa e palatável (LEGLER et al., 2000; CREMONEZ et al., 2002). Para isso, o nível de proteína bruta, do alimento artificial, deve ter, no mínimo, entre 20 e 25%, assim como o pólen, visto que a longevidade das operárias é influenciada pelo nível proteico (SOMERVILLE, 2000). Estudos demonstraram que a utilização de uma dieta artificial como fonte de proteína, durante o inverno, induziu um aumento na população de crias e de abelhas operárias (MATTILA; OTIS, 2006; AKYOL et al., 2006).

O farelo ou farinha de muitas commodities, como o milho, soja e trigo, tem sido utilizado como substituto do pólen. Castagnino et al. (2004), ofereceram um composto, finamente moído, de farelo de soja, farelo de milho e farinha de trigo na alimentação artificial de *A. mellifera*. Esse alimento foi considerado atrativo para as abelhas, visto que promoveu um aumento na área de cria da colmeia. Segundo Shimanuki e Hebert (1985), a farinha de soja é adequada à criação de larvas de abelhas quando oferecida como única fonte de proteína no alimento. Estudos realizados por Doull (1980), provaram que a alimentação com suplemento proteico aumenta a produtividade da colmeia. Dessa maneira, muitos apicultores e pesquisadores têm testado uma diversidade de suplementos alimentares na produção de dietas proteicas para as abelhas, como farelo ou farinha de soja, levedura de cana-de-açúcar, farinha láctea, farelo de trigo, farelo de glúten de milho, farelo de polpa de citros, entre outros (AZEVEDO-BENITEZ;

NOGUEIRA-COUTO, 1998; COUTO, 1998; LENGLER, 2000; CREMONEZ; JONG; BITONDI, 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os impactos da alimentação artificial proteica contendo farinha de soja geneticamente modificada (Intacta RR2 PRO®) e alimentação energética contaminada com o herbicida Roundup® sobre colônias de *A. mellifera*.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Detectar e confirmar a presença de proteína rCry1Ac na farinha de soja transgênica intacta RR2 PRO® e confirmar a ausência da mesma proteína em farinha de soja orgânica e convencional.

Hipótese: A farinha de soja transgênica apresenta proteína rCry1Ac na sua composição e as farinhas de soja orgânica e convencional não apresentam.

2. Avaliar o comportamento higiênico em colmeias submetidas à alimentação proteica com farinha de soja transgênica, convencional e orgânica.

Hipótese: As abelhas submetidas à alimentação com farinha de soja geneticamente modificada (Intacta RR2 PRO®) apresentam uma diminuição no seu comportamento higiênico devido aos efeitos sub-letais da proteína rCry1Ac.

3. Avaliar o comportamento higiênico em colmeias submetidas à alimentação energética com xarope de açúcar contendo Roundup®.

Hipótese: As abelhas submetidas à alimentação com xarope de açúcar contendo Roundup® apresentam uma diminuição no seu comportamento higiênico devido aos efeitos sub-letais do Roundup.

4. Avaliar a flutuação do grau de infecção de nosemose em colmeias submetidas à alimentação proteica com farinha de soja transgênica, convencional e orgânica.

Hipótese: As abelhas submetidas à alimentação com farinha de soja geneticamente modificada (Intacta RR2 PRO®) ficam mais susceptíveis ao ataque de nosemose, apresentando um aumento no grau

de infecção desta doença devido aos efeitos sub-letais da proteína rCry1Ac.

5. Avaliar a flutuação do grau de infecção de nosemose em colmeias submetidas à alimentação energética com xarope de açúcar contendo Roundup®.

Hipótese: As abelhas submetidas à alimentação com xarope de açúcar contendo Roundup® ficam mais susceptíveis ao ataque de nosemose, apresentando um aumento no grau de infecção desta doença devido aos efeitos sub-letais do Roundup.

6. Avaliar a flutuação do grau de infestação de varroose em colmeias submetidas à alimentação proteica com farinha de soja transgênica, convencional e orgânica.

Hipótese: As abelhas submetidas à alimentação com farinha de soja geneticamente modificada (Intacta RR2 PRO®) ficam mais susceptíveis ao ataque de varroose, apresentando um aumento no grau de infestação desta praga devido aos efeitos sub-letais da proteína rCry1Ac.

7. Avaliar a flutuação do grau de infestação de varroose em colmeias submetidas à alimentação energética com xarope de açúcar contendo Roundup®.

Hipótese: As abelhas submetidas à alimentação com xarope de açúcar contendo Roundup® ficam mais susceptíveis ao ataque de varroose, apresentando um aumento no grau de infestação desta praga devido aos efeitos sub-letais do Roundup.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no apiário experimental do Complexo da Cidade das Abelhas, localizado no bairro do Saco Grande, Florianópolis – SC, no período de abril a agosto de 2016. Foram utilizadas como unidade amostral 20 colmeias de *A. mellifera* com delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 (quatro) repetições. As análises de nosemose e varroose foram realizadas no Laboratório de Entomologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias (Labento) – CCA, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, localizado no bairro do Itacorubi, Florianópolis - SC. Para discutir os dados, foram utilizados dados climáticos brutos de abril a agosto 2016.

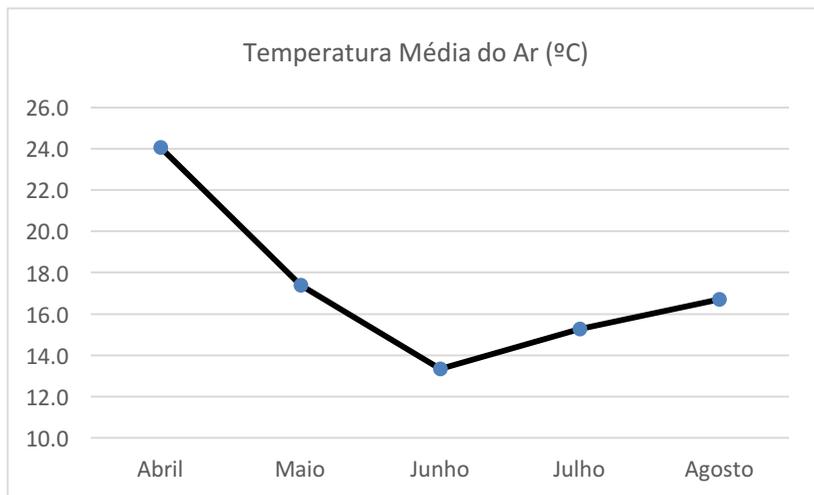
cedidos pela EPAGRI-CIRAM, da estação automática 1006 de Florianópolis.

4.1 DADOS METEOROLÓGICOS

Existem fatores, referentes ao clima, que afetam a visita da abelha às flores e a flutuação de doenças e pragas na colmeia como: temperatura, precipitação e umidade relativa.

O mês de abril apresentou as maiores temperaturas entre os meses de pesquisa (Figura 9). No mês de junho, observou-se as menores temperaturas, visto que é o mês de entrada na estação do inverno. Normalmente, ele possui as temperaturas mais baixas do ano. Em 2016, sua temperatura média foi de 13,3°C, sendo que a temperatura máxima observada no mês foi de 22,6°C e a mínima foi de 1,7°C. No mês de julho as temperaturas foram muito semelhantes à do mês anterior, mas com um leve aumento nas temperaturas. A temperatura média foi de 15,3°C, sendo que a temperatura máxima observada no mês foi de 28,5°C e a mínima foi de 3,7°C. No mês de agosto ela foi de 16,7°C, sendo que a temperatura máxima observada no mês foi de 30,6°C e a mínima foi de 4,4°C.

Figura 9 Temperatura média de abril a agosto de 2016 em Florianópolis.

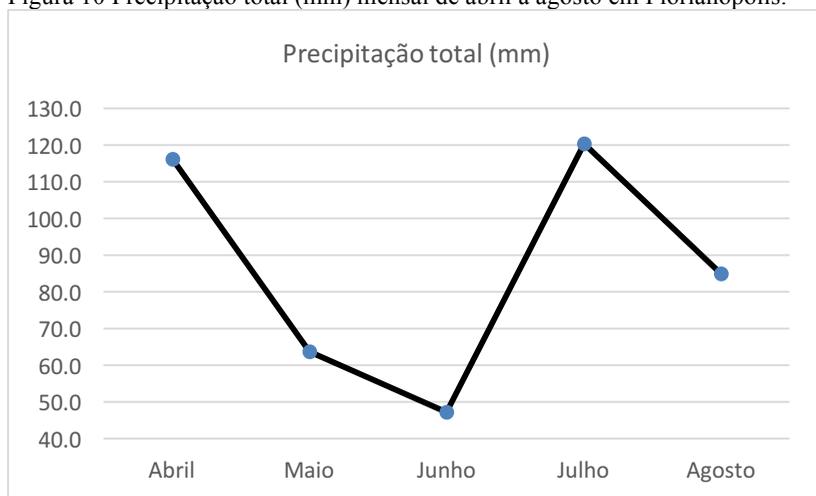


Fonte: EPAGRI-CIRAM.

O mês de abril apresentou a segunda maior precipitação total em relação aos meses de avaliação (Figura 10). Nesse mês foram

observados dez dias com precipitações, com soma total de 116,2 mm. O mês de maio teve quatro dias com precipitações, sendo sua soma total de 63,7 mm. O mês de junho apresentou a menor precipitação total entre os meses de avaliação, 47,2 mm. Normalmente, esse mês apresenta a menor precipitação total entre os meses do ano. Contudo, apesar de ter sido baixa, ela foi bem distribuída entre oito dias. O mês de julho foi o que obteve maior precipitação total, 120,4,7 mm. Entretanto, ela ocorreu em apenas quatro dias, diferente do que aconteceu no mês anterior. O mês de agosto onze dias com precipitações, sendo sua soma total de 63,7 mm.

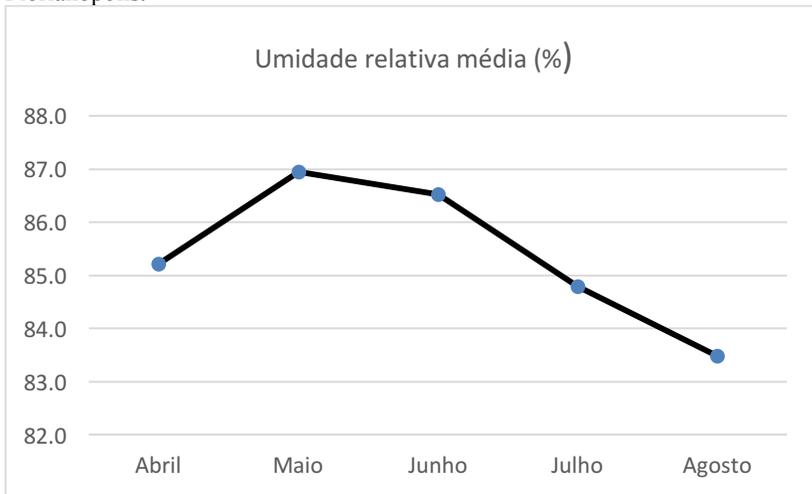
Figura 10 Precipitação total (mm) mensal de abril a agosto em Florianópolis.



Fonte: EPAGRI-CIRAM.

A umidade relativa média foi de 85,2%, no mês de abril, de 86,9% no mês de maio, de 84,8% de junho, de 86,5% no mês de julho e de 83,5% no mês de agosto (Figura 11).

Figura 11 Umidade relativa (%) média observadas de abril a agosto em Florianópolis.



Fonte: EPAGRI-CIRAM.

4.2 QUALIDADE DAS COLMEIAS DE *A. mellifera*

A avaliação da qualidade das colmeias foi realizada através da classificação populacional, adaptando-se a proposta sugerida por Sezerino (2014) em colmeias levadas aos pomares (Tabela 2). Nos meses em que a avaliação foi realizada no inverno (junho, julho e agosto), apenas levou-se em consideração a população de abelhas adultas e a quantidade de quadros com mel na colmeia, visto que nessa época a rainha diminui significativamente sua postura.

Tabela 2 Classificação de colmeias, de acordo com sua população de abelhas adultas, de cria aberta e fechada, e reservas de alimento energético.

Classificação	População de			Mel
	abelhas adultas		Crias	
Boa	8-10 favos	2-3,5 favos	1 favo com cria aberta	2 favos
	cobertos em ambas as faces	cobertos com crias	2,5 favos com cria fechada	
Regular	4-7 favos	1-1,75 favos	1/2 favo com cria	2 favos
	cobertos em ambas as faces	cobertos com crias	aberta 1,25 favos com cria fechada	
Ruim	1-3 favos	0-0,75 favos	1/4 favo com cria	2 favos
	cobertos em ambas as faces	cobertos com crias	aberta 1/2 favos com cria fechada	

Fonte: Adaptado de Sezerino, 2014.

4.3 PREPARO DO ALIMENTO ARTIFICIAL

Foram preparados cinco tipos de alimentos: xarope de açúcar invertido, sem adição de substância proteica (CT); xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica (CO); xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional (CC); xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica Intacta RR2 PRO® (CTR); e por último, xarope de açúcar invertido com resíduo de Roundup® (CR).

Para o preparo do xarope de açúcar invertido, foi utilizado açúcar cristal e água na proporção 2:1. A mistura foi levada ao fogo e, ao

levantar fervura, foram adicionados 5g de ácido tartárico. Esta mistura foi mantida em fogo baixo por mais 5 min. Depois do fogo ser desligado, deixou-se a mistura esfriar naturalmente. Quando fria, a mistura foi armazenada em garrafas plásticas de 5 L.

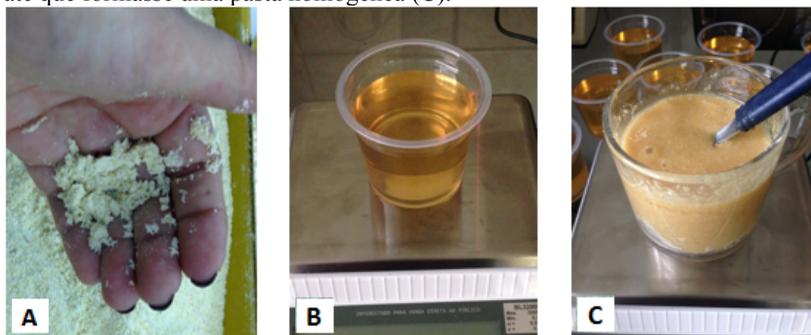
Para preparar o alimento proteico, foi realizada uma adaptação dos protocolos de trabalhos que realizaram alimentação *in vitro* de larvas de *A. mellifera*, para identificar os efeitos da proteína Cry sobre indivíduos dessa espécie. Visto que esses protocolos utilizaram larvas criadas em laboratório e as alimentaram individualmente com alimentos proteicos contendo proteína Cry purificada ou pólen de milho *Bt*. Esses trabalhos forneceram de 1,5 a 2 mg de pólen para cada larva (HANLEY; HUANG; PETT, 2003; HENDRIKSMA; HARTEL; STEFFAN-DEWENTER, 2011).

A farinha soja tem quantidade semelhante de proteína que o pólen de soja, entretanto, como o alimento não foi fornecido diretamente às larvas e, além disso, o alimento coletado pelas abelhas operárias não foi apenas destinado a alimentação das crias, mas também armazenado em alvéolos dos favos, o presente estudo foi realizado com a dosagem de 2 mg de farinha de soja por célula de cria, a mesma quantidade utilizada nos trabalhos realizados em laboratório com pólen de milho. Bizzocchi (2014), também utilizou esses valores quando trabalhou com alimentação de pólen de milho transgênico em colmeias à campo. As colmeias utilizadas continham, em média, 4 quadros de crias, sendo 2 de crias abertas e 2 de crias operculadas, no início do tratamento. Como cada favo possui 7200 células, para determinar a quantidade de pólen a ser fornecido por colmeia foi utilizado o seguinte cálculo: Quantidade de farinha de soja = 7200 (células)*2 (favos de cria aberta)*2 (mg de farinha), resultando em, aproximadamente, 30 g de farinha de soja por colmeia.

Os alimentos contendo farinha de soja, foram feitos na proporção 8:2 (80% de xarope de açúcar e 20% de farinha) e misturados até que formassem uma pasta homogênea (Figura 12). Então, para o preparo do alimento do tratamento CO, foram misturados 120 g de xarope de açúcar invertido com 30 g de farinha de soja orgânica comercial (marca Jasmine). No preparo do alimento do tratamento CC e CTR, foram misturados 120 g de xarope de açúcar invertido com 30 g de farinha de soja convencional e transgênica, respectivamente. Essas farinhas foram produzidas em laboratório, através da trituração de grãos de soja convencional e transgênica. Para isso, os grãos foram colocados em estufa para secar por 48 h a 50°C. Após a secagem, os grãos foram triturados, com ajuda de um liquidificador, até que formassem uma

farinha. Logo, foi colocada em saco plástico, identificada e armazenada em geladeira até o momento do preparo do alimento final. Após a produção de cada farinha, foram utilizadas tiras do kit QuickStix da Envirologix para detecção ou não de proteína Cry1Ac nas farinhas de soja transgênica e convencional. Para tanto, 10 g, de cada farinha, foram diluídas em 35mL de água destilada. As amostras foram agitadas e deixadas em repouso por 20-30 segundos. Em seguida, foram extraídos cerca de 2 mL do sobrenadante de cada amostra e foram colocados em tubos de reação, onde foi introduzida uma tira uma por tubo. A amostra subiu por capilaridade na tira e a interpretação dos resultados foi realizada após 10 min.

Figura 12 Preparo do alimento contendo xarope de açúcar e farinha de soja. Foram misturados 30g de farinha de soja (A) em 120g de xarope de açúcar (B) até que formasse uma pasta homogênea (C).



Fonte: Cardozo, 2017.

Neste trabalho, optou-se utilizar o produto comercial Roundup® solúvel (480 g e.a. L⁻¹) (Monsanto), ao invés de apenas glifosato, por que o objetivo foi simular o que ocorre à campo e observar os efeitos subletais inerentes a formulação comercial de herbicida a base de glifosato, que contém outros componentes além do princípio ativo.

Para preparar o alimento do tratamento CR, foi diluído 1,5 µL de Roundup® solúvel (480 g e.a. L⁻¹) (Monsanto), em 200 mL de xarope de açúcar invertido. Essa quantidade, de Roundup®, diluída no xarope de açúcar, equivale a aproximadamente 0,7 mg. L⁻¹ de produto ativo de glifosato. Esta quantidade foi identificada e aferida, por Peruzzo et al. (2008), em águas lixiviadas de plantações de soja, o que sugere que esta concentração pode estar presente no néctar dessas plantas. Este valor não excede os valores (0 a 3,7 mg. L⁻¹) utilizados por Hebert et al. (2014), para avaliar os efeitos subletais desse herbicida, nem excede os

valores (1,4 a 7,6 mg a.e. L⁻¹) recomendados para o controle de ervas daninhas aquáticas e terrestres ou aqueles medidos em ambientes naturais (GOLDSBOROUGH; BROWN, 1988, FENG; THOMPSON; REYNOLDS, 1990; GIESY; DOBSON; SOLOMON, 2000).

4.4 FORNECIMENTO DO ALIMENTO PROTEICO PARA AS ABELHAS

A primeira alimentação foi realizada no dia 07 de abril de 2016. Ela foi repetida a cada 7 dias, por três vezes, para simular o tempo de floração da soja e a contaminação por Roundup® no período.

Os alimentos foram despejados em alimentador de cobertura e sobre eles foi colocado uma pitada de baunilha para aumentar a palatabilidade das abelhas. Além do alimento proteico, as colmeias tiveram à sua disposição água, em bebedouro coletivo. Depois da introdução dos alimentos verificou-se a aceitação a partir da avaliação da presença ou não de restos de xarope de açúcar ou farinha nos alimentadores.

Nos tratamentos contendo farinha de soja, foram instalados coletores (Figura 13) de pólen na entrada das colmeias impedindo, assim, a entrada de pólen externo para garantir que as abelhas consumissem apenas o alimento fornecido.

