

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Yasmin Gomes de Sousa

**Comportamento higiênico e sanidade da abelha sem ferrão *Scaptotrigona* aff.
postica (Apidae: Meliponini)**

Diamantina

2023

Yasmin Gomes de Sousa

Comportamento higiênico e sanidade da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. postica* (Apidae: Meliponini)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal do Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito Parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Anete Pedro Lourenço

Co-orientadora: Dra. Kamila Leão

Diamantina

2023

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

G633c Gomes de Sousa, Yasmin
2024 Comportamento higiênico e sanidade da abelha sem ferrão
Scaptotrigona aff. postica (Apidae: Meliponini) [manuscrito]
/ Yasmin Gomes de Sousa. -- Diamantina, 2024.
79 p.

Orientador: Prof. Anete Pedro Lourenço.
Coorientador: Prof. Kamila Leão Leão.

Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) -- Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal, Diamantina, 2023.

1. Meliponíneos. 2. Comportamento Higiênico. 3. Imunidade
Social. I. Lourenço, Anete Pedro. II. Leão, Kamila Leão. III.
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins
Cruz/CRB6-2886

e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM

**Comportamento higiênico e sanidade da abelha sem ferrão
Scaptotrigona aff. postica (Apidae: Meliponini)**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRA EM BIOLOGIA ANIMAL

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Anete Pedro
Lourenço

Data da aprovação : 30/10/2023

Prof.Dr.^a ANETE PEDRO LOURENÇO - UFVJM



Documento assinado digitalmente

ANETE PEDRO LOURENÇO

Data: 30/01/2024 18:15:51-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. DEJAIR MESSAGE - IFSULDEMINAS



Documento assinado digitalmente

ERICA WEINSTEIN TEIXEIRA

Data: 30/01/2024 15:32:46-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.^a ÉRICA WEINSTEIN TEIXEIRA - INSTITUTO BIOLÓGICO/APTA-SAA,SP



Documento assinado digitalmente

DEJAIR MESSAGE

Data: 03/11/2023 18:48:07-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico a minha avó **Joana Souza**, *in memoriam*, por mesmo em outro plano ser fonte inesgotável de força e amor ...

Dedico às minhas amigas **Carolina Ferreira** e **Jamille Veiga** sem vocês esse trabalho não seria possível ...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao grande **Pai celestial** e a **Ns. de Nazaré** por sempre abençoarem e iluminarem meus passos e caminhos. Gratidão por tudo à espiritualidade.

O presente trabalho foi desenvolvido com apoio de bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Com apoio financeiro da CAPES e FAPEMIG. As coletas foram realizadas sob licença SISGEN no. A9C5291. Além disso, agradecemos o apoio e colaboração da Embrapa Amazônia oriental em nome do Dr. Daniel Santiago por disponibilizar as colônias dos projetos 20.21.10.014.00.00 e no. 16.17.01.004.00.00, área de estudo e uma parte da estrutura e logística para a realização deste trabalho.

Agradeço em especial a minha orientadora **Prof. Dra. Anete Pedro Lourenço**, por toda a paciência em ensinar e orientar com muita dedicação durante todo o meu percurso na pós-graduação. Você me ensinou muito, tanto no âmbito profissional refletindo no pessoal e sempre serei grata por tudo. Entendo as dificuldades durante todo o processo e agradeço por acolhê-las. Sem você esse estudo não teria sido possível.

Agradeço a toda minha família, sem eles nada seria possível. Em especial aos meus pais **Salim Sousa** e **Márcia Gomes**, por sempre me fornecerem o melhor em todos os aspectos da minha vida. A minha avó **Joana Souza**, *in memoriam*, por todo amor proporcionado em minha criação. Aos meus tios que desde sempre são uma grande rede de apoio e extensão dos meus pais **Sandra Corrêa**, **Miriam Gomes**, **João Corrêa**, **Salomão Corrêa** e **Miguel Corrêa**.

Agradeço também a minha co-orientadora **Dra. Kamila leão** por todo o apoio durante o processo da pós-graduação, principalmente, na articulação e apoio logístico para realização dos experimentos, sem você não seria possível. Obrigada !