Figura 13 Colmeia do tipo Langstroth com coletor de pólen encaixado no alvado.



Fonte: Cardozo, 2017.

4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO

A avaliação do comportamento higiênico (CH) das abelhas foi realizada utilizando o método descrito por Newton e Ostasiewski (1986) e modificado por Gramacho e Gonçalves (1994). Foram realizadas cinco avaliações por colmeia, uma antes da introdução dos tratamentos (tempo 0) e outras 30, 60, 90 e 120 dias após a introdução.

Um quadro contendo crias operculadas de operárias com idade entre 10 e 14 dias (pupa de olho rosa) foi selecionado e nele foram delimitadas duas áreas, sendo uma área para perfuração e a outra área para controle, sem perfuração, cada uma contendo cerca de 100 células operculadas (10 linhas x 10 colunas). As células vazias encontradas nas áreas selecionadas foram contadas para realizar o ajuste na porcentagem. Na área de tratamento, as células foram perfuradas no centro, introduzindo-se até o fundo da célula um alfinete entomológico nº 02, para que as crias fossem mortas. Na área delimitada para o controle as células de cria operculada foram contadas e mantidas intactas.

Após a perfuração, o quadro foi devolvido à colmeia de onde foi retirado e, após 24 h, foi realizada a contagem de células vazias tanto na área perfurada como no controle.

Para realizar o cálculo da porcentagem do comportamento higiênico, primeiro foi calculado o fator de correção “Z” (MORETTO, 1993), que corresponde à taxa de remoção natural de crias da área controle. O valor de Z foi descontado do valor das crias removidas nas áreas tratadas. O valor estimado para o CH da colmeia foi considerado somente quando o fator de correção Z, da área controle, foi igual ou menor que 10%. Caso contrário, o teste não foi validado, visto que a remoção das crias que foram mantidas intactas, podem ter sofrido danos por alguma doença ou parasita existente na colmeia ou por alguma outra causa independente da perfuração.

Foram realizadas cinco avaliações por colmeia, uma antes da introdução dos tratamentos (tempo 0) e as outras 30, 60, 90 e 120 dias após a introdução.

A fórmula de estimativa do fator de correção Z utilizada foi:

$$Z = (Y \times 100) / A \quad (A)$$

$$Y = C - B \quad (B)$$

Onde:

Z = Porcentagem de células onde a cria operculada foi removida naturalmente no controle;

A = Número de células operculadas no controle antes da avaliação;

Y = Número de células onde a cria foi removida naturalmente no controle,

C = Número de células vazias na área controle após 24 h;

B = Número de células vazias na área controle antes da avaliação.

Para a avaliação do CH, foi utilizada a seguinte fórmula, baseada em Gramacho e Gonçalves (1994):

$$CH = [CV(\text{após } 24h) - CV(\text{zero h}) / CO(\text{zero h})] \times 100 - \text{Fator Z}$$

Onde:

CH= comportamento higiênico

CV(após 24h)= número de células vazias 24 horas após a perfuração

CV(zero h)= número de células vazias antes da perfuração

CO= número de células operculadas antes da perfuração

Fator Z=Fator de correção de Moretto (1993) obtido da área controle

4.6 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Nosema* spp.

A diagnose da presença de *Nosema* spp. foi realizada de acordo com o protocolo de monitoramento para avaliação de noserose proposto pelo Laboratório de Artrópodos da Facultad de Ciencias Exactas y Naturales da Universidad Nacional de Mar del Plata (2006). Este protocolo é baseado na técnica de Cantwell (1970) modificada por Del Hoyo e Rodrigues (1997).

A amostragem foi realizada somente em dias ensolarados e com pouco vento. O alvado da colmeia foi fechado para não permitir a

entrada ou saída das abelhas da colmeia. Esta técnica permite a coleta apenas de abelhas campeiras, ou seja, abelhas mais velhas, já que as mais novas podem não ter tido tempo de se infectarem. Depois de alguns minutos as abelhas campeiras, que regressavam à colmeia, se acumulavam na entrada no alvado. Foram coletadas, no mínimo, 80 indivíduos por amostra, para estimar o nível global de infecção. A coleta foi realizada com ajuda de uma vassoura própria para apicultura e as abelhas foram armazenadas em frascos plásticos contendo álcool 96° e formaldeído a 4% até o momento da avaliação e identificados com local e data. Foram realizadas cinco avaliações por colmeia, uma antes da introdução dos tratamentos (tempo 0) e outras 30, 60, 90 e 120 dias após a introdução.

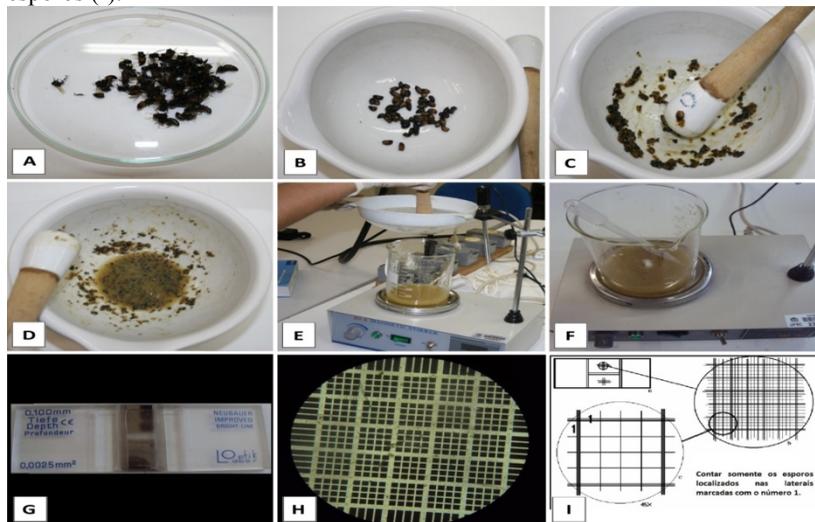
Para a quantificação de esporos as abelhas foram separadas da solução de álcool e formaldeído com ajuda de uma peneira. Em seguida, foram separados 60 abdomens das abelhas sem que fossem comprimidos, estes foram macerados em um cadinho de porcelana com 20 ml de água destilada até que formassem uma massa. Este macerado foi filtrado com ajuda de uma peneira, para que restassem somente os tecidos mais grandes. Logo foi adicionando mais 40 mL de água destilada sobre os restos de tecidos que ficaram na peneira. O conteúdo foi novamente comprimido para que o maior número de esporos passasse à solução. No total, foram utilizados 60 mL de água destilada, 1 mL para cada abdômen.

A solução resultante do macerado foi colocada em agitador por pelo menos 1 min, para que os esporos ficassem distribuídos de forma homogênea.

A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer. As bandas laterais da câmara foram molhadas e no centro da câmara foi colocado uma lamínula. Em seguida uma alíquota de 10 μ L da solução homogênea foi colocada, com auxílio de uma pipeta de plástico descartável, enchendo o primeiro lado da câmara, o procedimento foi repetido para encher o outro lado. Após a adição da solução na câmara de Neubauer, a amostra descansou por um min, para permitir a sedimentação dos esporos. Em seguida, a câmara de Neubauer foi colocada em microscópio óptico, com aumento de 40x.

A contagem dos esporos foi feita em apenas cinco quadrados grandes (quatro cantos e central), quando havia uma média de pelo menos um esporo por quadrado pequeno da câmara, e quando havia menos esporos, todos os quadrados grandes foram contados. A contagem dos esporos foi feita dentro dos quadrados e nas linhas que ficavam à esquerda e acima do quadrado.

Figura 14 Procedimento realizado para análise de nosemose em *A. mellifera*. 60 abelhas separadas da amostra (A). Abdômenes separados do restante do corpo (B). Maceração dos abdômenes em cadinho de porcelana (C e D). Macerado sendo peneirado (E). Solução resultante do macerado em agitador (F). Câmara de Neubauer (G). Imagem dos 25 quadrados grandes da câmara, vistos em microscópio óptico (10x) (H). Imagem do procedimento de contagem dos esporos (I).



Fonte: Cardozo, 2017.

A abundância foi obtida por meio da seguinte fórmula:

Abundância = Esporos/abelha = n° esporos contados x 50.000
(para 5 quadrados grandes contados).

Abundância = Esporos/abelha = n° esporos contados x 10.000
(para 25 quadrados grandes contados).

Depois de avaliar as duas hemicâmaras, de cada amostra, foi feita a média de abundância:

Abundância (esporos/ml) = (N° esporos na hemicâmara 1 + N° esporos na hemicâmara 2) / 2.

A prevalência de cada amostra foi obtida a partir de uma subamostra de 20 abelhas de cada colmeia. De cada abelha,

individualmente, foi retirado o ventrículo com ajuda de uma pinça, onde o ferrão foi puxado até que o ventrículo fosse completamente retirado. Este foi macerado em 0,5 mL de água destilada, na própria lâmina, onde foi coberto por uma lamínula e observado em microscópio óptico com aumento de 40x. As amostras foram avaliadas com presença muito alta – quando havia uma concentração muito alta de esporos por toda a lamínula, o aglomerado era tanto que dificultava a observação de apenas um esporo; alta – quando havia uma concentração grande de esporos por toda a lamínula; média – quando havia aglomerados de esporos em algumas partes ou uma concentração baixa por toda a lamínula; baixa – quando havia muito poucos esporos ao percorrer a lamínula; ou ausência de esporos. A lamínula foi percorrida e observada como um todo para fazer a classificação da concentração de esporos.

De acordo com Jaycox (1980), a severidade da doença se estima como mostra a tabela 3.

Tabela 3 Intensidade de infecção de *Nosema* spp. em *Apis mellifera*.

Intensidade de infecção	de	Nº de esporos (milhões/abelha)
NULA		< 0.01
MUITO BAIXA		0.01 - 1.00
BAIXA		1.00 - 5.00
REGULAR		5.00 -10.00
SEMISEVERA		10.00-20.00
SEVERA		> 20.00

4.7 AVALIAÇÃO DA INFESTAÇÃO POR *Varroa destructor*

Para avaliar o nível de infestação de *V. destructor* em abelhas adultas foram coletadas aproximadamente 300 abelhas presentes sobre três ou mais quadros diferentes de cada colmeia. Estas foram armazenadas em recipiente de plástico contendo álcool 70%, fechados e etiquetados (SEZERINO, 2014). Foram realizadas cinco avaliações por

colmeia, uma antes da introdução dos tratamentos (tempo 0) e outras após 30, 60, 90 e 120.

As amostras de abelhas foram levadas ao Labento, o conteúdo de cada uma foi despejado em bandeja plástica, com mais um pouco de álcool e, em seguida, foi agitado por pelo menos três vezes para a liberação dos ácaros do corpo das abelhas. Posteriormente, os ácaros foram coletados e colocados sobre placa de Petri® onde foram contabilizados. As abelhas de cada amostra também foram contadas e registradas, sendo posteriormente determinado o nível de infestação de cada colmeia (SEZERINO, 2014).

Figura 15 Procedimento para diagnose e monitoramento de *V. destructor* em *A. mellifera*.



Fonte: Cardozo, 2014.

A seguinte fórmula foi utilizada para determinar o nível de infestação de ácaros sobre as abelhas adultas:

Índice de infestação em abelhas operárias adultas (%) = $(N_{Ac}/N_{Ab}) \times 100$ Onde:

N_{Ac} = Número de ácaros adultos (A)

N_{Ab} = Número de abelhas (B)

Para avaliar o índice de infestação do ácaro *V. destructor* em crias de abelhas operárias adaptou-se o método utilizado por De Jong e Gonçalves, (1981). De cada colmeia, foi retirado um pedaço de favo (5x10 células) contendo cria operculada (fase de pupa) em ambos os lados. O pedaço de favo foi armazenado em sacos plásticos, devidamente identificados, e foram mantidos congelados até o momento da avaliação.

Os sacos contendo os pedaços de favos foram retirados do congelador 30 min antes da avaliação. Com auxílio de uma pinça, 100 células (50 de cada lado do favo) foram abertas para a retirada das pupas, contando-se o número de ácaros presentes em cada célula. Após a retirada das pupas, o favo foi colocado sobre uma bandeja branca e cada célula foi lavada com água com auxílio de uma piceta. Depois de lavado, batia-se o mesmo, para auxiliar na liberação dos ácaros das células. Esse processo foi repetido por, pelo menos, 5 vezes ou até que não fossem mais liberados ácaros das células.

$$\text{Índice de infestação em crias de operárias (\%)} = \frac{N_{Ac}}{N_{Ab}} \times 100$$

Onde:

$$N_{Ac} = \text{Número de ácaros adultos} \quad (A)$$

$$N_{Ab} = \text{Número de crias desoperculadas} \quad (B)$$

Segundo Harris, Sheridan e MacGown (2016) o índice tolerável de infestação de *Varroa*, sem causar danos econômicos nas colmeias, é cerca de 15% em abelhas no período do verão. Estes autores consideram que um terço dos ácaros se encontram em abelhas adultas e os outros dois terços estão nas crias e estabeleceram que o índice tolerável é de 3,6-5,1% em operárias adultas ou de 7,2-10,2% em crias de operárias durante o verão.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por se tratar de populações e não de um único indivíduo e pelo fato de que dentro de uma população existem variações genéticas entre os indivíduos, as unidades amostrais não foram consideradas homogêneas. Sendo assim, para que essas variações não interferissem nos resultados, foram realizadas coletas de dados antes e depois da

aplicação dos tratamentos. Portanto, os dados utilizados na realização das análises estatísticas foram submetidos a seguinte fórmula:

$$VF = VDT - VAT;$$

Onde:

VF = valores utilizados para a realização das análises estatísticas (A)

VDT = valores coletados depois da aplicação dos tratamentos (B)

VAT = valores coletados antes da aplicação dos tratamentos (C)

As variáveis analisadas foram índice de comportamento higiênico, índice de infestação do ácaro *V. destructor* em crias de operárias e operárias adultas e intensidade de infecção do fungo *Nosema* spp. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o Sistema de Análise Estatística – Assistat Software Version 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2009). Quando os dados não se apresentaram normais pelo teste Shapiro-Wilk, mesmo depois de sua transformação, eles foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para a comparação das médias.

5 RESULTADOS E DICUSSÃO

5.1 QUALIDADE DAS COLMEIAS

De acordo com a classificação das colmeias proposta por Palácios (2011) e adaptada por Sezerino (2014), as colmeias utilizadas para iniciar este trabalho, em abril (antes da introdução dos tratamentos), encontravam-se em condições entre regular e boa. A maioria das colmeias que apresentaram condição regular no mês de abril, deve-se ao fato que elas foram transferidas de núcleos para colmeias no mês antecedente ou foram formadas a partir de colmeias fortes no mesmo período que a transferência de núcleos.

Durante a avaliação realizada no mês de maio, observou-se que as colmeias CT4 e CR1 haviam perdido suas rainhas. Não se pode afirmar se a perda ocorreu devido a introdução dos tratamentos, pela substituição natural das rainhas ou pela perda da rainha durante o manejo. Nesse momento, não se observou diferenças na quantidade de abelhas e não foi necessário nenhum tipo de intervenção para a

produção de uma nova rainha nessas colmeias, as abelhas operárias puxaram realeiras e produziram outra naturalmente. No mesmo período, a colmeia CTR4 deixou de ser classificada como boa e passou a ser classificada como regular. Isso ocorreu devido ao ataque de formigas do gênero *Camponotus*, que atacam as colmeias consumindo pólen, mel, matando e consumindo crias e até mesmo abelhas adultas. Para solucionar o problema, foram colocadas armadilhas com óleo queimado nos pés dos cavaletes de todas as colmeias.

No mês de junho, observou-se uma diminuição no número de abelhas operárias e na postura das rainhas, por isso muitas delas passaram a ser classificadas como regulares. É normal que isso ocorra quando as temperaturas diminuem e o alimento no campo se torna escasso, o que corrobora com os dados meteorológicos observados, visto que este foi o mês mais frio registrado no ano.

Em algumas colmeias, as rainhas diminuíram tanto a postura, que se sugeriu a perda da rainha. Contudo, uma ou duas semanas depois foi observado uma postura baixa, mas uniforme e/ou foi vista a própria rainha. Durante o mês de junho, observou-se também que as colmeias CC3, CTR1, CR2 e CR4 haviam perdido sua rainha e a quantidade de abelhas operárias havia diminuído. As colmeias CC3 e CTR1 puxaram realeiras naturalmente, logo após a perda da rainha. As colmeias CR2 e CR4 não puxaram novas realeiras, devido a postura das rainhas estar muito baixa, além do número reduzido de abelhas operárias. Neste caso, foram introduzidos quadros com ovos das colmeias que possuíam o mesmo tratamento, o que possibilitou a formação das realeiras e a emergência de novas rainhas. A colmeia CTR4 não conseguiu se reestabelecer do ataque de formigas e passou a ser classificada como ruim.

As colmeias CTR1, CTR3, CR1 e CR3 ficaram sem rainha no mês de julho. Nesse período a postura da rainha estava muito baixa ou nula e com um número reduzido de abelhas. Devido a isso, as abelhas operárias destas colmeias, não conseguiram produzir novas rainhas naturalmente. Desta forma, foram introduzidos quadros com ovos, da mesma forma que foi realizado no mês anterior. A colmeia CR1 não conseguiu formar rainha mesmo com a introdução de um quadro com ovos. Sendo assim, foi introduzido um quadro com ovo/semana, até que uma nova rainha fosse formada.

Além da colmeia CR1, que já estava sem rainha, observou-se que as colmeias CR2, CR4 e CC4 também estavam sem rainha durante as avaliações do mês de agosto. A técnica da introdução de quadros, do mesmo tratamento, foi realizada até que as colmeias puxassem realeiras

e produzissem novas rainhas. As colmeias com tratamento CR puxavam realeiras, produziam novas rainhas, mas logo essa era trocada e as operárias faziam o processo novamente. Demorou algumas semanas para que uma nova rainha produzida começasse a ovipositar. As colmeias CR2 e CR4, mesmo com muito esforço, se tornaram zanganeiras e não foi possível a formação de uma nova rainha. Na colmeia CC4 foram necessárias diversas tentativas de introdução de quadros com ovos, até que as operárias produzissem uma nova rainha. É possível que a perda das rainhas nessas colmeias se deva aos efeitos subletais dos resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos introduzidos.

Nas colmeias, exceto com tratamento CR, observou-se um aumento na postura da rainha no mês de agosto, que mesmo sendo baixo, foi uniforme. Isso ocorreu, principalmente, pelo aumento das temperaturas.

Durante os meses de avaliação, observou-se que as colmeias com tratamentos CC, CTR e CR começaram a apresentar uma postura desuniforme e apresentavam muitas crias mortas. Essas observações foram muito evidentes nas colmeias com tratamento CR. Outro fato importante que foi observado, foi que em colmeias que ficaram com a postura desuniforme após a introdução dos tratamentos passaram a ter postura uniforme novamente quando trocaram a rainha por algum motivo. Depois disso, o número de crias mortas observadas também diminuiu.

Tabla 4 Classificação da qualidade das colmeias do apiário experimental da Cidade das Abelhas, Saco Grande, Florianópolis, do período de abril a agosto de 2016.

Tratamentos	Meses de avaliação				
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto
CT1	Boa	Boa	Regular	Boa	Boa
CT2	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
CT3	Regular	Boa	Boa	Boa	Boa
CT4	Boa	Boa	Regular	Regular	Regular
CO1	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular
CO2	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
CO3	Boa	Boa	Regular	Regular	Regular
CO4	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular
CC1	Boa	Boa	Boa	Regular	Regular
CC2	Boa	Boa	Boa	Regular	Regular
CC3	Boa	Boa	Regular	Ruim	Ruim
CC4	Regular	Regular	Regular	Regular	Regular
CTR1	Regular	Regular	Ruim	Ruim	Regular
CTR2	Boa	Boa	Boa	Regular	Regular
CTR3	Boa	Boa	Boa	Ruim	Regular
CTR4	Boa	Regular	Ruim	Ruim	Ruim
CR1	Regular	Regular	Regular	Regular	Ruim
CR2	Boa	Boa	Regular	Regular	Ruim
CR3	Boa	Boa	Boa	Regular	Regular
CR4	Boa	Boa	Regular	Regular	Ruim

CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada

com xarope de açúcar invertido contaminado com resíduo de Roundup. Os números de 1 a 4 indicam a repetição.