Em especial agradeço a todos os integrantes e ex- integrantes do **LEIA** por me acolherem tão bem no laboratório e em diamantina. Criei laços que pretendo levar adiante. Assim, agradeço aos abelhudos mineiros **Renato Viana**, **Lucas Fernandes**, **Gizele Almeida**, **Matheus Gabriel**. Agradeço em especial a **Nathália prestes** e **Fabiana Reis** por todo acolhimento e auxílio em laboratório. Agradeço também ao técnico de laboratório **Daniel** pelo auxílio.

Agradeço em especial a **Raphaella Silveira** pela realização e execução das técnicas moleculares para identificação dos agentes patogênicos, sem você esse trabalho não seria possível.

Agradeço também ao **PPGBA** e a todos os professores que enriqueceram minha formação acadêmica e participaram da minha jornada na pós-graduação.

Agradeço às minhas amigas **Ana Carolina Ferreira** e **Jamille Veiga** por absolutamente tudo, vocês são como irmãs para mim e esse trabalho definitivamente não seria o mesmo sem vocês. Obrigada por todas as noites em claro observando o comportamento das abelhas, até mesmo quando parecia que não tínhamos mais forças. Por todas as vezes que eu pensei que não conseguiria mais nem abrir uma caixa de abelha e vocês falavam “ a gente já fez isso 1000 vezes vamos fazer 1001”. Sou muito grata por ter vocês. A **Carol** que esteve comigo em todas as coletas de campo, desde do teste piloto no início, perfurando e pintando cada célula, carregando as caixas debaixo de chuva no fim do experimento, secando as minhas lágrimas quando eu achava que não ia conseguir, obrigada por tanto amiga. E sobre a **Jamille** nem consigo falar direito né ? Tudo o que representas para mim, todas as ideias e conversas científicas compartilhadas sobre o “maravilhoso mundo das abelhas sem ferrão”, só posso agradecer amiga ao universo pelo nosso encontro e por ele ser muito além do trabalho.

Esse trabalho foi feito por muitas mãos que me auxiliaram nas coletas de campo em várias escalas. Assim, agradeço os técnicos da Embrapa **Marta** e **Anderson** por se disponibilizarem a ajudar e a permanecer as madrugadas no laboratório observando as abelhas. Em especial a Martinha, obrigada por tudo e por tanto, criamos uma amizade tão bonita! Agradeço aos meus amigos abelhudos **Lucas Bernardes**, **João Matos**, **Elder Santana** por fazerem parte da equipe que estavam na linha de frente me auxiliando para realização deste trabalho. Agradeço aos abelhudos **Bárbara Lopes**, **Antônio R** e aos estagiários da Embrapa **Jéssica**, **Pedro** e **William** pelo auxílio em campo. Agradeço ao **Fabrcio Farias** pela elaboração do mapa de coleta de localização das colônias com doença.

Agradeço aos meus amigos da vida **André Gomes**, **Vitor Reis**, **Bianca Carneiro** e **Camila Ribeiro** por tudo!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	6
1.1 - Imunidade social no grupo dos insetos	6
1.2- Abelhas eussociais	7
1.3 – Comportamento higiênico e sanidade em abelhas melíferas.....	8
1.4- Comportamento higiênico e sanidade nas abelhas sem ferrão.....	10
1.5- Espécie–alvo: Abelha canudo	12
2. Objetivos e organização geral.....	12
REFERÊNCIAS	14
(Capítulo 1) Caracterização do comportamento higiênico em abelhas sem ferrão	
<i>Scaptotrigona aff. postica</i>	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1- Colônias de <i>Scaptotrigona aff. postica</i>	26
2.2- Desenho experimental	28
2.3-Análise estatística.....	30
3. RESULTADOS	30
4. DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS	44
(Capítulo 2) Detecção molecular de patógenos associados a abelhas <i>Apis</i> em abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona aff. postica</i> em açazais no Pará-Brasil	
RESUMO	51
ABSTRACT	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1- Colônias de <i>Scaptotrigona aff. postica</i>	55

2.2- Extração de DNA e amplificação por PCR de DNA das bactérias <i>Melissococcus plutonius</i> e <i>Paenibacillus larvae</i>	58
2.3- Extração de RNA, síntese de cDNA e detecção de vírus	59
2.4- Análise da alimentação polínica	59
3. RESULTADOS	61
3.1- Detecção de <i>Melissococcus plutonius</i> e <i>Paenibacillus larvae</i> por análise molecular	61
3.2- Detecção de vírus por análise molecular	62
3.3- Espectro polínico dos potes de pólen de colônias da abelha sem ferrão <i>S. aff. postica</i> em açazais da Amazônia paraense	63
4. DISCUSSÃO	65
REFERÊNCIAS	71
MATERIAL SUPLEMENTAR	77

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 - Imunidade social no grupo dos insetos

Dentro do universo dos insetos encontramos espécies que vivem com o maior grau de organização social (Wilson e Holldobler 2005). Os insetos eussociais formam sociedades permanentes com cooperação para a manutenção do ninho e divisão de trabalho dos indivíduos em castas reprodutivas ou não (Wilson e Holldobler 2005; Meunir 2015). Dentro de seus ninhos encontramos um cenário de alta integração com sobreposição de gerações entre membros da colônia, cuidado coletivo com a prole e a divisão de tarefas bem estabelecida (Wilson e Holldobler 2005; Meunir 2015). Pela cooperação os insetos sociais são conhecidos por “superorganismos”, já que, diversos indivíduos exercem funções diferentes em vários níveis dentro dos ninhos (Seeley 1995; Cremer et al. 2007). A organização e o modo de vida em sociedade oferece custos à estabilidade do ninho na natureza por aumentar os riscos às infecções. As colônias se tornam atrativas e suscetíveis a patógenos uma vez que apresentam alta densidade de indivíduos geneticamente similares que realizam frequentes contatos e interações (Cremer et al. 2007, 2019). Dessa forma, insetos sociais como abelhas, formigas, vespas e cupins desenvolveram uma série de estratégias para limitar a propagação de patógenos em suas populações, passando desde o sistema imunológico individual até mecanismos de defesas coletivos que compreendem a imunidade social (Meunir 2015; Cremer et al. 2007, 2019).

Em abelhas várias são as estratégias de defesas coletivas empregadas no estabelecimento da infecção dentro do ninho (Meunir 2015). Assim, para limitar a presença de patógenos do meio ambiente, as operárias guardas controlam o fluxo na colônia impedindo a entrada de forrageiras recém infectadas dentro do ambiente interno do ninho (Waddington e Rothenbuhler 1976). Quando o patógeno consegue adentrar na colônia, a estratégia passa a ser a limitação deste, e para isso operárias utilizam materiais com caráter antimicrobiano, como resina vegetal, na incorporação das estruturas do ninho (Simone-Finstrom e Spivak 2010). Além disso, expressam o comportamento higiênico que consiste na detecção e remoção de indivíduos imaturos infectados na área de cria sendo eliminados para fora da colônia (Park et al. 1937; Julian e Cahan 1999). As abelhas também buscam limitar a transmissão da infecção entre os membros da sociedade, e dentre os comportamentos está o *allogrooming*, que consiste na retirada mecânica de parasitas externos no corpo do hospedeiro (Van Baalen e Beekman 2006; Cremer et al.

2019). Além disso, podem realizar uma febre social que se caracteriza pela vibração dos músculos de voo, aumentando adaptativamente de forma temporária a temperatura dentro do ninho a um nível prejudicial aos patógenos sensíveis ao calor (Starks 2000; Cremer et al. 2019).

1.2- Abelhas eussociais

O grupo das abelhas apresenta uma grande diversidade de espécies, comportamentos e estilo de vida (Michener 1974). O maior número de espécies que compõem esse grupo tem como comportamento um estilo de vida solitário, não formando colônias (Michener 1974). Em contrapartida, encontramos espécies que vivem em sociedade formando colônias com indivíduos que cooperam para a manutenção e o estabelecimento do ninho na natureza (Michener 1974).