5.25.2 ALIMENTAÇÃO

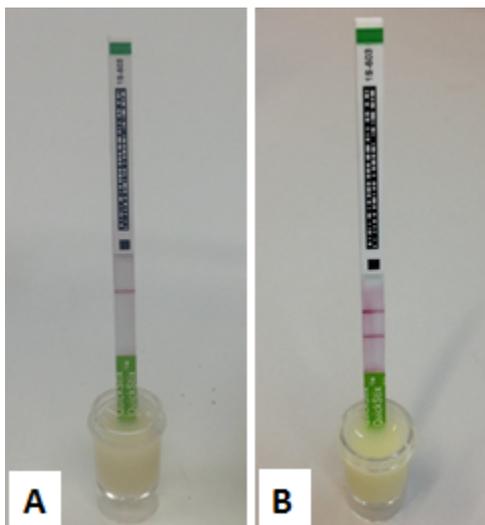
As farinhas produzidas através de grãos de soja (Figura 16), foram testadas para verificar a presença ou ausência de proteínas inseticidas rCry1Ac, antes de serem introduzidas nas colmeias (Figura 17). O resultado obtido na farinha de soja orgânica e convencional foi negativo para a presença de proteína rCry1Ac, e a farinha de soja transgênica apresentou resultado positivo para a mesma proteína.

Figura 16 Farinha de soja produzida através da trituração de grãos – LabEnto, Florianópolis - SC.



Fonte: Cardozo, 2017.

Figura 17 Fitas do kit QuickStix da Envirológix com resultado negativo à presença de proteína Cry1Ac (A). Tira com resultado positivo à presença de proteína Cry1Ac (B) na farinha de soja transgênica – LabEnto, Florianópolis - SC.



Fonte: Cardozo, 2017.

Para verificar se o alimento foi aceito pelas abelhas, as colmeias foram abertas 24 a 48 horas após a introdução do mesmo. Em todas as colmeias verificou-se que o alimento energético foi 100% recolhido, já o alimento proteico foi recolhido de acordo com a necessidade da colmeia. Colmeias com pouco pólen armazenado e com maiores quantidades de crias coletavam maiores quantidades de alimento proteico. O alimento não recolhido pelas abelhas (Figura 18) foi retirado dos alimentadores para evitar que fermentasse ou que atraísse outras pragas capazes de parasitar e causar prejuízos às colmeias.

Figura 18 Alimento proteico não recolhido pelas abelhas operárias 24 horas após a introdução da primeira alimentação (todas as colmeias se apresentaram de forma semelhante) – Cidade das Abelhas, Florianópolis - SC.



Fonte: Cardozo, 2017.

Para verificar se abelhas haviam recolhido parte do alimento, foi coletado material de dentro das células contendo pólen, visto que ao coletar o alimento proteico as abelhas o armazenam nas células dos favos, o chamado pão de abelha, para posteriormente utilizarem em sua alimentação e na das crias. Todas as colmeias CTR, mostraram resultado positivo na análise de detecção da proteína rCry1Ac, as demais mostraram resultado negativo.

Para verificar se, após os cinco meses da introdução dos tratamentos, havia resíduos de proteína rCry1Ac nas colmeias, o material proteico dos quadros foi recolhido. As colmeias que não receberam alimento transgênico, não apresentaram resíduos deste em seu material proteico. Já as colmeias que receberam farinha de soja transgênica Intacta RR2, apresentaram resíduos da proteína rCry1Ac em seu material proteico. Neste sentido, pode-se dizer que o alimento oferecido às abelhas, contendo proteína inseticida, pode influenciar e causar efeitos deletérios a várias gerações, visto que pode ficar

armazenado por meses dentro da colmeia, sendo oferecido aos poucos às suas crias.

Figura 19 Teste realizado no material proteico coletado das colmeias CTR, após 5 meses da introdução dos tratamentos nas colmeias. Todos apresentaram resultado positivo para a proteína Cry1Ac através da análise realizada com fitas do kit QuickStix da Envirologix – LabEnto, Florianópolis – SC.



Fonte: Cardozo, 2017.

Bizzocchi (2014), trabalhando com pólen de milho, detectou proteína rCry1F nas larvas das colmeias alimentadas com pólen *Bt*, o que comprovou que as abelhas utilizaram o pólen do milho *Bt* para alimentar as larvas. Malone e Pham-Delègue (2001), verificaram que as abelhas não possuem capacidade de distinguir flores transgênicas de não transgênicas. Essa incapacidade deixam as abelhas mais expostas a coleta de pólen contendo proteínas inseticidas (SABUGOSA-

MADEIRA et al., 2009). Em contrapartida, um trabalho realizado por Ramirez-Romero; Chaufaux e Pham-delègue (2005), mostrou uma redução no número de visitas, por abelhas, a flores artificiais contendo solução açucarada com proteínas sintetizadas pelo milho *Bt*. As abelhas não voltavam a buscar recursos nessas flores mesmo na ausência de alimento contaminado, demonstrando que a toxina rCry1Ab possui um fator anti-nutricional ou repulsivo, com efeitos subletais que foram memorizados pelas abelhas. Ramirez-Romero et al. (2008) observaram, também, alterações no comportamento das abelhas, onde elas levavam mais tempo para consumir a solução contaminada com pólen transgênico. Alguns trabalhos, realizados em abelhas, têm mostrado mortalidade ou efeitos deletérios em abelhas quando estas são alimentadas com esporos de *B. thuringiensis* ou com proteína Cry (VANDENBERG; SHIMANUKI, 1986; VANDENBERG, 1990; RAMIREZ-ROMERO et al., 2005, 2008). Ramirez-Romero et al. (2008) demonstraram que a exposição subcrônica oral, de proteína Cry1Ab, em concentrações de 5000 ppb, não causa efeitos letais em *A. mellifera*, mas pode causar alterações no comportamento alimentar ou processos de aprendizagem das abelhas, o que pode causar impactos no desenvolvimento da colmeia.

Outra implicação causada pela proteína *Bt*, seria na ecologia das colmeias, visto que ela pode causar uma redução na população de traça-da-cera das espécies *Achroia grisella* (Fabricius, 1794) e *Galeria mellonella*, (Linnaeus 1758). Sabugosa-Madeira et al. (2007), argumentam que a traça-da-cera é um inseto benéfico às colmeias, que atua como recicladora de matéria orgânica. As traças, ao se alimentarem dos favos velhos, larvas mortas e restos de alimentos, liberam espaço nas colmeias, além de, provavelmente, evitarem eventuais focos de doenças (MELATHOPOULOS, NELSON; CLARK et al., 2004). Trevisan et al., (2013) verificaram que o pólen do milho que expressa a proteína Cry1Ab, causa morte significativa de larvas de *G. mellonella*. Entretanto, ainda há discordância sobre a importância das traças-da-cera, visto que muitos autores descrevem as traças da cera como uma praga de apiários comerciais, causadora de danos aos favos, prejudicial ao desenvolvimento das colmeias, e também podem ser vetores de patógenos, disseminando os esporos das bactérias *P. larvae* causadora da "cria pútrida americana" e esporos de *Melissococcus pluton* (Bailey e Collins, 1982) causadora da "cria pútrida europeia" (BAMBARA; AMBROSE, 1981; ANDERSON, 1990).

Hanley, Huang e Pett (2003) verificaram que o pólen de OGMs é altamente tóxico para insetos que coabitam as colmeias. Segundo

Sabugosa-Madeira e Abreu (2009), não foi observado presença de traças-da-cera vivas e do besouro da espécie *Aethina tumida*, Murray (1867), nas colmeias que apresentaram CCD. Oldroyd (2007) também observou que colmeias mortas com sintomas de CCD não apresentavam traças-da-cera. A ausência de insetos que coabitam as colmeias, pode ser causada pelo efeito da toxicidade da proteína Cry presente nos favos, oriundo do pólen de OGMs (LATSCH, 2007). Todos esses efeitos causados pela proteína Cry, podem ser um indício da causa da CCD.

Outros autores não encontraram influência significativa da proteína Cry no desenvolvimento de colmeias, no peso e tamanho de indivíduos adultos de *A. mellifera* (HANLEY; HUANG; PETT, 2003; LIPINSKI et al., 2008; LIMA et al., 2011).

Além disso, os possíveis resíduos de agrotóxicos presentes nas farinhas de soja, transgênica e convencional, e no alimento energético contaminado com Roundup®, também podem ficar armazenados no material proteico (pão de abelha) e mel. Segundo ORANTES-BERMEJO et al., 2010, os resíduos de agrotóxicos presentes no pólen e no néctar são levados pelas abelhas forrageiras para as colmeias e permanecem no pão de abelha e no mel por algum tempo.

Outro fator estudado, é o efeito subletal dos pesticidas sobre as abelhas. A literatura tem mostrado a evidência dos efeitos desses pesticidas, bem como dos adjuvantes associados, que incluem, mas não estão limitados, a longevidade e imunidade reduzidas, orientação prejudicada e impactos na aprendizagem, como encontrar o caminho de volta para a colmeia, forrageamento e coordenação motora (DECOURTYE; LACASSIE; PHAM-DELEGUE, 2003; THOMPSON, 2003, CIARLO et al., 2012; ORUC et al., 2012). Um trabalho realizado com herbicida apresentou morte celular no átrio do coração de abelha, após a exposição a esses produtos (PAPAEFTHIMIOU et al., 2002). Outro trabalho mostrou uma redução ou paralização da postura da rainha (MORTON; MOFFETT, 1972).

As abelhas têm cerca de metade da quantidade de enzimas desintoxicantes que os insetos resistentes aos pesticidas (CLAUDINOS et al., 2006), o que aumenta a sensibilidade das abelhas a exposição de pesticidas e pode reduzir ainda mais sua capacidade de combater infecções bacterianas, fúngicas ou virais. A sensibilidade e a condição fisiológica dos pesticidas também podem variar devido à idade das abelhas e ao estado nutricional, o que pode afetar a saúde geral das colmeias (SUCHAIL, GUEZ, BELZUNCES, 2001). As abelhas mais velhas (forrageadoras) são mais suscetíveis à exposição a pesticidas

devido à atividade de forrageamento do que as abelhas mais jovens que permanecem na colmeia (WAHL; ULM, 1983; RORTAIS et al., 2005).

As abelhas forrageiras fazem viagens a vários quilômetros de distância e várias vezes ao dia para reunir recursos florais e, ao fazê-lo, levam essas substâncias presentes nesses recursos florais para as colmeias (VON FRISCH, 1967). O glifosato é uma substância com alta solubilidade em água, que podem estar presentes nas flores visitadas após uma aplicação por pulverização (BOHAN et al., 2005), e por isso, também podem estar presentes no pão de abelha e no mel armazenado, onde podem permanecer armazenadas por longos períodos de tempo e se acumular até que os recursos sejam utilizados (DEVILLERS; PHAM-DELÈGUE, 2002). Sendo assim, os efeitos negativos dos agroquímicos acumulados dentro da colmeia, podem ser sutis e, muitas vezes, discretos a curto prazo (GIESY; DOBSON; SOLOMON, 2000), mas podem prejudicar os processos comportamentais a longo prazo (KIRCHNER, 1999).

Segundo Bogdanov, Kilchenmann e Imdorf (1996) e Mullin et al. (2010), os resíduos de pesticidas podem se acumular na cera e persistir por anos. Os apicultores, normalmente, reutilizam a base de cera por razões econômicas. Isso pode acarretar efeitos indesejáveis na colmeia, visto que, estudos de contaminação nos favos de cria, que são reutilizados, apresentaram que os resíduos de pesticidas poderiam penetrar a cera e migrar para a cria. Neste estudo, as abelhas operárias criadas em favos contendo altos níveis de resíduos de pesticidas tiveram menor sobrevivência do que as abelhas criadas em favos de cria não contaminados (SUCHAIL; GUEZ, BELZUNCES, 2001).

5.3 COMPORTAMENTO HIGIÊNICO

Antes da introdução dos tratamentos, no mês de abril, todas as colmeias foram avaliadas em relação ao seu comportamento higiênico (CH). Neste período, todas foram consideradas higiênicas, visto que apresentaram um CH superior a 90% exceto a colmeia CO3 (81,2%), que seria considerada com CH intermediário. Boutin et al. (2015), classificaram as colmeias como: não-higiênicas (remoção de crias mortas <50%), CH intermediário (remoção de crias mortas entre 50% e 90%) e altamente higiênicas (remoção de crias mortas > 90%).

Observou-se que, algumas vezes, as abelhas operárias retiravam apenas a cabeça e o tórax de algumas crias mortas, deixando o abdômen no fundo do alvéolo. Nestes casos, foi considerado como comportamento não-higiênico. Outras vezes, observou-se que algumas

células operculadas, após serem perfuradas, não haviam sido abertas para remoção das crias. Sendo assim, as células foram desorpeculadas e foi observado se as crias haviam sido realmente perfuradas. Em todos os casos, observou-se que o alfinete não havia atingido as crias e estas se encontravam vivas e, então, o comportamento foi considerado como higiênico.

Tabla 5 Médias do comportamento higiênico (%) observadas em colmeia de *A. mellifera*, durante os meses de maio a agosto de 2016, Florianópolis, SC.

		Comportamento Higiênico				
Mês	Tratamento	CT	CO	CC	CTR	CR
	Maio		99,1 a	94,8 a	97,6 a	93,5 a
Junho		98,8 b	93,6 b	83,6 a	61,8 a	72,7 a
Julho		99,8 b	92,7 b	77,4 a	47,1 a	81,1 a
Agosto		98,8 b	91,4 b	84,3 a	59,4 a	47,9 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, na linha. Foi aplicado o teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com resíduo de Roundup.

No mês de maio, 30 dias após a introdução dos tratamentos, foi realizada uma nova avaliação do CH das colmeias. Neste período, todas foram consideradas higiênicas, visto que apresentaram um CH superior a 90%. Apesar de ter sido observado uma queda do CH nos tratamentos CTR e CR, os dados não apresentaram diferença estatística.

A colmeia CO3 que já apresentava um CH próximo do crítico no mês de abril, apresentou um comportamento higiênico intermediário (79,4%). O CH observado nesta colmeia é possivelmente um traço genético hereditário das operárias e não inerente ao tratamento, visto que ela já apresentava com CH semelhante antes da introdução do mesmo. Além disso, durante a condução da análise do CH, ela apresentava uma grande quantidade de abelhas operárias, o que a classificava como colmeia regular, ou seja, com muitas abelhas sobre os quadros. Segundo Arathi, Burns, Spivak (2000) o CH é realizado por abelhas jovens de meia-idade (15-20 dias), mas como a colmeia estava

com grande quantidade de abelhas, não foi pela falta delas que ele não foi eficiente.

No mês de junho, 60 dias após a introdução dos tratamentos, os tratamentos CT e CO foram classificados como higiênicos, visto que apresentaram CH superior a 90%. Os tratamentos CC, CTR e CR apresentaram CH abaixo de 90%, mas acima de 50%, sendo considerados comportamentos intermediários. A queda acentuada nos tratamentos CC, CTR e CR apresentou diferença estatística entre os tratamentos CT e CO. O possível resíduo de agrotóxico presente na farinha promove efeitos subletais quando oferecido às abelhas, como diminuição na longevidade, que leva à diminuição do CH. Apesar disso, CTR obteve uma queda ainda maior que CC, o que pode indicar uma atuação da proteína rCry1Ac como fator prejudicial às abelhas além do resíduo de agrotóxico. O tratamento CR foi o que mostrou maior queda no CH, indicando que o herbicida introduzido na alimentação causou alterações significativas no CH dois meses após sua introdução.

Uma das colmeias do tratamento CTR (CTR4), apresentou queda drástica no CH da colmeia. Ele ocorreu devido a introdução do tratamento, e também, talvez, pela diminuição repentina no número de abelhas operárias, causado pelo ataque de formigas do gênero *Camponotus*, que, conseqüentemente, causaram uma diminuição no número de abelhas operárias jovens que são responsáveis pelo CH.

Na avaliação do CH realizada no mês de julho, 90 dias após a introdução dos tratamentos, as colmeias CT e CO apresentaram comportamento médio superior a 90%, sendo consideradas higiênicas. As colmeias CC e CR, apresentaram comportamento intermediários e as CTR apresentaram comportamento não-higiênico, visto que foi inferior a 50%. Os tratamentos CT e CO apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos CC, CTR e CR.

A colmeia CO3, continuou apresentando queda no CH (74,9%), característica inerente à esta colmeia, como já comentado.

Na última avaliação do CH realizada no mês de agosto, 120 dias após a introdução dos tratamentos, as colmeias CT e CO continuaram apresentando-se higiênicas. As colmeias CC e CTR apresentaram comportamento intermediário e as colmeias CR apresentaram comportamento não-higiênico. Os tratamentos CT e CO apresentaram diferença estatística entre os tratamentos CC, CTR e CR. O CH higiênico da colmeia CO3 (72,4%) continuou sendo classificado como intermediário.

No mês de julho e agosto, durante a realização dos testes de CH, observou-se dezenas de abelhas nascendo com asas deformadas e abdômen atrofiado (Figura 20) apenas em colmeias CR.

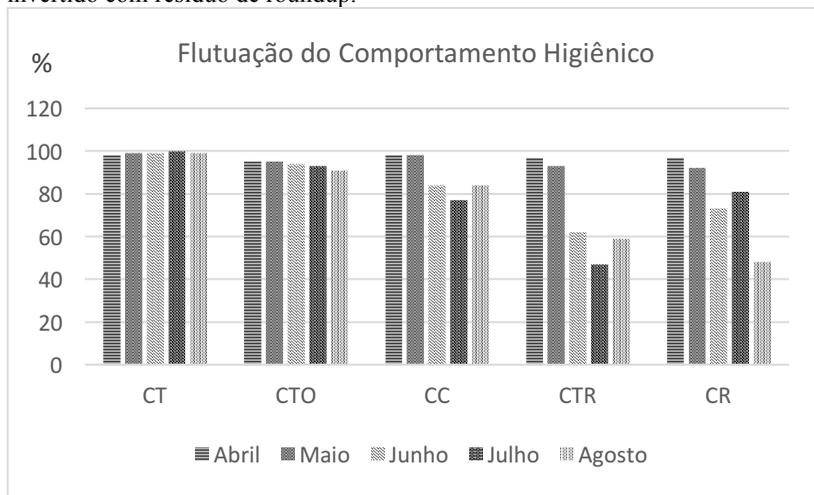
Figura 20 Abelha nascendo com as asas deformadas em colmeia com tratamentos CR (A). Abelha deformada com abdômen atrofiado em colmeia com tratamentos CR (B), Cidade das abelhas, Florianópolis -SC.



Fonte: Cardozo, 2017.

Observando a flutuação do CH entre os meses (Figura 21), pode-se dizer que ensaios com períodos inferiores a 30 dias podem não mostrar a realidade dos efeitos causados pelos OGMs e agrotóxicos. Desta forma, são necessárias observações durante várias gerações para que se tenham resultados conclusivos.

Figura 21 Flutuação do CH de abril a agosto nos tratamentos CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido com resíduo de roundup.



Com bases nos resultados (Figura 21), observa-se que logo no primeiro mês, após a introdução dos tratamentos, o CH de CC, CTR e CR, começou a ter uma queda mesmo apresentando boa quantidade de abelhas operárias dentro da colmeia. Nos meses posteriores, a queda foi ficando mais acentuada. Isso ocorreu devido a diminuição no número de abelhas operárias ocasionadas, especialmente, pelos efeitos dos tratamentos, visto que há diversos estudos que demonstram que os OGMs e agrotóxicos são nocivos às abelhas. Outras atividades também podem ter sido prejudicadas, o que pode ter auxiliado na diminuição do CH. Nos tratamentos CT e CO, foi observado apenas uma ligeira diminuição na população das colmeias, o que não causou efeitos sobre o CH.