O mais alto grau de socialidade em abelhas, caracterizado por sobreposições de gerações, divisão de trabalho e diferenciação em castas, é encontrado nas tribos Apini e Meliponini (Michener 1974). Diferentemente do grupo Apini, que compreende cerca de 11 espécies pertencentes ao único gênero *Apis*, o grupo Meliponini compreende mais de 550 espécies pertencentes a cerca de 58 gêneros, tornando as abelhas sem ferrão o grupo mais amplo e diversificado entre as abelhas corbiculadas (Pedro 2014; Michener 2007; Grüter 2020). Os meliponíneos vivem em sociedade formando colônias em cavidades pré-existentes como ocos das árvores e cavidades do solo (Michener 1974). Dentro de suas colônias se encontram três tipos de indivíduos: a rainha, as operárias e os zangões. O papel da rainha é reprodutivo, realizando a oviposição para dar origem às gerações futuras dentro dos ninhos (Sakagami 1982). As operárias compõem a maior parte dos indivíduos da colônia e são responsáveis por todas as tarefas não reprodutivas como: coleta de recurso no meio ambiente, defesa do ninho, auxiliar a rainha na oviposição, manutenção das estruturas do ninho, e outras diversas funções que vão ser realizadas de acordo com a sua idade (Michener 2007). Os zangões vivem em agregados de machos na natureza e exercem função reprodutiva na colônia ao fecundar a rainha durante o vôo nupcial (Veiga et al. 2018). A criação e manejo das abelhas sem ferrão é denominada meliponicultura. Por desempenharem um importante papel na polinização de plantas nativas e culturas agrícolas, essas abelhas são de importância vital para a manutenção dos ecossistemas e possuem um alto valor socioeconômico na geração de renda para os meliponicultores e suas famílias (Slaa et al. 2006; Gianni et al. 2015; Jaffé et al. 2015).

Suas populações vêm sofrendo pressões com o uso indiscriminado de insumos agrícolas, o avanço do desmatamento em áreas naturais, a perda dos habitats e a perda de colônias por infecção de doenças ou patógenos (Nogueira-Neto 1997; Grüter 2020; Teixeira et al. 2020; Toledo-Hernandez et al. 2022).

1.3 – Comportamento higiênico e saúde em abelhas melíferas

Com o aparecimento de doenças nos favos de cria em *A. mellifera* surgiu a necessidade de observar os mecanismos que as abelhas possuíam para conter infecções dentro dos enxames (Park et al. 1937). O comportamento higiênico (CH) é um mecanismo de defesa coletivo dirigido para patógenos causadores de doenças na cria e ao ácaro *Varroa destructor* (Park et al. 1937). Esse comportamento ajuda a manter a saúde nas colônias de insetos sociais altamente propícias à infecção, limitando a transmissão dos patógenos e o crescimento dos parasitas dentro das colônias (Cremer e Sixt 2009).

Pesquisas iniciais acerca do CH foram desenvolvidas em *A. mellifera*, analisando a resistência de colônias à loque americana, causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, e à cria giz que tem como agente patogênico o fungo *Ascosphaera apis* (Spivak e Gilliam 1998). No CH as operárias responsáveis pelo comportamento detectam e removem indivíduos mortos ou infectados de dentro da célula de cria, eliminando para fora da colônia (Rothenbuhler 1964 a,b). Em *A. mellifera*, esse comportamento tem caráter hereditário sendo expresso ao comando de múltiplos genes, se caracterizando colônias higiênicas ou não (Rothenbuhler 1964 a,b; Facchini et al. 2019; Teixeira et al. 2021). Para que uma colônia seja considerada higiênica se realiza um teste com base no percentual de remoção de indivíduos mortos. Assim, colônias que removem acima de 95% da cria morta em até 48 horas são consideradas higiênicas, podendo esse percentual ser modificado de acordo com grau de exigência do programa de seleção (Spivak e Downey 1998). A porcentagem de remoção da cria morta em colônias higiênicas tem sido usada como atributo para melhoramento genético em *A. mellifera* (Maucourt et al. 2020). O CH é um parâmetro de seleção para colônias sadias com uma probabilidade de apresentar uma maior longevidade, refletindo na densidade populacional dos enxames, o que, conseqüentemente, resulta em uma maior produção de mel (Craig, Cochran e Rothenbuhler 1960).