Observa-se que o tratamento CTR obteve comportamentos inferiores ao tratamento CC, o que indica que a proteína rCry1Ac pode causar efeitos subletais a longo prazo.

Segundo Nowogroszki (1984) e Seeley (1982) as abelhas apresentam polietismo etário, onde as operárias jovens são responsáveis por determinadas tarefas como cuidado das crias e construção de células. As operárias, ligeiramente mais velhas, são responsáveis pela

guarda e a limpeza da colmeia e, por fim, o forrageamento é tarefa das operárias mais velhas. Palácio (2005) encontrou abelhas com idade entre 14 e 18 dias realizando ativamente o CH, no entanto, também encontrou abelhas com 7 a 9 dias e com 21 a 27 dias de idade, em atividade. Pereira (2008), observou abelhas de 2 a 14 dias realizando o CH. Morais-Vátimo (2008), observou que abelhas de até 19 dias podem realizar essas atividades. Segundo Brillet et al. (2002) as abelhas podem assumir uma plasticidade em seu repertório comportamental, ou seja, as operárias podem acelerar, retardar ou até mesmo reverter suas atividades em resposta às mudanças nas condições da colmeia. A falta de abelhas forrageiras estimula o início do forrageamento de aproximadamente 10% das operárias da colmeia (ELEKONICH; ROBERTS, 2005). Morais-Vátimo (2008), observou que as abelhas mesmo jovens, com três dias, podem iniciar o comportamento de forrageamento, devido à falta de operárias mais velhas.

Estudos com pesticidas têm mostrado impactos sobre a longevidade, imunidade, orientação e aprendizagem, como encontrar o caminho de volta para a colmeia, forrageamento e coordenação motora (DECOURTYE; LACASSIE; PHAM-DELEGUE, 2003; THOMPSON, 2003; CIARLO et al., 2012; ORUC et al., 2012). Vosscher e Dukas (1997), demonstraram que as abelhas operárias que se desenvolvem em favos contendo altos níveis de resíduos de pesticidas, vivem em média 4 dias menos do que as abelhas criadas em favos não contaminados. A redução da longevidade das operárias adultas, pode afetar todas as atividades da colmeia, rompendo o polietismo baseado na idade e seu papel na homeostase das colmeias (THOMPSON; PERNAL; NOOT, 2007). Depois que uma operária vira forrageira, seu tempo médio de vida é inferior a 8 dias (VOSSCHER, DUKAS, 1997). Com a redução da longevidade, as abelhas forrageiras mortas são substituídas por abelhas mais jovens, provocando o forrageamento precoce. Consequentemente, ocorre uma redução no número de abelhas enfermeiras "mais jovens", o que pode causar grande impacto na viabilidade das colmeias, visto que, muitas atividades, incluindo os cuidados com a cria, processamento e armazenamento de alimentos, cuidados com rainha, CH e eficiência de forrageamento, são prejudicadas (THOMPSON; PERNAL; NOOT, 2007).

Oldroud (2007), trabalhando com pólen *Bt*, não observou efeitos letais sobre as abelhas, contudo, percebeu que este pode aumentar a susceptibilidade das abelhas a ação de doenças e pragas, o que pode, segundo o autor, estar diretamente ligado à redução do CH, causado pelos efeitos subletais do pólen do milho *Bt*.

Message e Gonçalves (1984), supõem a possível existência de uma temperatura ótima para o CH, provavelmente entre 18°C a 25,4°C, sendo esta variável diretamente relacionada à umidade relativa do ar. As avaliações de CH realizadas neste trabalho, foram realizados sempre em dias ensolarados ou em dias sem chuva. Sempre se observava se o dia seguinte não haveria probabilidade de chuva também, visto que a leitura do CH foi realizada após 24 horas. Apesar disso, não foi levado em consideração a temperatura no dia da análise. Durante o período de avaliação, observou-se temperaturas muito baixas, entretanto, não houve quedas acentuadas no CH das colmeias CT e CO. Conclui-se, então, que a temperatura não foi um fator determinante para a realização do CH. Gramacho (1995) observou que o CH tem maior eficiência em dias ensolarados do que em dias com probabilidade de chuva e chuvosos. Ele concluiu que as abelhas campeiras no interior da colmeia, quando impedidas de voarem, não desempenham as atividades de CH, realizado pelas abelhas mais novas.

Neste sentido, os danos causados devido aos efeitos subletais dos tratamentos, a coordenação motora, imunidade e, principalmente, longevidade das abelhas, levam à uma redução do CH. Quando a longevidade das abelhas diminui, ainda mais no período do inverno onde a população das colmeias tende a diminuir, pode causar graves danos às colmeias, visto que CH é fundamental dentro das colmeias, sendo responsável pelo controle de doenças e pragas nas crias.

5.4 FLUTUAÇÃO DA INTENSIDADE DE INFECÇÃO POR *Nosema* spp.

A intensidade de infecção pelo fungo *Nosema* spp. no mês de abril foi de 1.565.000 esporos/abelha no tratamento CT, 3.057.500 de esporos/abelha em CO, de 1.140.000 esporos/abelha CC, de 1.531.250 esporos/abelha em CTR e de 1.143.750 esporos/abelha em CR. Segundo a classificação Jaycox (1980), todos os tratamentos apresentaram uma intensidade de infecção muito baixa no período. Através da análise de prevalência, observou-se que uma das colmeias do tratamento CO apresentou uma intensidade mais alta do que sua realidade, visto que, em 70% das abelhas avaliadas individualmente não foram observados esporos de *Nosema* spp. e 20% apresentou uma quantidade baixa de esporos, apenas 10% apresentou uma intensidade de infestação alta. Como a coleta foi realizada na entrada do alvado, é possível que houvesse a presença de abelhas de outras colmeias pilhando ou abelhas que vieram de outras colmeias juntamente com o avaliador e foram

coletadas, o que causou um aumento na intensidade de infecção de CO. O mesmo ocorreu em uma das colmeias do tratamento CTR, ela apresentou uma intensidade de infecção mais alta que o esperado, visto que 70% das abelhas avaliadas na análise de prevalência deram negativo para a presença de esporos e 25% apresentou uma intensidade de infecção baixa, o restante apresentou intensidade média. Outro fator que pode influenciar na intensidade de infecção é a coleta de abelhas jovens, visto que, para realização da coleta de abelhas para análise são colocadas espumas no alvado, para evitar entrada e saída de abelhas, mas nesse momento algumas abelhas jovens acabam saindo da colmeia e acabam sendo coletadas, o que pode influenciar na avaliação.

Tabla 6 Médias da intensidade de infecção pelo fungo *Nosema* spp. observadas nos tratamentos durante os meses de maio a agosto de 2016, Florianópolis, SC.

Intensidade de infecção pelo fungo <i>Nosema</i> spp. (milhões de esporos/abelha)					
Mês	Tratamento				
	CT	CO	CC	CTR	CR
Maio	7,5 b	3,1 a	6,6 b	7,5 b	5,8 b
Junho	13,5 a	17,7 a	17,7 a	13,7 a	11,0 a
Julho	14,1 a	12,8 a	23,5 a	12,2 a	19,2 a
Agosto	8,4 a	10,4 a	14,4 b	3,6 a	7,2 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, na linha. Foi aplicado o teste Scott Knott ao nível 5% de probabilidade nos meses de maio, junho e agosto. No mês de julho foi aplicado o teste Kruskal Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com resíduo de Roundup.

No mês de maio, 30 dias após a introdução dos tratamentos, observou-se um aumento na intensidade de infecção pelo fungo *Nosema* spp. Segundo Jaycox (1980), todos os tratamentos apresentaram uma intensidade de infecção regular no período, exceto CO que apresentou uma intensidade de infecção baixa, o que fez com que apresentasse diferença estatística dos demais tratamentos.

Através da análise de prevalência, observou-se que uma das colmeias do tratamento CT apresentou uma intensidade mais alta do que

sua realidade, visto que, em 75% das abelhas avaliadas individualmente não foram observados esporos de *Nosema* spp. e 5% apresentou uma quantidade baixa de esporos, 5 apresentou uma quantidade média de esporos e 15% apresentou uma intensidade de infestação alta. Isso indica que podem ter sido coletadas abelhas pilhadoras ou abelhas com altas intensidades de infecção, que acabam por elevar o número de esporos.

O aumento da infecção por *Nosema* spp. observado, se deve, principalmente, ao clima, visto que no mês de março as temperaturas começaram a diminuir, assim como a disponibilidade de alimento no campo, dessa maneira, as abelhas diminuíram a atividade de forrageamento e os voos de higiene, o que favorece a proliferação da doença.

No mês de junho, todos os tratamentos apresentaram uma intensidade de infecção semisevera e, por isso, não apresentaram diferenças estatísticas entre si. As análises de prevalência estavam de acordo com os resultados de intensidade de infecção encontrados. As temperaturas, no mês de junho, foram muito baixas e o pouco alimento no campo fez com que a rainha diminuísse a postura. Segundo Itagiba (1997), as abelhas não voam em períodos de chuva ou com temperaturas inferiores a 10°C. Devido a isso, às abelhas diminuíram o comportamento de forrageamento e, conseqüentemente, diminuíram o voo de higiene, o que favoreceu o aumento na intensidade de infecção por *Nosema* spp. nesse período.

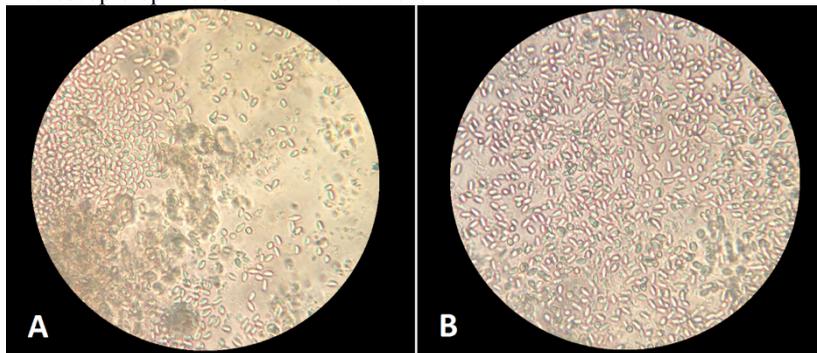
Em julho, as colmeias apresentaram uma intensidade de infecção semisevera, exceto CC que apresentou uma intensidade de infecção severa. Apesar disso, os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si. As análises de prevalência estavam de acordo com os resultados de intensidade de infecção encontrados. No mês de julho, as temperaturas ainda estavam baixas e o alimento no campo estava escasso, fazendo com que os voos de higiene ocorressem em menor frequência, por isso, as intensidades de infecção ainda estavam altas.

O tratamento CTR apresentou uma baixa intensidade de infecção, no mês de agosto. Os tratamentos CT e CR apresentaram uma intensidade de infecção regular e CO apresentou uma intensidade de infecção semisevero no mesmo período. O tratamento CC apresentou diferença estatística entre os demais tratamentos. As análises de prevalência estavam de acordo com os resultados de intensidade de infecção encontrados.

Percebe-se que a queda na intensidade de infecção foi bem acentuada nos tratamentos CTR e CR. Pode-se especular que isso

ocorreu devido aos efeitos subletais causados pelos tratamentos. A qualidade dessas colmeias estavam entre regular e ruim, ou seja, com um número muito reduzido de abelhas operárias, que deve ter ocorrido pela redução da longevidade das operárias. Nesse sentido, a maioria das abelhas presentes na colmeia, eram abelhas jovens e, por isso, com baixas intensidades de infecção. Giersch et al. (2009), diz que abelhas recém-emergidas não são adequadas para a contagem de esporos de *Nosema* spp., visto que, não tiveram tempo o suficiente para se infectarem. Segundo OIE (2008), apenas abelhas com mais de 8 dias são capazes de infectar. Cerca de 60 abelhas recém-emergidas, foram analisadas para verificar se apresentavam esporos, a amostra deu 100% negativa. A mesma quantidade de abelhas, com 5 dias de vida, foi avaliada, poucas apresentaram resultado positivo para presença de esporos, e estas tinham uma infecção muito baixa, o que corrobora com os autores supracitados.

Figura 22 Intensidade alta (A) e muito alta (B) de esporos de *Nosema* spp., obtidos através da maceração do intestino de apenas uma abelha, observados em microscópio óptico com aumento de 40x.

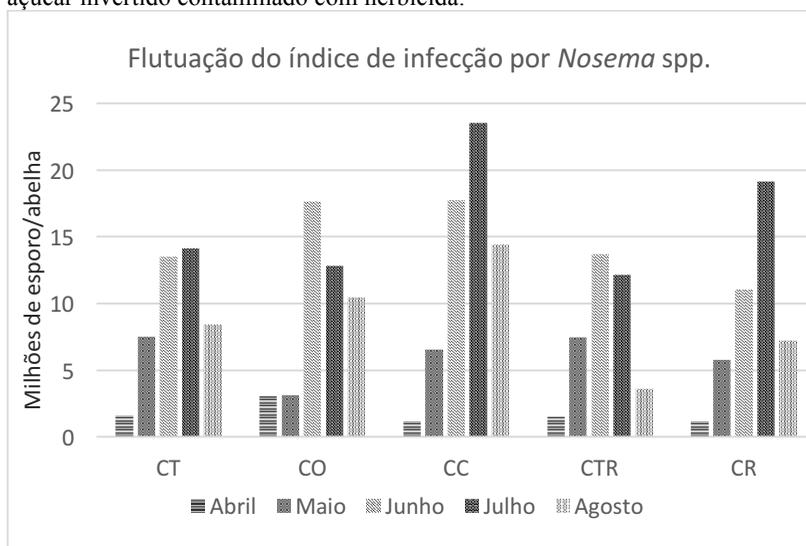


Fonte: Cardozo, 2017.

De acordo com os dados (Figura 23), percebe-se que a intensidade de infecção começa a aumentar no mês de maio, mês onde as temperaturas começam a diminuir. A intensidade de infecção teve seu pico máximo no mês de junho e julho, dependendo do tratamento. Nestes meses observaram-se menores temperaturas, período onde os dias são mais curtos, o alimento no campo é mais escasso e a rainha diminui a postura significativamente. Neste sentido, as abelhas presentes nessa época, são abelhas mais velhas e que têm uma longevidade maior, devido ao menor tempo que passam forrageando.

Segundo Lane et al., (2014), o tempo de voo influencia na longevidade dos insetos, visto que exige altos custos metabólicos, o que corrobora com Neukirch (1982), que diz que a longevidade de uma abelha depende do desempenho e do tempo de voo gastos e não da sua idade em si. Contudo, apesar das abelhas aumentarem sua longevidade, por ficarem mais tempo dentro das colmeias, elas ficam mais susceptíveis ao aumento na intensidade de infecção de doenças como *Nosema* spp., visto que elas diminuem o voo de higiene e, muitas vezes, acabam defecando dentro da colmeia, no alvado ou sobre as caixas das colmeias, o que aumenta a probabilidade de infecção.

Figura 23 Flutuação da intensidade de infecção pelo fungo *Nosema* spp., de abril (antes da introdução dos tratamentos) a agosto nos tratamentos CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com herbicida.



De acordo com as análises de prevalências realizadas, as colmeias com tratamentos CC, CTR e CR apresentaram um menor número de abelhas com presença de esporos de *Nosema* spp. Apesar disso, as abelhas com resultado positivo para este patógeno apresentavam uma carga muito maior de esporo que os demais tratamentos.

Oldroud (2007) observou que o pólen *Bt*, apesar de não apresentar efeitos letais sobre as abelhas, pode causar um aumento na suscetibilidade das abelhas a ação de patógenos, o que pode estar diretamente ligado à redução do CH, causado pelos efeitos subletais do pólen *Bt*, podendo vir a provocar grandes impactos para a sanidade apícola.

Investigadores da Universidade de Jena (Alemanha) observaram, acidentalmente, que as abelhas infectadas com *Nosema* spp. apresentavam valores superiores de mortalidade quando na sua alimentação estava presente pólen de milho transgênico Mon 810 e *Bt176*, o que, segundo o autor, pode estar ligado a uma interação entre a toxina e patógeno sobre o epitélio do intestino das abelhas, tornando-as, assim, muito mais sensíveis à infecção (KAATZ, 2005). Isso pode justificar os índices encontrados nos tratamentos CTR, visto que, o aumento na mortalidade precoce das abelhas com altas cargas de esporos pode ter impedido que estas fossem coletadas.

5.5 FLUTUAÇÃO DO ÍNDICE DE INFESTAÇÃO PELO ÁCARO *V. destructor*

No mês de abril, que antecedeu a introdução dos tratamentos, a taxa média de infestação de ácaros *V. destructor* (relação ácaro.cria de operária-1) nas colmeias avaliadas, foi de 0,25% no tratamento CT, de 0,25% em CO, de 2,0% CC, de 1,0% em CTR e de 1,25% em CR. Todas as colmeias estavam uniformes, com baixos índices de infestação pelo ácaro *V. destructor* em crias de operárias de *A. mellifera*. Segundo Harris, Sheridan e MacGown (2016), o índice tolerável de infestação sem que cause danos econômicos, está próximo dos 10%, no período do verão. Neste mês, a maioria das colmeias estavam fortes, com grande quantidade de operárias, sendo classificadas como boas ou regulares (Tabela 4). Além disso, as rainhas estavam com postura normal e uniforme, por isso, havia muitas células com cria aberta e cria operculada na colmeia. Neste sentido, é comum encontrar índices de infestação mais baixos, visto que os ácaros ficam diluídos nos diversos alvéolos existentes. Quando a postura é baixa, como no inverno, este índice tende a aumentar, visto que os ácaros se reúnem no quadro com crias abertas, próximo de ser operculadas, para se reproduzir.

Tabla 7 Médias do índice de infestação, em crias de operárias, pelo ácaro *V. destructor* observadas nos tratamentos durante os meses de maio a agosto de 2016, Florianópolis, SC.

Índices de infestação pelo ácaro <i>V. destructor</i> em crias de operárias (%)					
Mês \ Tratamento	CT	CO	CC	CTR	CR
Maio	2,3 a	2,0 a	7,8 a	13,8 a	4,5 a
Junho	2,5 a	7,7 a	6,5 a	5,4 a	6,9 a
Julho	11,7 a	8,0 a	8,2 a	9,8 a	17,5 a
Agosto	2,0 b	3,8 ab	6,5 ab	4,3 ab	24,0 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, na linha. Foi aplicado o teste Kruskal Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com resíduo de Roundup.

No mês de maio, 30 dias após a introdução dos tratamentos, as rainhas apresentaram uma pequena diminuição na postura, o que promoveu um aumento na média do índice de infestação em relação ao mês de abril. Apesar dos tratamentos não terem apresentados diferenças estatísticas, o tratamento CTR apresentou um índice de infestação superior ao crítico sugerido por Harris, Sheridan e MacGown (2016).

A média do índice de infestação do *V. destructor* aumentou no mês de junho, 60 dias após a introdução dos tratamentos, nas colmeias CT, CO e CR, mas diminuiu nos tratamentos CC e CTR. Os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Algumas colmeias dos tratamentos CC e CTR, apresentaram muitas células zanganeiras operculadas no mês de junho, o que pode ter diluído os ácaros nos alvéolos e que pode explicar a diminuição no índice de infestação, já que esta avaliação foi realizada apenas em crias de operárias.

O grande aumento no índice de infestação do *V. destructor* no tratamento CO, se deve, principalmente, ao aumento que aconteceu na colmeia CO3 que possui um baixo CH, como foi visto anteriormente. A diminuição na postura faz com que os ácaros fiquem mais concentrados na pequena área de cria existente, e combinado com o baixo CH facilita o desenvolvimento e a reprodução do ácaro, principalmente quando o

número de abelhas operárias diminui, o que leva a uma diminuição do CH e do grooming e, conseqüentemente, promove um aumento no índice de infestação.