A melhor forma para conhecer a eficiência de resposta das colônias é com a remoção de cria doente submetida a uma dose controlada de um patógeno conhecido. No entanto, essa opção representa um alto risco de contaminação nas colônias, sendo desenvolvidos outros ensaios que simulem a morte da cria sem o uso de patógenos (Spivak e Danka 2020). Os métodos mais utilizados para avaliar a expressão do CH pelas operárias são por congelamento da cria (Spivak e Downey 1998; Spivak e Reuter 1998) e por perfuração de cria (Newton e Ostasiewski 1986). O método do congelamento de cria consiste na utilização de uma solução de nitrogênio líquido para congelar uma área pré-determinada ocasionando a morte da cria (Spivak e Downey 1998). O método de perfuração de cria é muito utilizado em manejo de seleção nos apiários e consiste em sacrificar a cria com auxílio de alfinete entomológico (Newton e Ostasiewski 1986). Nos dois métodos é possível verificar o percentual de remoção acumulado de crias constatando o número de células limpas pelas as operárias ao final das faixas de horário de observação, geralmente após 24 e 48 horas.

O CH está associado a resistência das colônias aos agentes patogênicos que acometem colméias em apiários, desde o ácaro parasita, *V. destructor*, até as doenças bacterianas na cria como EFB (*European Foulbrood*) e AFB (*American Foulbrood*) que representam as maiores ameaças parasitárias na apicultura mundial (Forsgren 2010; Traynor et al. 2020). Nesse cenário, O CH e o parasita *V. destructor* estão tão relacionados que foi desenvolvido o VHS (*Varroa sensitive hygiene*), uma forma específica do comportamento higiênico para avaliação de remoção em crias parasitadas com o ácaro. Nesse caso, populações com altos níveis de VHS não necessitam de tratamentos químicos para diminuir a carga parasitária dentro das colmeias, diminuindo os resíduos de acaricida no mel comercializado (Locke et al. 2016; Traynor et al. 2020). O maior impacto é causado pelo fato de que *V. destructor* é uma forma de vetor biológico de vírus, chegando a levar colônias com baixos índices de CH a entrar em infecção viral generalizada (Wilfert et al. 2016). Em outro cenário, as doenças bacterianas podem levar colmeias de apiários inteiros ao declínio, ao infectar a cria se instalando no intestino larval através da alimentação, com o passar do tempo o quadro sintomatológico avança nas colônias, com larvas infectadas mortas de coloração escura, aspecto viscoso e cheiro desagradável (Forsgren 2010; Arai et al. 2012). Assim, altos níveis de expressão do CH em populações selecionadas estão diretamente relacionados à menor suscetibilidade a uma série de

agentes patogênicos que influenciam no declínio de colônias na apicultura mundial (Maucourt et al. 2020).