No mês de julho, 90 dias após a introdução dos tratamentos, observou-se que as colmeias tinham pouca cria aberta e operculada, algumas ficaram sem apresentar postura por algum tempo, mas foi observado a presença da rainha. O clima e a falta de alimento no campo influenciam esse tipo de comportamento da rainha e, por isso, os ácaros tendem a ficar aglomerados nos poucos alvéolos de cria existentes. Neste mês o índice de infestação pelo *V. destructor* aumentou em todos os tratamentos e eles não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Em agosto, as rainhas voltaram a ovipositar, as posturas estavam uniformes e em maior quantidade, exceto nas colmeias CR que, além de fracas, estavam com a postura baixa e desuniforme e apresentaram um CH ineficiente. A média do índice de infestação estava dentro do índice tolerável nos tratamentos CT, CO, CC e CTR, mas muito alto em CR, este último apresentou diferença estatística em relação ao tratamento CT.

Percebe-se que o índice de infestação na cria, flutua de acordo com o número de abelhas operárias adultas e pelo número de crias, especialmente operculadas. No período de maio a julho, observou-se uma diminuição no número de abelhas adultas e de crias, o que promoveu um aumento no índice de infestação na cria, pelo ácaro *V. destructor*. No período de agosto, as rainhas voltaram a ovipositar e todos os tratamentos, exceto CR, apresentaram uma diminuição neste índice. As colmeias CR estavam sem rainha, na sua maioria, e sem postura, além do baixíssimo número de abelhas operárias dentro das colmeias, o que justifica o alto índice de infestação.

Durante as avaliações, foram encontrados até 3 (três) ácaros fêmeas adultos por célula de cria de operária em estágio de pupa. Nas células de zangões, também em estágio de pupa, encontrou-se até 7 (sete) ácaros fêmeas adultos. Os dados obtidos nessas observações, corroboram com Floris (1991), que encontrou larvas de operárias, infestadas por dois, três ou mais ácaros e com Calderone e Kuenen (2001) que observou a preferência de *V. destructor* por células de zangões. Raramente encontrava-se uma cria desta casta, não parasitada. Gallai et al. (2009), observou que em colmeias de *A. mellifera carnica* a cria de zangão é infestada aproximadamente com oito vezes mais frequência que a cria de operária. Estas observações mostram que a distribuição do ácaro entre as células de cria não é aleatória, mas sim

agregada. Segundo Nazzi e Le Conte (2016), esse comportamento pode favorecer a exogamia, o que pode ter um valor adaptativo para o ácaro.

Apesar de algumas colmeias terem apresentado altos índices de infestação, eles não devem ser considerados preocupantes. Segundo Harris, Sheridan e MacGown (2016), o índice tolerável de infestação pelo ácaro *V. destructor* é de 10,2% em crias de operárias durante o verão. Contudo, os altos índices observados foram no período do inverno, onde há uma diminuição no número de abelhas operárias adultas e no número de crias de operárias, por isso pode-se considerar que o índice de infestação dobre neste período, mas sem causar prejuízos. Observando os índices encontrados em agosto, conclui-se que a tendência é a infestação diminuir ainda mais nos próximos meses, visto que, haverá mais abelhas para realizar o CH, grooming e, o maior número de abelhas e crias, o que irá diluir a quantidade de ácaro dentro das colmeias. Segundo Harris, Sheridan e MacGown (2016), um terço da população de ácaros reside em abelhas adultas e dois terços estão nas crias operculadas.

Durante as avaliações, percebeu-se que identificar a taxa de infestação pelo ácaro *Varroa* é dificultada pela falta de homogeneidade das colmeias, principalmente no que diz respeito a oviposição da rainha, número de abelhas operárias e o CH.

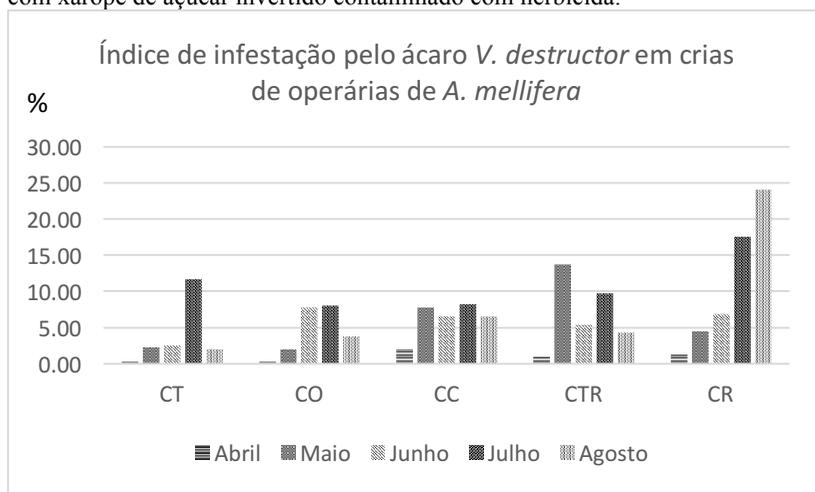
Foi constatado por Guerra Jr. (2000), que durante o processo de remoção das crias infestadas, as próprias abelhas higiênicas podem morder ou danificar os ácaros dentro da célula de cria. Os ácaros jovens, que sobrevivem a remoção das pré-pupas e pupas, não são susceptíveis de produzir descendência viável, pois não tiveram tempo hábil para copular (KIRRANE et al., 2011). Assim, a eficácia do comportamento higiênico na redução da reprodução de ácaros deve-se em parte à interferência na reprodução e, em parte, aos riscos que o ácaro enfrenta quando está fora da segurança da célula de cria (IBRAHIM; REUTER; SPIVAK, 2007). Gifford, (2011), diz que o controle da varroose, bem como das demais patologias que acometem as abelhas, pode estar relacionado com o comportamento higiênico das abelhas. Esse comportamento limita a propagação da infestação e pode diminuir o potencial reprodutivo dos ácaros (SPIVAK; REUTER, 2001a; 2001b).

Schluck (1992) diz que a longevidade do ácaro adulto é de 2 a 3 meses no verão e 6 meses ou mais no inverno e outono. Por isso o monitoramento do índice de infestação deve ser feito durante o ano todo, visto que índices muito altos podem causar danos econômicos e levar a colmeia à morte. É importante observar nas colmeias se existem quadros de crias zanganeiras. Quando estas estão em excesso ou são

desnecessárias, o ideal é removê-las para não facilitar a proliferação do ácaro.

A utilização de alimentos contendo proteínas Cry e/ou resíduos de agrotóxicos podem favorecer o aumento no índice de infestação pelo ácaro, visto que seus efeitos subletais diminuem a longevidade das abelhas e o CH, o que favorece a proliferação do ácaro e aumento no índice de infestação e pode causar graves danos às colmeias.

Figura 24 Flutuação no índice de infestação pelo ácaro *V. destructor*, em crias de operárias, de abril (antes da introdução dos tratamentos) a agosto nos tratamentos CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com herbicida.



Observa-se que os índices de infestação na cria são, na maioria das vezes, superiores ou iguais aos encontrados em abelhas operárias adultas. No mês de abril, antes da introdução dos tratamentos, a média do índice de infestação em operárias adultas, foi de 0,8% no tratamento CT, de 1,6 em CO, de 1,9% CC, de 3,3% em CTR e de 1,9% em CR, índices toleráveis, segundo Harris, Sheridan e MacGown (2016).

Tabela 8 Médias do índice de infestação, em operárias adultas, pelo ácaro *V. destructor* observadas nos tratamentos durante os meses de maio a agosto de 2016, Florianópolis, SC.

Índices de infestação pelo ácaro <i>V. destructor</i> em operárias adultas (%)					
Tratamento Mês	CT	CO	CC	CTR	CR
Maio	2,5 a	2,5 a	5,1 a	5,5 a	3,3 a
Junho	3,8 a	4,0 a	6,4 a	5,6 a	5,6 a
Julho	3,6 a	5,9 a	8,4 a	11,6 a	8,7 a
Agosto	2,9 b	2,1 b	4,7 ab	5,7 ab	11,0 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, na linha. Foi aplicado o teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade nos meses de maio a julho e, no mês de agosto, foi aplicado o teste Kruskal Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com resíduo de Roundup.

No mês de maio, os índices de infestação encontrados em operárias adultas, foram maiores que os observados em abril, mas foram índices toleráveis, não causando danos econômicos às colmeias. Os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

As colmeias CC e CTR, apresentaram índices superiores ao tolerável por Harris, Sheridan e MacGown (2016), que está próximo aos 5,1%. Contudo, nesse período as rainhas começam a diminuir a postura e a maioria dos ácaros que ficariam dentro das células de cria para reprodução, parte se concentra nos alvéolos de crias existentes e outra parte migra para as abelhas adultas, o que faz aumentar o índice de infestação.

No mês de junho, a média do índice de infestação aumentou em todos os tratamentos, apesar disso, eles estavam dentro do nível tolerável. Os tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si.

Em julho, os índices de infestação foram ainda maiores que o mês de junho, contudo não altos a ponto de causar preocupação. Os tratamentos CTR e CR apresentaram um aumento numericamente superior aos demais, mas os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

No mês de agosto, todos os tratamentos apresentaram uma diminuição no índice infestação, exceto em CR, que mostrou um aumento, assim como ocorreu no índice de *V. destructor* na cria, o que o levou a apresentar diferenças estatísticas entre os tratamentos CT e CO. Isso se deve, possivelmente, aos efeitos subletais do tratamento introduzido, que levou a uma diminuição no número de crias e abelhas adultas.

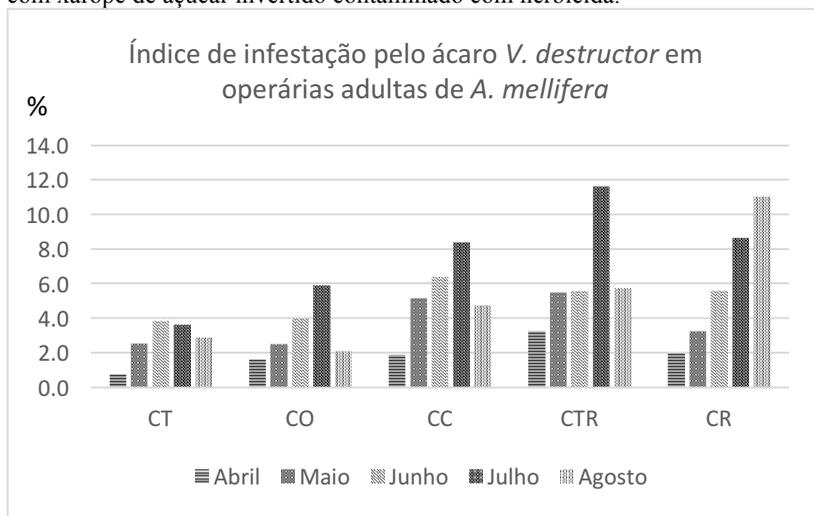
De acordo com os dados (Figura 25), percebe-se que o índice de infestação em operárias adultas flutua de acordo com o número de abelhas operárias adultas e pelo número de crias. Quanto menor o número de cria, maior é o índice de infestação nas abelhas adultas. No período de abril a julho, a tendência é aumentar o índice de infestação e voltou a diminuir em agosto, quando as rainhas voltaram a ovipositar normalmente. As colmeias do tratamento CR, apresentaram um aumento no índice, visto que elas não conseguiram se recuperar e, por isso, muitas delas estavam sem rainha, o que justifica o aumento no índice de infestação.

Os tratamentos CC, CTR e CR influenciaram na postura da rainha, diminuindo-a, além disso, diminuíram, provavelmente, a longevidade das abelhas, visto que foi observado uma queda acentuada na população desses indivíduos. Pode-se inferir que o fator densidade populacional está associado aos níveis de infestação do ácaro, visto que uma menor densidade, provoca uma concentração dos ácaros e, conseqüentemente, um aumento no índice de infestação.

Oldroyd (2007), citou a proteína Cry como fator responsável pelo aumento da suscetibilidade das abelhas à ação de ácaros e outras pragas e patógenos, que, em situações normais, não causariam estragos de tão grande dimensão como os que se têm observado. Wu, Anelli, Sheppard (2011), observaram efeitos subletais em abelhas submetidas a pesticidas, após diversos gerações de cria em favos contaminados, como atraso no desenvolvimento larval e emergência tardia da operária adulta, o que promove maior fecundidade do ácaro. Esses efeitos podem parecer inconseqüentes, mas podem proporcionar uma vantagem reprodutiva para os ácaros *V. destructor*, visto que, quando um ácaro fêmea invade uma célula ocupada por uma larva de abelha em desenvolvimento, ele é capaz de colocar quatro ovos em intervalos de 30 horas. Normalmente, o terceiro ovo fêmea colocado, tem baixa probabilidade de atingir a maturidade antes que a abelha nasça. No entanto, com a emergência tardia da abelha adulta, a probabilidade do terceiro ovo fêmea alcançar com êxito a maturidade, aumenta. Apesar disso, os dados encontrados neste trabalho, parecem estar mais ligados aos efeitos subletais que,

possivelmente, causaram danos a longevidade das abelhas e, conseqüentemente, diminuiu a população das colmeias, levando a um aumento no índice de infestação pelo ácaro *V. destructor*.

Figura 25 Flutuação do índice de infestação pelo ácaro *V. destructor*, em operárias adultas, de abril (antes da introdução dos tratamentos) a agosto nos tratamentos CT – Colmeia testemunha; CO – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja orgânica; CC – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja convencional; CTR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido e farinha de soja transgênica; CR – Colmeia tratada com xarope de açúcar invertido contaminado com herbicida.



A resistência das abelhas ao ácaro *V. destructor*, é determinada por uma complexa interação de mecanismos relativos ao tamanho reduzido das células de cria, do menor tempo de desenvolvimento da cria de operária, além da taxa de infertilidade do ácaro (MESSAGE, 1997). As condições climáticas, o fluxo de alimento, a quantidade da cria em desenvolvimento, a porcentagem do CH, além da subespécie *A. mellifera*, foram considerados fatores importantes no desenvolvimento deste ácaro (DE JONG; GONÇALVES; MORSE, 1984; MORETTO et al., 1991; DE JONG; SOARES, 1997; CORREA-MARQUES et al., 2003). Outro comportamento de imunidade é o grooming, que é ato de limpar o seu próprio corpo ou de um outro indivíduo do mesmo grupo (WILSON-RICK; DRES, S. T.; STARKS, 2008). Moretto et al. (1993), trabalhando com abelhas operárias parasitadas artificialmente com

fêmeas adultas de *Varroa*, perceberam que elas são capazes de se livrar do parasita, minutos após a infestação, através do comportamento de grooming (MORETTO; MELLO JR., 1999).

De Jong et al. (1984); Ruttner; Marx e Marx (1984); Gonçalves (1987), dizem que regiões com condições tropicais, como Brasil, e subtropicais, os índices de infestação do ácaro se estabilizaram, onde registram-se baixos níveis do parasita. Moretto et al., (1991), observaram que regiões com temperaturas muito baixas no período de outono e inverno, possuem índices de infestação mais altos. Eles atribuem isso, a uma redução no número de operárias adultas e na cria, o que corrobora com os dados encontrados neste trabalho. Anastácio et al. (2013), também encontraram maior infestação durante o inverno quando comparada as outras estações do ano. Castagnino e Orsi (2012), encontraram índices de infestação de 14,8%, nos meses de junho e julho, em colmeias instaladas em um apiário na cidade de Santana do Livramento, no RS. Torres e Barreto (2013), encontraram índices de infestação em operárias adultas, de 0,04% a 20,73% em municípios do Mato Grosso, no período de julho a agosto. Esses índices foram superiores aos encontrados neste trabalho, exceto para as colmeias CR, que apresentaram índices ainda mais altos, devido aos efeitos subletais do tratamento. Esses índices foram mais altos aos encontrados neste trabalho, no mesmo período.

Moretto e Mello Jr. (2003) verificaram, em colmeias instaladas no apiário experimental do Departamento de Ciências Naturais, da Universidade Regional de Blumenau, SC, grau de infestação em operárias adultas de $2,33 \pm 0,83\%$ (média e desvio padrão) e $5,06 \pm 2,47\%$ em crias de operárias ou zangões. Esses índices são semelhantes aos encontrados neste trabalho, nos meses de abril e maio. Contudo, os autores não deixam claro a época do ano que as análises foram realizadas.

Bacha Júnior, Silva e Pereira (2009), observam índices de infestação de 4,7%, a 20,2% na microrregião de Viçosa, MG. Algumas médias foram bastante altas, contudo, os autores não disseram o período do ano que as análises foram realizadas.

Autores relatam uma tolerância que algumas populações de abelhas têm aos ácaros. Aparentemente, algumas colmeias alcançaram um equilíbrio hospedeiro/parasita como resultado da seleção natural, também está comprovado que o clima e as diferentes subespécies de *A. mellifera* são fatores que afetam o desenvolvimento do ácaro (DE JONG et al., 1984; MORETTO et al., 1991; DE JONG; SOARES, 1997; MORETTO; MELLO JR, 1999). Há relatos que colmeias com

infestação de até 8 mil ácaros sobreviveram por 4 anos sem a utilização de produtos para controle desta praga (RITTER, 1981; KORPELA et al., 1992; FRIES; CAMAZINE; SNEYD, 1994). Na França, colmeias de *A. mellifera* sobreviveram de um a dois anos (ROBAUX, 1986), registrando-se casos onde algumas colmeias sobreviveram de 10 a 12 anos sem tratamento (LE CONTE et al., 2007; DE JONG; SOARES, 1997). Segundo Spivak e Gilliam (1998), a tolerância das abelhas ao ácaro se deve ao seu CH. Eles os classificaram como VSH (higiene sensível ao *Varroa*), quando as abelhas são capazes de reduzir as populações do ácaro (SPIVAK; GILLIAM, 1998). VSH é uma forma de higiene em que as abelhas têm maior resposta ao *Varroa*, ou seja, maiores frequências de ácaros são removidas por abelhas com VSH do que por abelhas higiênicas que são capazes de identificar e retirar crias mortas (FKB) (IBRAHIM; SPIVAK, 2006).

6 CONCLUSÃO

As farinhas de soja orgânica comercial e a farinha de soja produzida no Labento, não apresentaram proteína rCry1Ac na sua composição. A farinha de soja transgênica produzida no Labento, apresentou proteína rCry1Ac na sua composição.

Colmeias submetidas à alimentação com farinha de soja convencional, transgênica e alimentação energética com resíduos de Roundup têm seu CH reduzido, devido aos seus efeitos subletais;

A intensidade de infecção por *Nosema* spp. pode ser menor em colmeias submetidas a tratamentos com presença de proteína rCry1Ac e Roundup, apesar disso, as abelhas contaminadas por esses patógenos apresentam uma carga de esporos superior as não tratadas.

Colmeias submetidas à alimentação com farinha de soja convencional, transgênica e alimentação energética com resíduos de Roundup apresentam maior índices de infestação por *Varroa* em crias de operárias e operárias adultas.

As abelhas não são capazes de diferenciar alimentos contendo proteína rCry1Ac ou Roundup, eles são recolhidos, armazenados em favos e, aos poucos, são fornecidos às suas crias.

Os efeitos causados sobre a população de abelhas tratadas com alimentos transgênicos e com herbicidas, não são imediatos. São necessárias algumas gerações para que sejam observados resultados significativos sobre a qualidade, comportamento e sanidade das colmeias.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Muitos trabalhos têm mostrado os efeitos subletais dos transgênicos e de agrotóxicos, como herbicidas, no desenvolvimento e nas atividades das abelhas *A. mellifera*. Contudo, a grande maioria deles é realizada em laboratório o que não mostra a realidade vivenciada pelas abelhas à campo.

Esse trabalho teve como intuito, observar os impactos reais sofridos pelas abelhas, especialmente em relação à sua sanidade apícola.

As análises foram prejudicadas pelas alterações sofridas pelas colmeias, especialmente pela perda de rainhas durante a execução do experimento.

Ensaio futuros deveriam manter maior uniformidade ambiental e genética nas parcelas.

Outro ponto importante, seria a realização de análises da composição nutricional e a identificação das substâncias tóxicas presentes nas farinhas e suas respectivas concentrações. Deve-se avaliar também esses fatores nos alimentos armazenados na colmeia, como o mel e o pão de abelha durante todo o período experimental.

Apesar de ser muito difícil, visto que, os tratamentos causam efeitos subletais que podem levar a perda de colmeias inteiras em poucos meses, seria muito interessante avaliar a flutuação de doenças e pragas e o desenvolvimento das abelhas durante todas as estações do ano. Assim, ficaria mais claro o comportamento desses indivíduos em relação ao clima.

Os resíduos de agrotóxicos e transgênicos acumulados dentro da colmeia, têm efeitos negativos sutis e muitas vezes discretos a curto prazo, mas que podem prejudicar os processos comportamentais e sanitário a médio e longo prazo. Portanto é necessário um grande esforço de pesquisa para elaboração de protocolos que facilitem a análise e discussão final dos dados para, então, elucidar melhor os impactos causados sobre as abelhas.

8 REFERÊNCIAS

ABRAMS, R. I.; EDWARDS, C. R.; HARRIS, T. Yields and cross-pollination of soybeans as affected by honeybees and alfalfa leaf cutting bees. **American Bee Journal**, v. 118, p. 555-556, 558, 1978.

AGROESTE. **Variedades de Soja Intacta RR2 PRO™ Agroeste – Safra 2014/15**. [S.l.], 2014, 20 p.

AKYOL, E. et al. The effects of additive feeding and feed additives before wintering on honey bee colony performance, wintering abilities and survival rates at the East Mediterranean Region. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.9, n.4, p.589-592, 2006.

ALBANEZ, J. R. Apicultura: manejo do apiário. [S.l.]: EMATER-MG. 2000. 4 p. Informe técnico.

ALVES, M. C. **Identificação e caracterização de genes cry3, vip1, vip2 e vip1/vip2 em isolados de *Bacillus thuringiensis* e toxicidade em larvas de *Anthonomus grandis* (BOHEMAN, 1883) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2011.

ALVES, S. B.; FLECHTMANN, C. H.; ROSA, A. E. *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904 (Acari, Mesostigmata, Varroidae) also in Brazil. **Ecossistema**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 78-79, 1979.

ANADÓN, A.; et al. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**, v. 190, p. 91–95, 2009.

ANASTÁCIO; M. D.; et al. Nível de infestação de *Varroa destructor* em *Apis mellifera* africanizadas nas diferentes estações do ano. 2º Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense – SICT-Sul, p. 61-68. 2013.

ANDERSON, D. L. Pest and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Fiji. **Journal of Apicultural Research**, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 53-59, 1990.

ANDERSON, D. L.; FUCHS, S. Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, [S.l.], v. 37, n. 2, p. 69–78, 1998.

ANDOW, D. A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for non-target effects of transgenic crops. **BioScience**, Washington, v. 54, n. 7, p. 637-649, 2004.

ANDRIGHETTI, M.S. Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solo cultivados com macieira com diferentes histórico de aplicação deste herbicida. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, n. 5, 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Notas Técnicas – Capina química. 2010. Disponível em: www.anvisa.gov.br Acesso em: 29 de agosto de 2015.

ARATHI, H. S.; BURNS, I.; SPIVAK, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): behavioral repertoire of hygienic bees. **Ethology**, v. 106, p. 365–379, 2000.

AUMEIER, P.; ROSENKRANZ, P. Scent or movement of *Varroa destructor* mites does not elicit hygienic behaviour by Africanized and Carniolan honey bees. **Apidologie**, v. 32, p. 253–263, 2001.

AZEVEDO-BENITEZ, A. L. G.; R. H. NOGUEIRA-COUTO. Estudo de algumas dietas artificiais visando à produção de geléia real em colônias de *Apis mellifera*. In: III ENCONTRO SOBRE ABELHAS, Ribeirão Preto, SP, 1998. p. 227-230.

BACHA JÚNIOR, G.; FELIPE-SILVA, A. S.; PEREIRA, P. L. L. Taxa de infestação por ácaro *Varroa destructor* em apiários sob georreferenciamento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.6, p.1471-1473, 2009.

BACKER, M. D.; PENG, C. Y. S. *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*: A perspective of life history and why Asian bee mites preferred European honeybee. **American Bee Journal**, [S.l.], v. 135, n. 6, p. 415-420, 1995.

BAKER, M. D.; PENG, C. Y. S. *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*: A perspective of life history and why Asian bee mites preferred European honeybees. **American Bee Journal**, v. 135, n. 6, p. 415-420, 1995.

BAMBARA, S. B.; AMBROSE, J. T. Three parasites of the greater wax moth, *Galleria mellonella* observed in North Carolina. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 121, n. 2, p. 104, 105, 1981.

BECHER, M. A.; MORITZ, R. F. A. A new device for continuous temperature measurement in brood cells of honeybees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 40, p. 577-84. 2009.

BECNEL, J. J.; ANDREADIS, T. G. Microsporidia in insects. In: WITTNER, M. (Ed.); WEISS, L. M. **The Microsporidia and Microsporidiosis**. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 447-501.

BELDEN, J. B.; et al. Relative toxicity and occurrence patterns of pesticide mixtures in streams draining agricultural watersheds dominated by corn and soybean production. **Integr. Environ. Assess. Manag.**, v. 3, n. 1, p. 90-100, 2007.

BENJAMIN, A, McCALLUM, B. **A World without Bees**. New York: Pegasus, 2009. 256 p.

BERNAL, J. et al. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. **Pest Management Science**, v. 67, p. 1320-1331, 2011.

BERNARDES, C. O. Abordagem sobre *Anticarsia gemmatalis*, seus inimigos naturais *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* e a interação entre estes. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 21, 2011.

BERNARDI, O. Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 × MON 89788 no Brasil. 2012. 116f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2012.

BIERNASKIE, J. M.; CATAR, R. V.; HURLY, T. A. Risk-averse inflorescence departure in hummingbirds and bumble bees: could plants benefit from variable nectar volumes? *Oikos*, v. 98, p. 98-104, 2002.

BIZZOCCHI, L. Avaliação Dos Impactos Do Pólen De Milho Geneticamente Modificado (Bt) Sobre Colônias De *Apis mellifera* L. 2014, 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2014.

BOECKING, O.; DRESCHER, W. The removal response of *Apis mellifera* L. colonies to brood in wax and plastic cells after experimental and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud.; to freeze-killed brood. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 16, p. 321-329, 1992.

BOECKING, O.; DRESCHER, W. Rating of signals which trigger *Apis mellifera* L. bees to remove mite-infested brood. **Apidologie**, v. 25, p. 459-461, 1994.

BOECKING, O.; SPIVAK, M. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie**, v. 30, p. 141-158, 1999.

BOGDANOV, S.; KILCHENMANN, V.; IMDORF, A. Acaricide residues in bees wax and honey, Proc.XXXVth Internat. Congr. Apicult. (Summaries), Antwerpen, Apimondia Publ. House, Bukarest: p. 81-82, 1997.

BOHN, T.; et al. Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-transgenic maize variety. **Arch Environ Contam Toxicol.**, Tronso, v. 55, p. 584–592, 2008.

BOOT, W. J.; CALIS, J. N. M.; BEETSMA, J. Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental and Applied Acarology*, v. 16 p. 295-301, 1992.

- BOUTIN, S.; et al. Differential gene expression between hygienic and non-hygienic honeybee (*Apis mellifera* L.) hives. *BMC Genomics*, v. 16, p. 13, 2015.
- BRIDI, M. Danos de percevejos pentatomídeos (Heteroptera: Pentatomidae) nas culturas da soja e do milho na região Centro-Sul do Paraná. Guarapuáva, PR. 2012. 73f.
Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO, Paraná, 2012.
- BRILLET, C., et al. Racial differences in division of labor in colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). *Ethology*, v. 108, p. 115-126, 2002.
- BRYSCH-HERZBERG, M. Ecology of yeasts in plant– bumblebee mutualism in Central Europe. ***Microbiology Ecology***, v. 50, n. 87, p. 87-100, 2004.
- ÇAGLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sib-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, v. 25, p. 57- 62, 2008.
- CALDERONE, N. W.; KUENEN, L. P. S. Effect of honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), colony, cell type and larval sex on host selection by female *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). ***J. Econ. Entomol.***, v. 94, p. 1022-1030, 2001.
- CALDERONE, N. W.; LIN, S.; KUENEN, L. P. S. Differential infestation of honey bee, *Apis mellifera*, worker and queen brood by the parasitic mite *Varroa destructor*. ***Apidologie***, v. 33, p. 389–98, 2002.
- CALI, A; WEISS, L. M; TAKVORIAN, P. M. A review of the development of two types of human skeletal muscle infection from microsporidia associated with pathology in invertebrates and cold-blooded vertebrates. ***Folia parasitol***, New Jersey, v. 52, p. 51-61, 2005.
- CAPALBO, D.M.F.; et al. Brazil and the development of international scientific biosafety testing guidelines for transgenic crops. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 83, p. 104-106, 2003.

CANTO, A.; et al. Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): An experimental test. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 3, p. 315-320, 2008.

CANTWELL, G.E. Standard methods for counting *Nosema* spores. **American Bee Journal**, [S.l.], v. 110, p. 220-223, 1970.

CARDOZO, M. M. Manejo do apiário localizado no complexo da cidade das abelhas – Florianópolis – SC. 2014, 82 p. Trabalho de conclusão de curso (Agronomia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARNEIRO, F. E.; et al. Changes in the reproductive ability of the mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) in africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in southern Brazil. **Neotropical Entomology**, Blumenau, v. 36, n. 6, p. 949- 952, 2007.

CASTAGNINO, G. L. B.; et al. Avaliação da eficiência nutricional do substituto de pólen por meio de medidas de áreas de cria e de pólen em *Apis mellifera*. **Revista Ceres**, v.51, n.295, p.307-315, 2004.

CASTAGNINO, G. L. B.; ORSI, R. O. Produtos naturais para o controle do acaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas em africanizadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 738-744, 2012.

CASTILLO, R. Varroasis, grave amenaza para la apicultura y la agricultura de nuestro país. **Chile Hortofrutícola**, [S.l.], v. 5, n. 26, p. 18-22, 1992.

CAVALIER-SMITH. A revised 6-kingdom system of life. **Biol. Ver.**, Vancouver, v. 3, n. 73, p.203-266, 1998.

CHALMERS, W. T. Fish meals as pollen-protein substitutes for honeybees. **Bee World**, v. 61, p. 89-96, 1980.

CHEN, Y., et al. *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidean infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, Beltsville, v. 97, n. 2, 186–188, 2008.

CHIARI, W. C.; et al. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [*Glycine max* (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum Agron.**, v. 30, n. 2, p. 267-271, 2008.

CHIESA, F.; MILANI, N.; D'AGARO, M. 1989. Observations on the reproductive behaviour of *Varroa jacobsoni* Oud.: techniques and preliminary results. In: **Present Status of Varroatosis in Europe and Progress in the Varroa Mite Control**, ed. R Cavalloro, pp. 213–22.

CIARLO, T. J.; et al. Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. **PLoS One**, v. 7, n. 7, 2012.

CLAUDIANOS, C; et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honey bee. **Insect Molecular Biology**, v. 15, p. 615-636, 2006.

COLLISON, C. A Closer look: *Varroa* mite reproduction. *Bee Culture*, [S.l], v. 143, n. 4, p. 25, 2015.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra bras. grãos, v. 12 Safra 2015/16 - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-182, 2016.

setembro 2016. Disponível em:
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf Acesso em: 12 de outubro de 2016.

CORREA-MARQUES, M.H.; et al. Comparing data on the reproduction of *Varroa destructor*. **Genetics and Molecular Biology**, v.2, p.1–6, 2003.

CORTEZ, H. M., Trujillo, J. A. Incidencia del gusano cogollero y sus enemigos naturales en tres agrosistemas de maíz. **Turrialba**, v. 44, p.1-9, 1994.

COUTO, L.A. Nutrição de abelhas. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Salvador. BA, p. 92-95. 1998.

CRANE, E. The Var roa mite. **Bee World**, v. 59, p. 164–167. 1978.

CRANE, E.; WALKER, P. Pollination of tropical and subtropical crops by bees. In: Crane, E., Walker, P. The impact of pest management on bees and pollination. Cardiff: IBRA. p. 5-21. 1983.

CREMER, S.; ARMITAGE, S. A. O.; SCHMID-HEMPEL, P. Social Immunity. Social immunity. **Current Biology**, v. 17, p. 693–702, 2007.

CREMONEZ, T. M.; DE JONG, D.; BITONDI, M. M. G. Quantification of hemolymph proteins as a fast testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v, 91, p. 1284-1289, 1998.

CREMONEZ, T.M et al. Efeitos da nutrição na saúde das abelhas. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 5., 2002, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, 2002. v.5, p. 225-228.

CRICKMORE, N.; et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2016. Disponível em: < <http://www.btnomenclature.info> > Acesso em 21 de ago. de 2016.

CRUZAT, R.; BAASCH, V. Resultados y Lecciones en Productos en Base a Aceites Esenciales Microencapsulados para el Control del Ácaro *Varroa*: Proyecto de Innovación en Región del Maule. **Serie experiencias de innovación para el emprendimiento agrário**. Santiago: Pecuário/Apicultura, 2009. 52 p.

DECOURTYE, A.; et al. Impairment of olfactory learning performances in the honey bee after long term ingestion of imidacloprid. In: Belzunces LP, Pellissier C, Lewis GB, editors. Hazard of pesticides to bees. Paris: INRA; 2001. p. 113–117.

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.

DECOURTYE, A.; et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicol Environ Saf.**, v. 57, p. 410–419, 2004.

DECOURTYE, A.; et al. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pest Biochem Physiol.**, v. 78, p. 83–92, 2004.

DECOURTYE, A.; et al. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Arch Environ Contam Toxicol.**, v. 48, p. 242–250, 2005.

DE GRAAF, D. C.; et al. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, Gent, v. 63, n. 1. p. 74–81, 1994.

DE JONG, D.; GONÇALVES, L.S. The *Varroa* problem in Brazil. **Am. Bee J.**, v.121, p.186-189, 1981

DE JONG, D.; GONÇALVES, L. S.; MORSE, R. A. Dependence on climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. **Bee World**, Ithaca, v. 65, n. 3, p. 117-121, 1984.

DE JONG, D. Mites: *Varroa* and other parasites of brood. In: MORSE, R. A.; FLOTTUM, K. (Ed.). **Honey bee pests, predators and diseases**. 3. ed. Medina, Ohio: Root Company, 1997. p. 279-327.

DE JONG, D.; GONÇALVES, L. S. The Africanized bees of Brazil have become tolerant to *Varroa*. **Apiacta**, [S.l.], v. 33, p. 65-70, 1998.

DE JONG, D.; MESSAGE, D. New and exotic disease threats for Brazilian bees. In: VIII ENCONTRO SOBRE ABELHAS. Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2008. p. 50-52.

DE JONG, D.; MORSE, R. A.; EICKWORT, G. C. Mite pests of honey bees. **Ann. Rev. Entomol.**, Ithaca, v. 27, n. 1, p. 229-252, 1982.

DE JONG, D.; SOARES, A. E. E. An isolated population of Italian bees that survived *Varroa jacobsoni* infestation without treatment for over 12 years. **American Bee Journal.**, v. 137, p. 742-745, 1997.

DE MAAGD, R. A.; et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, [S.l], v. 37, p. 409–433, 2003.

DELAPLANE, K. S.; MAYER, D. F. Crop Pollination by Bees. **Department of Entomology, University of Georgia**, Athens, p. 345, 2000.

DEL HOYO, M.; RODRIGUEZ, G. Protocolos de Laboratorio de Sanidad Apícola. **Boletín PROAPI**, p. 27, 1997.

DELFINADO-BAKER, M.; AGGARWAL, K. A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). **International Journal of Acarology**, [S.l], v. 13, n. 4, p. 233-237, 1987.

DELFINADO-BAKER, M.; HOUCK, M. A. Geographical variation in *Varroa jacobsoni* (Acari, Varroidae): application of multivariate morphometric techniques. **Apidologie**, Tucson, v. 20, n. 4, p. 345-358, 1989.

DELFINADO, M. D.; BAKER, E. W. Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina). **Journal of Washington Academic Science**, Washington, v. 64, n. 1, p. 4-10, 1974.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.

DE SOUZA, L. L. A logística da Soja na Fronteira Agrícola Norte e Nordeste. **Grupo de Pesquisa e Extensão em Logística Agroindustrial - ESALQ-LOG**, p. 28, 2012.

DEVILLERS, J. The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELEGUE, M. H. (Ed.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. p. 1-332.

DEVILLERS, J.; PHAM-DELEGUE, M.-H. **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. 332 p.

DIAS, B. F. S.; RAW, A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **International Pollinators Initiative: The São Paulo Declaration on Pollinators. Report on the Recommendations of the Workshop on the Conservation and Sustainable Use of Pollinators in Agriculture with Emphasis on Bees**. Brasília: Brazilian Ministry of the Environment (MMA) p. 66, 1999.

DGV - Direção Geral de Veterinária. Doenças das abelhas – diagnóstico, tratamento e profilaxia. Lisboa: **Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas**, 2008.

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. 367-374, 1980.

DUAY, P.; DE JONG, D.; ENGELS, W. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. **Apidologie**, Tübingen, v. 34, p. 61-65, 2003.

ELEKONICH, M. M.; ROBERTS, S. P. Honey bees as a model for understanding mechanisms of life history transitions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 362-371, 2005.

EMBRAPA. Novas cultivares de soja de elevada produtividade são lançadas na Bahia 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1754219/novas-cultivares-de-soja-de-elevada-produtividade-sao-lancadas-na-bahia>> Acesso em 10 de jun. de 2015.

EMBRAPA MEIO-NORTE. Desordem do Colapso das Colônias (DCC). [S.d.] Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/desordemColapso.php>> Acesso em 10 de jun. de 2015.

ENTWISTLE, P. F.; et al. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: John Wiley e Sons, 1993. p. 311.

EPAGRI/PECA - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão do Estado de Santa Catarina/Parque ecológico Cidade das Abelhas.

Alimentação para abelhas *Apis mellifera*. Epagri/GMC. 2011. 5 p. Informe técnico.

ERICKSON, B.; et al. Speech style and impression formation in a court setting: The effects of “powerful” and “powerless” speech. **Journal of Experimental Social Psychology**, v. 14, p. 266-279, 1978.

ERICKSON, E. H. Effect of honey bees on yield of three soybean cultivars. **Crop Science**, v. 15, n. 1, p. 84-86. 1975.

ERICKSON, E. H.; GARMENT, M. B. Soya-bean flowers: nectary ultra structure, nectar guides, and orientation on the flower by foraging honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 18, n. 1, p. 1-11. 1979.

ESPÍNDOLA, E. A. et al. Curso profissionalizante de apicultura. Florianópolis: Epagri, 2002. 136 p.

EVANS, J. D. Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. **J. Invertebr. Pathol.** v. 93, n. 2, p. 135-9. 2006.

FENG, J. C.; THOMPSON, D. G.; REYNOLDS, P. E. Fate of Glyphosate in a Canadian Forest Watershed. 1. Aquatic Residues and Off Target Deposit Assessment. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, p. 1110-1118. 1990.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - the international response. In: Freitas, B.M.; Pereira, J.O.P. (eds.) **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Imprensa Universitária. Fortaleza, Brasil. p. 19-2. 2004.