1.4- Comportamento higiênico e saúde nas abelhas sem ferrão

O CH também tem sido estudado nas abelhas sem ferrão (Le Gross et al. 2022; Medina et al. 2009; Nunes-Silva et al. 2009; Toufalia et al. 2016; De Jesus et al. 2017). Diferentemente do esperado para *A. mellifera*, encontramos um cenário com uma grande diversidade de expressão do CH dentro do grupo. Atualmente, 10 espécies dentro das abelhas sem ferrão tiveram o seu CH descrito, o que representa menos de 5% da diversidade do grupo (244 espécies) encontradas no Brasil (Pedro 2014). Como exemplo da diversidade de CH nos meliponíneos, três espécies do gênero *Melipona* demonstraram resultados distintos no período de experimentação: abelhas *M. scutellaris* removeram 99% da cria morta em 48 horas, enquanto abelhas *M. beechei* removeram 67% na mesma faixa de horário; já em *M. quadrifasciata anthiodioides* foi observado o CH em diferentes estágios de desenvolvimento larval, com a espécie apresentando uma média de remoção em larvas mortas de 65,3% enquanto em colônias com pupas mortas essa remoção foi 34% em 48 horas (Medina et al. 2009; Toufalia et al. 2016; De Jesus et al. 2017). Outras espécies de meliponíneos já tiveram o seu comportamento higiênico mensurado: *Pebleia remota* e *Scaptotrigona pectoralis* apresentaram acima de 90% de remoção em até 48 horas, o que foi mais similar ao esperado para colônias selecionadas higiênicas de *A. mellifera* (Medina et al. 2009; Nunes-Silva et al. 2009). Em contrapartida, outras espécies apresentaram um percentual de remoção menor após 48 horas: como *S. depillis* com uma média de remoção de 79,5%, *T. angustula* com a média de remoção de 62% da cria morta e operárias de *Scaptotrigona bipunctata* removeram uma média de 59,14% (Toufalia et al. 2016; Wielewski 2018). Além disso, temos espécies que apresentaram 100% de remoção da cria sacrificada antes mesmo das 24 horas como é o caso da *Tetragonula carbonaria* que removeu toda a cria morta em apenas 10 horas e *Tetragonula hockingsi* que o fez em 20 horas (Le Gross et al. 2022). Assim, grande é a diversidade do CH dentro do grupo das abelhas, ao classificar as espécies de abelha sem ferrão como abelhas higiênicas e não-higiênicas é necessário considerar outros mecanismos e comportamentos que refletem a imunidade social do grupo e que precisam ser estudados.

Conhecer o CH entre espécies dentro das abelhas sem ferrão é o passo inicial para investigar um mecanismo de resistência de colônias a patógenos dentro do grupo, já que,

nos últimos anos, são crescentes os relatos de doenças nessas abelhas (Nogueira-Neto 1997; Shanks et al. 2017; Purkiss e Lach 2019; Teixeira et al. 2020). Durante muitos anos se associou a ausência de patógenos em colônias de abelhas sem ferrão justamente por conta da sua biologia, já que, no provisionamento da célula de cria o indivíduo imaturo passa por todo o seu desenvolvimento com a célula fechada, sem contato com o ambiente externo até o seu nascimento (Nogueira-Neto 1997; Grüter 2020). Em contrapartida, várias são as situações de riscos em que estes indivíduos acabam entrando em contato, como a coleta de recurso em plantas que funcionam como “hotspot” de micro-organismos ou na má nutrição com uma dieta com baixa diversidade e qualidade polínica, que influencia diretamente na saúde e imunidade do grupo (Purkiss e Lach 2019; Alger et al. 2019; Di Pasquale et al. 2013; Frias et al. 2016). Por isso, se torna cada vez mais necessário investigar os agentes patogênicos presentes dentro dos ninhos das espécies dentro do grupo. Até o momento duas bactérias foram confirmadas em espécies de abelhas sem ferrão sendo detectadas nos gêneros *Tetragonula* e *Melipona* as bactérias *Lysinibacillus sphaericus* e *Melissococcus plutonius*, respectivamente, causadoras de doença de cria em *A. mellifera* (Shanks et al. 2017; Teixeira et al. 2020).