FARIA, M.F.; et al. Assessing the effects of *Bt* Cotton on Generalist Arthropod Predators. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.A.; FONTES, E.M.G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing *Bt* cotton in Brazil**. Wallingford: CABI publishing, 2006. v. 2, p. 175-199.

FAUCON J. P.; et, al. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Pest Manag Sci.**, v. 61, p. 111- 125, 2005.

FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. ROUNDUP N. A. Monsanto do Brasil Ltda, Limoeiro, n. 2, p. 1-7, 2008.

FIUZA, L.M. *Bacillus thuringiensis*: características e o potencial no manejo de insetos. **Acta Biológica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 23, n. 2, p. 141-156. 2001.

FLORIS, I. Dispersion indices and sampling plans for the honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spin.) mite *Varroa jacobsoni* Oud. **Apicultura**, v. 7, p. 161–70, 1991.

FOKING, S; *et al.* Infecting the hipotrichous ciliate, Euplotes woodruffi, with observations on microsporidian infections in Ciliophora. **Journal of Eukaryotic Microbiology.**, [S.l.], v. 55, n. 3, p. 214-228, 2008.

FOSENCA, V. L. I.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNI, A. Abelhas sociais e flores análise polínica como método de estudo. In: PIRANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. Flores e abelhas em São Paulo. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 1993. cap. 1, p. 17-30.

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.

FOSENCA, V. L. I.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNI, A. Flores e abelhas em São Paulo: Abelhas sociais e flores análise polínica como método de estudo. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 1993. cap. 1, p. 17-30.

FRANZEN, C.; MÜLLER, A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. **Clinical Microbiology Reviews**, Cologne, v. 12, n. 2, p. 243-285, 1999.

FREE, J. B. Insect pollination of crops. **Academic Press**, London, UK. n. 2, p. 4, 1993.

FRIES, I., *Nosema apis* - a parasite in the honey bee colony. **Bee World**, [S.l.], v. 74, n. 1, p. 5-19. 1993.

FRIES, I., CAMAZINE, S., SNEYD, J. Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. **Bee World**, v. 75, p.5–28, 1994.

FRIES, I.; et al. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. **Journal of Apicultural Research**, [S.l.], v.45, n.3, p.230–233, 2006.

FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, Uppsala, v. 103, n. 1, p. 573-579, 2010.

GALLAI, N.; et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecol. Econ.**, v. 68, p. 810–21, 2009.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: Monsanto do Brasil; 2005. 60 p.

GALLO, D. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. xv, 920p.

GIERSCH, T.; et al. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. **Apidologie**, n. 40, p. 117–123, 2009.

GIESY, J. P.; DOBSON, S., SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GIFFORD, C. Colony collapse disorder: The vanishing honeybee (*Apis mellifera*). 2011. 59 p. Tesis (Environmental Studies), University of Colorado, Boulder, 2011.

GILL, S. S., COWLES, E. A., PIETRATONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**. Riverside, v. 37, p. 615-636. 1992.

GOLDSBOROUGH, L. G.; BROWN, D. J. Effect of Glyphosate (Roundup® Formulation) on Periphytic Algal Photosynthesis. **Bull. Environ. Contain. Toxicol.**, n. 41, p. 253- 260. 1988.

GOMEZ, S. A.; ÁVILA, C. J. Controle químico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera Frugiperda* (Smith, 1792), na cultura do trigo. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, p. 18, 2001.

GONÇALVES, L.S. Consequências do desaparecimento (CCD) das Abelhas no Agronegócio Apícola Internacional e em especial no Brasil. In: X Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, SP, 2012. p. 24-25.

GOULSON, D.; et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

GRAMACHO, K. P. Estudo do comportamento higiênico em *Apis mellifera* como subsídio a programas de seleção e melhoramento genético em abelhas. 1995. 108 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 108p.

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: Congresso Latinoiberoamericano de Apicultura, 4, 1994, Cordoba. **Resumos...** Cordoba, 1994. p.45.

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S., ROSENKRANZ, P. Temperature measurements of living and killed (“pin test”) honey bee brood (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 28, n205–207, 1997.

GRAMACHO, K. P. Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas *Apis mellifera*. 1999. 225 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999a.

GRAMACHO, K. P.; et al. Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. **Apidologie**, v. 30, n. 5, p. 367-374. 1999b.

GROOT, A.T.; DICKE, M. Insect-resistant transgenic plants in a multitrophic context. **The Plant Journal**, Wageningen, v. 31, n. 4, p. 387-406, 2002.

GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.

GUERRA Jr, J.C.V. (2000). Comportamento de remoção de crias de operárias africanizadas (*Apis mellifera* L.) infestadas com o ácaro *Varroa jacobsoni* e alguns aspectos envolvidos no parasitismo. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. 114 p.

GUY, C.L.; HUBER, J.L.A.; HUBER, S.C. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. **Plant Physiology**, v.100, n.1, p. 502-508, 1992.

HALD, A. B. Weed vegetation (wild flora) of long established organic versus conventional cereal fields in Denmark. **Ann Appl Biol.**, v. 134, n. 3, p. 307–14, 1999.

HANLEY, A; HUANG, Z; PETT, W. Effects of dietary transgenic *Bt* corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Gallaria mellonella*. **Jornal of Apicultura Research**, East Lansing, v. 42, n. 4, p. 77-81, 2003.

HARRIS, J. W.; DANKA, R. G.; VILLA, J. D. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) with the trait of *Varroa* sensitive hygiene remove brood with all reproductive stages of *Varroa* mites (Mesostigmata: Varroidae). **Ann Entomol Soc Am.** v. 103, p. 146–152, 2010.

HARRIS, J.; SHERIDAN, B. MaCGOWN, J. A. Managing *Varroa* mites in honey Bee colonies. Extension Service of Mississippi State University Research, Department of Biochemistry, Molecular Biology, Entomology, and Plant Pathology v. 2826, p. 12, 2016.

HEBERT, H.; et al. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology*, v. 217, n. 3457-3464, 2014.

- HERRERA, C. M.; et al. Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. **Annals of Botany**, v. 103, n. 9, p. 1415-1423, 2009.
- HENDRIKSMA, H. P.; HARTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER. Testing pollen of single and stacked insect-resistant *Bt* maize on in vitro reared honey bee larvae. **Plos One**, Ghent, v. 6, n. 12, p. 7, 2011.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. **Journal of Invertebrate Pathology**, Madrid, v. 92, n. 2, p. 93–95, 2006.
- HIGES, M.; et al. Experimental infection of *Apis mellifera* with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **J. Invertebr. Pathol.** v. 94, p. 211–217, 2007.
- HIGES, M.; et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology Reports**, Marchamalo, v 10, n. 10, p. 2659-2669, 2008.
- HIGES, M.; et al. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, Marchamalo, v. 1, n. 6, p. 495-498, 2009.
- HIGES, M.; et al. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. **Environmental microbiology reports**, Junta de Castilla-La Mancha, v. 5, n. 1, p. 17-29, 2013.
- HILBECK, A.; et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, v.27, p.1255-1263, 1998.
- HIN, C. J. A. Perspectivas de mercado para soja sustentável na Holanda. **CLM Onderzoek en Advies BV** (Centro de Pesquisa para a Agricultura e Meio Ambiente) Utrecht, Holanda, 2002.
- HOMRICH, M. S.; et al. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 2, p. 522-531, 2008.

HUANG, W. F.; et al. The novel organization and complete sequence of the ribosomal gene of *Nosema bombycis*. **Fung. Genet. Biol.** v. 41, p. 473–481, 2004.

HUANG, Y. B.; et al. Utilization of *Arachis pintoi* in red soil region and its efficiency on water-soil conservation in China. **13th International Soil Conservation Organisation Conference** - Brisbane, Paper 950, 2004.

HUANG, J.; et al. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, Changchun, v. 24, n. 4, p. 632–637, 2008.

HUMAN, H.; NICOLSON, S. W.; DIETEMANN, V. Do honeybees, *Apis mellifera scutellata*, regulate humidity in their nest? **Naturwissenschaften**, v. 93, n. 8, p. 397-401, 2006.

HYVONEN, T.; SALONEN, J. Weed species diversity and community composition in cropping practices at two intensity levels: a six-year experiment. **Plant Ecol.**, v. 159, n. 1, p. 73–81, 2002.

IARC MONOGRAPHS – INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. World Health Organization, 2015. 464 p. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112.pdf>
Acesso em: 14 de março de 2016.

IFANTIDIS, M. D. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and honeybee brood cells. **J. Apic. Res.**, v. 22, p. 200–6, 1983.

IICA - INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. **Manual de Enfermedades Apícolas**. Tegucigalpa, Honduras: IICA/SAG. 2009. 54 p.

INGRAM, M.; NABHAN, G. P.; BUCHMANN, S. Impending pollination crisis threatens biodiversity and agriculture. **Tropinet**, Tucson, v. 7, n. 2, p. 1-2, 1996.

IOIRICH, N. P. **As abelhas farmacêuticas com asas**. 2. ed. URSS: Mir, 1986. 248 p.

ISSA, M. R. C.; et al. Ensaio de polinização da soja (*Glycine max*) por abelhas (*Apis mellifera*). In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 5., 1984. Congresso Ibero-Americano de Apicultura, 3., Viçosa - MG. **Anais...** Viçosa - MG. 1984.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops. **ISAAA Briefs**, Ithaca, n. 49, p.275, 2014.

JAYCOX E. R., – Estimation of the severity of *Nosema* infection. **Unedited bulletin**. University of Illinois, Champaign, 4 p. 1980.

JENKINS, J. L.; et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to Manduca sexta aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity. **FEBS Letters**, Columbus, v. 462, n. 3, p. 373-376. 1999.

JOHNSON, R. "Recent Honey Bee Colony Declines". **Congressional Research Service**, [S.l.], p. 17. 2010. Disponível em: <<https://fas.org/sgp/crs/misc/RL33938.pdf> > Acesso em: 03 de jul. de 2015.

JOHNSON, R. M.; et al. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). **PLoS One.**, v. 8, n. 1, 2013.

JONES, R.; ROTHENBUHLER, W. C. Behaviour of genetics of nest cleaning in honeybees. II. Responses of two inbred lines to various amounts of cyanide-killed brood. **Anim. Behav.**, v. 12, n. 4, p. 584-588, 1964.

JULIANO, J. C. Polinização entomófila da soja. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 4., 1976, Curitiba - PR. **Anais...** Curitiba - PR. 1976.

JUNG, A. H. Horários de forrageamento de *Apis mellifera* L. em soja e riscos de contaminação com pesticidas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 5, n. 4, 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, n. 1, p. 31-40, 2006.

IRONSIDE, J. E. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. **BMC Evolutionary Biology**, Aberystwyth, v. 7, n. 48, p. 1186/1471- 2148, 2007.

KAATZ, H. H. Effects of *Bt* maize pollen on the honeybee. **Jena University, Institute of Nutrition and Environment**. 2005.

KEELING, P. J.; et al. Comparative genomics of microsporidia. **Folia Parasitologica**, Vancouver, v. 52, n. 1/2, p. 8-14, 2005.

KEELING, P. J.; FAST, N. M. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. **Annual Review of Microbiology**, Vancouver, v. 56, p. 93-116, 2002.

KHAN, I.; DIDIER, E. S. Insights into the immune responses to microsporidia. In: World Class Parasites. Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia (Eds. Lindsay D.S. and Weiss L.M.). **Kluwer Acad. Publ.**, Boston, v. 9, p. 135-157, 2004.

KIRCHNER, W. H. Mad-bee-disease? Sublethal effects of imidacloprid (“Gaucho”) on the behavior of honey-bees. **Apidologie**, v. 30, p. 422, 1999.

KIRRANE, M. J.; et al. Asynchronous development of honey bee host and *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) influences reproductive potential of mites. **J. Econ. Entomol.**, v. 104, p. 1146-1152. 2011.

KLEIN, A. et. al. Importance of crop pollinators in changing landscapes for world crops. **Proc. R. Soc. Lond. B**, Gottingen, v. 274, p. 303-313. 2007.

KORPELA, S. *Varroa jacobsoni* Oud in cold climates: population growth, winter mortality and influence on the survival of honey bee colonies. **J. Apic. Res.**, n. 31, p. 157-164, 1992.

- KRAUS, B.; VELTHUIS, H. H. W. High humidity in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brood nest limits reproduction of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. **Naturwissenschaften**, v. 84, p. 217–18, 1997.
- KRUKPE, C. H.; et al. Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. **Plos one**, Ghent, v. 7, n. 1, 2012.
- KRUKPE, C. H.; LONG, E. Y. Intersections between neonicotinoid seed treatments and honey bees. **Curr. Opin. Ins. Sci.**, v.10: p. 8–13, 2015.
- KÜHNHOLZ, S.; SEELEY, T. D. The control of water collection in honey bee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 41, n. 6, p. 407-422, 1997.
- KUIPER, H.A.; et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, Wageningen, v. 27, n. 6, p. 503-528, 2001.
- LABORATORIO DE ARTRÓPODOS. Protocolo de monitoreo para evaluar nosemosis. Mar Del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2006. 5p.
- LAMBIN, M.; et al. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v.48, p.129–134, 2001.
- LAPIDGE, K. L.; OLDROYD, B. P.; SPIVAK, M. Seven suggestive quantitative loci influence hygienic behavior of honey bees. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 565–568, 2002.
- LARSSON, R. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. **Progr. Protistol.**, [S.l], v. 1, p. 325–390, 1986.
- LATSCH, G. Collapsing Colonies: Are GM Crops Killing Bees? International - SPIEGEL ONLINE - News. 2007.
- LE CONTE, Y.; ARNOLD, G. Etude du thermopreferendum de *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie**, v. 19, n. 2, p. 155–64, 1988.

LE CONTE, Y; et al. Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. **Science**, v. 245, p. 638–39, 1989.

LE CONTE, Y.; ARNOLD, G.; DESENFANT, P. Influence of brood temperature and hygrometry variations on the development of the honey bee ectoparasite *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). **Environ. Entomol.** v. 19, p. 1780–85, 1990.

LE CONTE, Y.; et al. Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. **Apidologie**, v. 38, p. 566–572. 2007.

LEGLER, S. Alimentação artificial de abelhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13., 2000, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: UFSC, 2000.

LEGLER, S.; et al. Avaliação do efeito do Terneron e farinha láctea na suplementação energético-protéica de abelhas mellíferas. In: SEMINÁRIO ESTADUAL DE APICULTURA, 5.; ENCONTRO DE APICULTORES DO MERCOSUL, 1., 2000, São Borja, RS. **Anais**. Porto Alegre: CBA, 2003. p.155-160.

LIMA, C. S. S; et al. Does Cry1Ac *Bt*-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee. **J. Appl. Entomol.**, v. 135, p. 415–422, 2011.

LIPINSKI, Z.; et al. Effects of dietary transgenic *Bacillus thuringiensis* maize pollen on hive worker honeybees. **Polish J. of Environ. Stud.**, v. 17, n. 6, p. 957-96, 2008.

LOPES, T. S; et al. Concentração de açúcares no néctar de soja transgênica (*Glycine max* L. Merrill) Var. BR 245 RR e a sua relação com os ponilizadores. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 30, n.2, 2008.

LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Milho *Bt*. **Revista Biotecnologia**, v. 4, p. 46-52, 2002.

LOVEI, G. L., ANDOW, D. A., ARPAIA, S. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. **Environ. Entomol.**, Slagelse, v. 38, n. 2, p. 293–306, 2009.

MAAREC - Mid Atlantic Apiculture e Extension Consortium. "The Colony and Its Organization." 2011. Acesso em 24 dez. 2015. Disponível em: <http://agdev.anr.udel.edu/maarec/>

MACRAE, T. C.; et al. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 577-587, 2005.

MALONE, L., PHAM-DÈLÈGUE, M. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, v. 32, p. n. 4, 287-304, 2001.

MARTÍN, A.; MEANA, A.; HIGES, M. Increase of nosemosis prevalence in Spain. **Acta Parasitol.**, [S.l.], v. 12, p. 50, 2005.

MARTIN, C.; et al. Resistance of the honey bee, *Apis mellifera* to the acarian parasite *Varroa destructor*: behavioural and electroantennographic data. **Physiol. Entomol.**, v. 26, p. 362–370, 2001.

MARTIN, C.; et al. Potential mechanism for detection by *Apis mellifera* of the parasitic mite *Varroa destructor* inside sealed brood cells. **Physiol. Entomol.** v. 27, p. 175–188, 2002.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. A.; et al. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 73, p. 6331-6338, 2007.

MASTERMAN, R.; et al. Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). **J. Comp. Physiol. A.**, v., 187, p. 441–452, 2001.

MATTILA, H.R.; OTIS, G.W. Influence of pollen diet in spring on development of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. **Journal of Economic Entomology**, v.99, n.3, p.604-613, 2006.

MATHESON, A. First documented findings of *Varroa jacobsoni* outside its presumed natural range. **Apiacta**, v. 30, p. 1–8, 1995.

McGREGOR, S. E. **Insect pollination of cultivated crop plants**. Washington, DC: USDA, Agricultural Research Service, 411p. 1976.

MELATHOPOULOS, A.; NELSON, D.; CLARK, K. H. High velocity electron-beam radiation of pollen and comb for the control of *Paenibacillus larvae* subspecies larvae and *Ascophaera apis*. **American Bee Journal**, San Antonio, v. 144, p. 714-720, 2004.

MESSAGE, D. Management and disease problems of africanized bees in Brazil. **Department of Entomology**, Washington State University, Pullman, Washington, v. 6, n. 2, p. 15, 1997.

MESSAGE, D.; GONÇALVES, L. S. Efeito das condições climáticas e da colônia no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). Anais do V Congresso Brasileiro de Apicultura e III Congresso Iberoamericano de Apicultura, Viçosa - MG, p. 140-147, 1984.

MILFONT, M. O. Uso da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) na polinização e aumento de produtividade de grãos em variedade de soja (*Glycine max* (L.) Merril) adaptada às condições climáticas do nordeste brasileiro. 2012. 147 f. Tese (doutorado em Zootecnia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2012.

MISSÃO, M. R. SOJA: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Revista de Ciências Empresariais**, Maringá, v. 3, n.1 - p.7-15, 2006.

MOMOT, J. P., ROTHENBUHLER, W. C. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. **J. Apic. Res.**, v. 10, n. 1, p. 11-21, 1971.

MONSANTO. United States Supreme Court. n. 88-454. 1989.

MORAIS-VÁTIMO, M. M. Aspectos da divisão de trabalho e da captação de luz em linhagens higiênicas e não higiênicas de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. 2008. 123 p. Tese apresentada à

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2008.

MORETI, A. C. C.; et al. Observações sobre a polinização entomófila da cultura de soja (*Glycine max* Merrill). [Boletim de Indústria Animal](#), v. 55, n. 1, 1998.

MORETTO, G.; et al. The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud infestations in Brazil. **Apidologie**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 197-203, 1991.

MORETTO, G.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D. Heritability of Africanized and European honeybee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. **Rev. Bras. Genét.** [S.l.], v. 16, p. 71-77, 1993.

MORETTO, G.; MELLO JR, L. J. Infestation and distribution of the mite *Varroa destructor* in colonies of africanized bees. Departamento de Ciências Naturais, Universidade Regional de Blumenau, 2003.

MORETTO, G.; MELLO JR, L. J. *Varroa jacobsoni* infestation of adult Africanized and Italian bees (*Apis mellifera*) in mixed colonies in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 321-323, 1999.

MORITZ, R. F. A. A re-evaluation of the two locus model for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera* L.). **J. Hered.**, v. 79, p. 257-262, 1988.

MORTON, H. L., MOFFETT, J. O. Ovicidal and larvicidal effects of certain herbicides on honey bees. **Environ. Entomol.**, v. 1, p. 011-614, 1972.

MOURA, L. C. M.; MARIN, J. B. Rede empresarial: a estratégia da produção de sementes de soja transgênica em Goiás. **Interações**, Campo Grande, v. 14, n. 1, p. 21-36, 2013.