A má nutrição é um dos principais fatores da alta incidência na mortalidade de colônias por doenças infecciosas (Tritschler 2017). O néctar transformado em mel pelas abelhas é fonte de carboidratos que são transformados em energia em seu organismo, enquanto o pólen coletado nas flores fica responsável por fornecer aminoácidos e proteínas para o funcionamento do desenvolvimento da sua fisiologia (Brodtschneider e Crailsheim 2010). O estabelecimento e sobrevivência de colônias no meio ambiente está diretamente relacionado com a disponibilidade destes recursos naturais (Brodtschneider e Crailsheim 2010; Haydak 1970). Com a intensificação e expansão da agricultura refletindo na fragmentação e degradação do habitat, esses recursos ficam cada vez mais escassos para as populações manejadas de abelhas resultando em uma nutrição deficiente baseada muitas vezes em uma dieta com baixa diversidade polínica (Naug 2009; Decourtye, Mader e Desneux 2010). Assim, se torna necessário conhecer a relação entre a má nutrição e a saúde de colônias para melhor entender a perda de enxames em várias regiões do mundo (Neumann e Carreck 2010). O cenário de escassez polínica pode influenciar diretamente a resistência imunológica das abelhas já que sob situação de estresse- patógenos ou pesticidas- colônias podem chegar ao colapso (Naug 2009). Além disso, a ingestão de pólen vai influenciar no sistema imunológico e na tolerância a uma

série de agentes patogênicos (bactérias e vírus) no organismo das abelhas (Rinderer, Rothenbuhler e Gochnauer 1974; Alaux et al. 2010; DeGrandi-Hoffman et al. 2010). Assim, fica claro a necessidade de as abelhas terem uma dieta com diversidade e qualidade no espectro polínico para a saúde de colônias (Di Pasquale 2013; Frias et al. 2016).

1.5- Espécie-alvo: Abelha canudo

A abelha sem ferrão, *Scaptotrigona aff. postica*, possui ampla distribuição no território brasileiro sendo um importante agente polinizador de várias espécies florais e culturas agrícolas (Da Luz et al. 2019). É conhecida popularmente como abelha canudo por sua entrada de acesso ao ninho ser muito característica, com um túnel de cerumen com coloração bege similar a um canudo (Lima, Silvetre e Balertieri 2013). São abelhas pequenas (cerca de 6 mm de comprimento), seus ninhos são comumente encontrados em cavidades pré-existentes, ou seja, em oco de árvores, local de nidificação natural da espécie, e elas ocorrem no estado do Pará (Nogueira-Neto 1997; Menezes et al. 2023). Sua arquitetura de ninhos são favos de crias construídos de forma horizontal e sobrepostos; nas laterais dos ninhos se encontram os potes de alimento (Nogueira- Neto 1997). É uma espécie com alta densidade populacional com cerca de 15.000 indivíduos entre imaturos e adultos presentes dentro da colônia (Gruter 2020). Possui uma grande atividade ecossistêmica, representando assim, uma expressiva polinização e visitação floral em várias culturas de interesse socioeconômico, como por exemplo do açaí, sendo um eficiente agente polinizador (Campbell et al. 2018, 2023). Pela importância para a biodiversidade das regiões onde está inserida, se faz necessário investigar aspectos que influenciam a saúde dessa espécie.

2. Objetivos e organização geral

Nosso objetivo geral foi avaliar a expressão do comportamento higiênico como mecanismo de defesa coletivo da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. postica*, além da investigação de patógenos em colônias com sinais clínicos de doenças. Avaliar a presença de duas bactérias causadoras de doenças de cria em abelhas: *Melissococcus plutonius* e *Paenibacillus larvae*, e de seis vírus: *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Black queen cell virus* (BQCV), *Deformed wing virus* (DWV), *Israeli acute paralysis virus* (IAPV),

Kashmir bee virus (KBV) e *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) em operárias recém-emergidas de *S. aff. postica*. Avaliar os tipos polínicos encontrados nas colônias.

Dentro deste contexto geral, quatro perguntas foram levantadas:

- A) Existe diferença na expressão do CH em *S. aff. postica* quanto a fase de cria afetada (larva ou pupa) ?
- B) Existe em *S. aff. postica* variação da expressão do comportamento higiênico entre colônias e em estações diferentes?
- C) *S. aff. postica* é acometida por alguma bactéria patogênica ou vírus em área de açazal?
- D) Qual o perfil e diversidade do espectro polínico encontrado nas colônias de *S. aff. postica* em área de açazal?