MULLIN, C. A.; et al. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS ONE**, v. 5, 2010.

MUSSEN, E. C. Diagnosing and treating *Nosema* disease. **Extension Apiculturist**, Davis, p. 4, 2011. Disponível em:

<http://entomology.ucdavis.edu/files/147621.pdf> Acesso em: 03 de mai. de 2015.

NAZZI, F.; MILANI, N.; VEDOVA, D. G. A semiochemical from larval food influences the entrance of *Varroa destructor* into brood cells. **Apidologie**, v. 35, p. 403–10, 2004.

NAZZI, F.; et al. Octanoic acid confers to royal jelly *Varroa*-repellent properties. **Naturwissenschaften**, v. 6, p. 309–14, 2009.

NAZZI, F. LE CONTE, Y. Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. **Annu Rev Entomol.**, v. 61, p. 417-32, 2016.

NEIRA, M. ¿Qué hacer ante la varroasis? **Chile Agrícola**, [S.l.], v. 16, n. 177, p. 133–136, 1992.

NEUKIRCH, A. Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption. **J. Comp. Physiol.**, v. 146, n. 1, p. 35–40, 1982.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, Grahamstown, v. 49, n. 1, p. 1–6, 2010.

NEWTON, D. C.; OSTASIEWSKI, N. J. A simplified bioassay for behavioural resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal**, [S.l.], v. 126, n. 4, p.278–281, 1986.

NICOLSON, S. W.; NEPI, M. Dilute nectar in dry atmospheres: Nectar secretion patterns in *Aloe castanea* (Asphodelaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 166, p. 227-233, 2005.

NOGUEIRA-COUTO, R. H.; PEREIRA, J. M. S. Polinização entomófila em *Glycine wightii* (soja perene). In: Reunião da SBPC, 35, 1983. Belém - PA. **Anais...** Belém - PA. 1983.

NOGUEIRA-COUTO, R. H.; PEREIRA, J. M. S.; DE JONG, D. Pollination of *Glycine wightii*, a perennial soybean, by Africanized honey bees. **Journal of Apicultural Research**, v. 3, n. 4, 289-291, 1998.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.; PERARO, D.T. Polinização entomófila em abóbora menina brasileira precoce (*Cucurbita mixta* Pang.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13., Florianópolis, 2000. **Anais...** Florianópolis, 2000.

NOWOGRODZKI, R. Division of labour in the honey bee colony. **Bee World**, v. 65, p.109-116, 1984.

NUNES, D.H., **Efeitos do algodoeiro geneticamente modificado (Bollgard®) em organismos não-alvo**. 2010. 211f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2010.

OECD. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Protein. **OECD paper**: Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, Paris, v. 7, n. 11, p. 35, 2007.

OIE – World organisation for animal health. Nosemosis of honey bees. Terrestrial manual, 2008. 410-414 p. Disponível em: http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf Acesso em: 15 de junho de 2016.

OIE – World organisation for animal health. Nosemosis for honey bee. Terrestrial manual, 2013. 6 p. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf> Acesso em: 15 de junho de 2016.

OLDROYD, B. P. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of Western honeybees. **Trends Ecol. Evol.** v. 14, p. 312–15, 1999.

OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **Plos Biology**, New South Wales, v. 5, n. 6, p. 1195–1199, 2007.

ORANTES-BERMEJO, F. J.; et al. Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. **J. Apicult. Res.**, v. 48, n. 1, p. 243–50, 2010.

ORENSTEIN, J. M. Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of Parasitology**, Washington, v. 77, n. 6, p. 843-864, 1991.

ORUC, H. H.; et al. Determination of acute oral toxicity of flumethrin in honey bees. **J. Econ. Entomol.**, v. 105, n. 6, p. 1890-1894, 2012.

OXLEY, P. R.; SPIVAK, M.; OLDROYD, B. P. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). **Mol Ecol.** v. 19: p. 1452–1461, 2010.

PALÁCIO, M. A.; et al. Evaluation of the time of uncapping and removing dead brood from cells by hygienic and non-hygienic honey bees. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 105-114. 2005.

PALACIOS, P.E. Servicios de polinización com abejas em frutales: Parámetros técnicos y de calidad. **Revista Actualidad Apícola**, Valdivia, v.3, 2011.

PAPAEFTHIMIOU, C., et al. The action of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the isolated heart of insect and amphibia. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 11, p. 127–140, 2002.

PARK, O. W.; PELLET, F.; PADDOCK, F. B. Disease resistance and American fowlbrood. **American Bee Journal**, [S.l.], v. 77, n. 1, p 20-25-34. 1937.

PARROTT, W. A.; et al. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insecticidal gene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 30, p. 144-149, 1994.

PAULINO, F. D. G. Origem e biologia das abelhas. **SEBRAE**, 2013. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/apicultura-no-brasil/historia/origem-e-biologia-das-abelhas-689/BIA_689>. Acesso em: 08 de jun. 2015.

PAXTON, R. J., et al. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. **Apidologie**, v. 38, p. 558–565, 2007.

PELDOZA, J. Varroasis de las abejas. **El Campesino**, [S,l], v. 8, n. 123, p. 48-58, 1992.

PENG, Y. S. The resistance mechanism of the Asian honeybee *Apis cerana* Fabr. to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 19, p. 54-60, 1987.

PEREIRA, A. P. Monitoramento das atividades individuais de abelhas africanizadas relacionadas ao comportamento higiênico. 2008, 132 p. Tese (Doutorado em Entomologia), Universidade de São Paulo (USP).

PEREIRA, F. M.; et al. **Produção de mel**. EMBRAPA, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 07 de jun. 2015.

PEREIRA, F.M.; et al. Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.1-7, 2006.

PERNAL, S.F. **The biology and control of Nosema**. Bee Masters 2012 Advanced Beekeeping Course, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, p. 20-24, 2012.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environ Pollut.**, v. 156, p. 61–66, 2008.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Fortaleza, v. 14, n. 1, p. 266-281, 2010.

PIRES, S. M. A.; et al. Estudo de alguns métodos usados para avaliar o comportamento higiênico de ecotipos locais de abelhas Portuguesas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 45-49, 2006.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Screening of *Bacillus thuringiensis* isolates pathogenic to *Spodoptera frugiperda* (JE

Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). Arquivos do Instituto Biológico, v. 70, n. 1, p. 69-72, 2003.

POTTS, S. G.; et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends Ecol. Evol.** v. 25, p. 345-353, 2010.

PRIEST, F. G. Biological Control of Mosquitoes and other Biting Flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Edinburgh, v.72, n. 5, p.357-369. 1992.

RAMIREZ-ROMERO, R.; CHAUFaux, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. **Apidologie**, v. 36, p. 601–611, 2005.

RAMIREZ-ROMERO, R.; et al. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 70, p. 327–333, 2008.

RAMOS, J. M.; CARVALHO, N. C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista científica eletrônica de engenharia florestal**, Garça, v. 6, n. 10, p. 21, 2007.

RATNIEKS, F. L. W; CARRECK, N. L. Clarity on Honey Bee Collapse? **Science**, n. 327, p. 152-153, 2010.

READICKER-HENDERSON, E. **A Short History of the Honey Bee: Humans, Flowers, and Bees in the Eternal Chase for Honey**. Portland: Timber, 2009. 164 p.

RIOTTE, L. **Raising Animals by the Moon: Practical Advice on Breeding, Birthing, Weaning, and Raising Animals in Harmony with Nature**. Storey Publishing, LLC, 2012. 193 p.

RITTER, W. *Varroa* disease of the honeybee *Apis mellifera*. **Bee Wld**, v. 62, p. 141-153, 1981.

ROBACKER, D. C.; et al. Effects of climatic and edaphic factors on soybean flowers and on the subsequent attractiveness of the plants to honey bees. **Field Crops Research**, v. 6, n. 4, p. 267-278, 1983.

ROBAUX, P. *Varroa* et *Varroatose*. Opida, France, 1986. p. 238.

ROMEIS, J.; et al. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to non-target arthropods. **Nat. Biotechnol.**, [S.l.] v. 26, p. 203–208. 2008.

ROMEIS, J.; et al. Recommendations for the enhancement of the expression of *Bt* cryIah gene in transgenic maize (*Zea mays* L.). **Chin. Sci. Bull.** [S.l.], v. 53, p. 3185–3190. 2011.

RORTAIS, A. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: Estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 71-83, 2005.

ROSENKRANZ, P.; AUMEIER, P.; ZIEGELMANN, B. Biology and control of *Varroa destructor*. **J. Invertebr. Pathol.** v. 103, p. 96–119, 2010.

ROTHENBUHLER, W. Behavior genetics of nest cleaning behavior in honeybees I. Response of four inbred lines to disease killed brood. **Anim. Behav.**, v. 12, p. 578–583, 1964.

ROUNDUP READY. Limoreio: Monsanto do Brasil Ltda, 2015. Bula do produto.

RUBIS, D. D. Breeding insect pollinated crops. **Arkansas Agricultural Extension Service**, v. 127, p. 19-24, 1970.

RUTTNER, F.; MARX, H.; MARX, G. Beobachtungen über eine mögliche Anpassung von *Varroa jacobsoni* an *Apis mellifera* L. in Uruguay. **Apidologie**, v. 15, p. 43-62, 1984.

RUTTNER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybees**. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1988. 284 p.

SABUGOSA-MADEIRA, J. B.; et al. *Bt* transgenic maize pollen and the silent poisoning of the hive. **Journal Apiculture Research.**, Cardiff, v. 46, p. 57-58, 2007.

SABUGOSA-MADEIRA, J. B.; ABREU, I. O pólen de milho geneticamente modificado. Possíveis implicações no desequilíbrio

ecológico das colmeias. **Revista da Real Academia Galega de Ciências**, Porto, v. 28, p. 71-85, 2009.

SAMMATARO, GERSON, NEEDHAM, G. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 45, p. 519–48, 2000.

SAMSON-ROBERT, O.; et al. Neonicotinoid-contaminated puddles of water represent a risk of intoxication for honey bees. **PLoS One**, v. 9, p. 12, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees – A risk assessment. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 16, 2014.

SANCHIS, J. et al. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 7, 2012.

SAN MARTÍN, G. Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/sanmartin> Acesso em: 23 de outubro de 2016.

SARLO, E, G. **Aportes al conocimiento de la naturaleza e control de la Microsporidiosis causada por *Nosema ceranae* (Microsporidea, Nosematidae) em las colónias de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) asentadas em la región sudeste de Buenos Aires, Argentina.** 2010. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas y Naturales) – Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires, 2010.

SCHACKER, M. **A Spring without Bees: How Colony Collapse Disorder Has Endangered Our Food Supply.** Guilford: The Lyons Press, 2008. 304 p.

SHAFIR, S. Risk-sensitive foraging: The effect of relative variability. **Oikos**, v. 88, p. 663–669, 2000.

SCHIMID, M. R.; et al. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 439–444, 2008.

SCHLUCK, A. “La *Varroa*: Investigación y progreso agropecuario”. **La Platina**, Chile, v. 72, p. 34- 38, 1992.

SCHMARANZER, S. Thermoregulation of water collecting honey bees (*Apis mellifera*). **J. Ins. Physiol.**, v. 46, n. 8, p. 1187–94, 2000.

SCHNEPF, R. D.; DOHLMAN, E.; BOLLING, C. Agriculture in Brazil and Argentina: Developments and Prospects for Major Field Crops. Market and Trade Economics Division, Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agriculture and Trade Report. 2001. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/publications/wrs013/> Acesso em: 06/01/2016.

SCHUITEMA, A. R. J. et al. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of microsporidiosis. **AIDS**, [S.l.], v. 7, n. 3, p. S62-S63, 1993.

SCHWARTZ, D. A. et al. Microsporidiosis in HIV positive patients: current methods for diagnosis using biopsy, cytologic, ultrastructural, immunological, and tissue culture techniques. **Folia Parasitologica**, Atlanta, v. 41, n. 2, p. 101-109, 1994.

SEBRAE. Agronegócio - **O Mercado da própolis**. 2014. Disponível em:

<http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/sebrae%202014/2013_09_20_B_O_Agosto_Agronegocio_Propolis2.pdf> Acesso em: 10 jun. 2015.

SEELEY, T. E. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honey bee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 11, p. 287-293, 1982.

SEZERINO, A. A. **A polinização da pereira europeia (*Pyrus communis* L. cv. Rocha) no Sul do Brasil**. 2014. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2014.

SHADDUCK, J. A.; GREELEY, E. Microsporidia and human infections. **Clinical Microbiology Reviews**, College Station, v. 2, n. 2, p. 158-165, 1989.

SHIMANUKI, H.; HERBERT, E. W. Alimento artificial con proteínas para las colonias de abejas. In: XXX CONGRESSO INTERNACIONAL DE APICULTURA, 1985. Nagoya, Japão. **Anais...** Nagoya, 1985. 320 p., p.131-135.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical assistance. In: 7th World Congress on Computers in Agriculture, 2009, Reno. Proceedings of the 7th World Congress on Computers in Agriculture. St. Joseph: ASABE, 2009. v. CD-Rom. p.1-5

SILVA, G. V. **Efeito de plantas *Bt* de soja e milho sobre pragas não-alvo e seus inimigos naturais**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

SINA, M.; et al. The New Higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Guelph, v. 52, n. 5, p. 399–451, 2005.

SPARLING, D. W.; FELLERS, G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylei*. **Environmental Pollution**, v. 147, n. 3, p. 535–539, 2007.

SPIVAK, M. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. **Apidologie**, v. 27, p. 245-260, 1996.

SPIVAK, M.; DOWNEY, D. L. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Apidae: Hymenoptera). **J. econ. Ent.** v. 91, n. 1, p. 64-70, 1998.

SPIVAK, M.; GILLIAM, M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and *Varroa*. Part II: Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. **Bee World**, Bucks, v. 79, n. 4, p. 169-186, 1998.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies, *Apis mellifera*, bred for hygienic behavior. **Apidologie**, v. 32, p. 555–565, 2001a.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. *Varroa jacobsoni* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. **J. Econ Entomol.**, v. 94, p. 326– 331, 2001b.

SPIVAK, M.; et al. Hygienic Behavior in the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) and the Modulatory Role of Octopamine. **J Neurobiol.**, v. 55, p. 341-354, 2003.

SPIVAK, M. Impactos do desaparecimento das abelhas no cenário internacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 17 E DE MELIPONICULTURA, 3, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2008.

SPOTTER, A.; et al. Development of a 44 K SNP assay focussing on the analysis of a *Varroa*-specific defence behaviour in honey bees (*Apis mellifera carnica*). **Mol Ecol Resour.**, v. 12, n. 2, p. 323–32, 2012.

SOMERVILLE, D. **Honey bee nutrition and supplementary feeding**. South Wales: Agriculture, 2000. p.1-8. Disponível em: <http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0008/117494/honey-bee-nutrition-supplementary-feeding.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2015.

SOMERVILLE, D.; HORNITZKY, M. *Nosema disease*. **NSW DPI: Primefacts 699**, New South Wales, p. 3, 2007. Disponível em: http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0003/177519/nosema-disease.pdf Acesso em: 15 de set. de 2015.

STANDIFER, L.N.; et al. **Supplemental feeding of honey bee colonies**. Washington, DC: United States Department of Agriculture, 1977. 8p. (Agriculture information bulletin, 413).

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 20, n. 11, p. 2482-6, 2001.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, [S.1], v. 316, n. 5827, p. 970–972, 2007.

TAPPARO, A. et al. Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. **Environ Sci Technol**. v. 46, n. 5, p. 2592-9, 2012.

THAKUR, R .K.; BIENEFELD, K.; KELLER, R. *Varroa* defense behavior in *Apis mellifera carnica*. **Am. Bee J**. v. 137, p. 143-148, 1997.

THEN, C. Risk assessment of toxins derived from *Bacillus thuringiensis* synergism, efficacy, and selectivity. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, Munich, v. 17, n. 3, p. 791–797, 2010.

THOMPSON, V. C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. III. Effect of age of bees of a resismoritztant line on their response to disease-killed brood. **J. Apic Res.**, v. 3, p. 25– 30, 1964.

THOMPSON, H. M. Behavioural effects pesticides in bees: their potencial for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 12, n. 1, p. 317-330, 2003.

THOMPSON, T. S.; Degradation of incurred tylosin to desmycosin: implications for residue analysis of honey. **Anal. Chim. Acta**, v. 586, p. 304–311, 2007.

TITERA, D.; KOKKORIS, J. Der Effekt von Mikroinjektionen in die Brutzellen auf das Entdeckelungs und Reinigungsverhalten der Bienen. **Apidologie**, v. 25, n. 5, p. 503-504, 1994.

TORRES, R. N. S.; BARRETO, M. R. Incidência de *Varroa destructor* (Anderson & Trueman) em Criação de Abelhas com Ferrão na Região de Sinop, Mato Grosso, Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 6, n. 1, p. 30-33, 2013.

TREVISAN, A.; et al. Análise do efeito do pólen do milho transgênico resistente a insetos sobre o desenvolvimento de *Galleria mellonella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae) e possíveis consequências ecológicas. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2013.

TROUILLER, J.; Temporal pheromonal and kairomonal secretion in the brood of honeybees. **Naturwissenschaften**, v. 78, p. 368–70, 1991.

TSURUDA J. M.; et al. High-Resolution Linkage Analyses to Identify Genes That Influence *Varroa* Sensitive Hygiene Behavior in Honey Bees. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. p. 8, 2012.

USDA - United States Department of Agriculture. World agricultural supply and demand estimates. Agricultural outlook forum, v. 93, p. 41. 2017. Disponível em: <https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>> Acesso em: 13 de janeiro de 2017.

VANDENBERG, J. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 83, p. 755-759, 1990.

VANDENBERG, J.; SHIMANUKI, H. Two commercial preparations of the β exotoxin of *Bacillus thuringiensis* influence the mortality of caged adult honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environ. Entomol.**, v. 15, p. 166-169, 1986.

VANENGELSDORP, D.; et al. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007. **American Bee Journal**, [S.l.], v. 147, n.7, p. 599–603, 2007.

VARASSIN, I. G.; TRIGO, J. R.; SAZIMA, M. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 136, p. 139-152, 2001.

VETTER, R. S; VISSCHER, P. K. Influence of age on antennal response of male honey bees, *Apis mellifera*, to queen mandibular pheromone and alarm pheromone componente. **Journal of Chemical Ecology**, Riverside, v. 23, n. 7, p. 1997.

VOSSCHER, P. K.; DUKAR, R.; Survivorship of foraging honey bees. **Insect. Soc.**, v. 44, p. 1–5, 1997.

VON FRISCH, K. The dance language and orientation of bees. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1967.

WHALON, M. E., WINGERD, B. A. *Bt*: Mode of Action and Use. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, East Lansing, v. 54, n. 4, p. 200-211. 2003.

WHITAKER, J.; SZALANSKI, A. L.; KENCE, M. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. **Apidologie**, Fayetteville, v. 42, n. 2, p. 174-180, 2011.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regul Toxicol Pharmacol.**, v. 31, p. 117-65, 2000.

WILSON-RICH, N.; et al. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. **Annual Review of Entomology**, [S.1], v. 54, p. 405-423, 2009.

WILSON-RICH, N.; et al. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. **Annu Ver Entomol.**, v. 54, n. 1, p. 405-23, 2008.

WILSON-RICH N.; DRES, S. T.; STARKS, P. T. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.*, v. 54, p. 1392-9, 2008.

WINSTON, M. L. **The biology of the honey bee**. Cambridge: Harvard University Press, 1987. 281p.

WITTNER, M. (Ed.); WEISS, L. M. **The Microsporidia and Microsporidiosis**. Washington: American Society for Microbiology, 1999. 572 p.

WU, J. Y.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Sub-Lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PLoS One**, 2011.

WAHL, O.; ULM, K. Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. [Oecologia](#), v. 59, n. 1, p. 106-28, 1983.t

ZAKARIA, M. E. Factors affecting on the food metabolism in some honey bee races. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 4, p. 311-316, 2007.