Nesse sentido, a dissertação foi desenvolvida em dois capítulos, as duas primeiras perguntas resultaram no capítulo 1 e as duas últimas no capítulo 2.

REFERÊNCIAS

- Al Toufailia H, Alves DA, Bento JMS, Marchini LC, Ratnieks FLW. Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. *Biol. Open* [Internet]. 2016;5(11):1712–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/bio.018549>
- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* [Internet]. 2010;6(4):562–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Alger SA, Burnham PA, Brody AK. Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(9):e0221800. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0221800>
- Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, et al. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(3):e33708. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033708>
- van Baalen M, Beekman M. The costs and benefits of genetic heterogeneity in resistance against parasites in social insects. *Am. Nat.* [Internet]. 2006;167(4):568–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1086/501169>
- Brodtschneider R, Crailsheim K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2010;41(3):278–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010012>
- Campbell AJ, Carnevalheiro LG, Maués MM, Jaffé R, Giannini TC, Freitas MAB, et al. Anthropogenic disturbance of tropical forests threatens pollination services to açai palm in the Amazon river delta. *J. Appl. Ecol.* [Internet]. 2018;55(4):1725–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.13086>
- Campbell AJ, Silva FD da S e., Maués MM, Leão KL, Carnevalheiro LG, Moreira EF, et al. Forest conservation maximises açai palm pollination services and yield in the Brazilian Amazon. *J. Appl. Ecol.* [Internet]. 2023;60(9):1964–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.14460>
- Craig GB, Cochran DG, Rothenbuhler WC. Genetics and the E. S. A. *Bull. Entomol. Soc. Am.* [Internet]. 1960;6(2):100–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/besa/6.2.100b>
- Cremer S. Social immunity in insects. *Curr. Biol.* [Internet]. 2019;29(11):R458–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.035>
- Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P. Social immunity. *Curr. Biol.* [Internet]. 2007;17(16):R693–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>

- Cremer S, Sixt M. Analogies in the evolution of individual and social immunity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* [Internet]. 2009;364(1513):129–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2008.0166>
- Decourtye A, Mader E, Desneux N. Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2010;41(3):264–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010024>
- DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Huang E, Huang MH. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* [Internet]. 2010;56(9):1184–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.017>
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, et al. Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* [Internet]. 2013;8(8):e72016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>
- Facchini E, Bijma P, Pagnacco G, Rizzi R, Brascamp EW. Hygienic behaviour in honeybees: a comparison of two recording methods and estimation of genetic parameters. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2019;50(2):163–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-018-0627-6>
- Forsgren E. European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2010;103:S5–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>
- Frias BED, Barbosa CD, Lourenço AP. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2016;47(1):15–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-015-0373-y>
- Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, Cartolano EA Jr, Veiga AK, Imperatriz-Fonseca VL, et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2015;46(2):209–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
- Gruter C. *Stingless bees: Their behaviour, ecology and evolution*. 1st ed. Cham, Switzerland: Springer Nature; 2020.
- Haydak MH. Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* [Internet]. 1970;15(1):143–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.15.010170.001043>
- Jaffé R, Pope N, Carvalho AT, Maia UM, Blochtein B, de Carvalho CAL, et al. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(3):e0121157. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121157>
- de Jesus JN, Chambó ED, da Silva Sodr e G, de Oliveira NTE, de Carvalho CAL. Hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2017;48(4):504–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-017-0495-5>

- Jones RL, Rothenbuhler WC. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. II. Responses of two inbred lines to various amounts of cyanide-killed brood. *Anim. Behav.* [Internet]. 1964;12(4):584–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90083-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472(64)90083-1)
- Julian GE, Cahan S. Undertaking specialization in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor*. *Anim. Behav.* [Internet]. 1999;58(2):437–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/anbe.1999.1184>
- Le Gros KS, Makinson JC, Spooner-Hart RN. Hygienic behaviour in the Australian stingless bees *Tetragonula carbonaria* and *T. hockingsi*. *J. Apic. Res.* [Internet]. 2022;61(5):578–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2022.2109915>
- Lima FV de O, Silvestre R, Balestieri JBP. Nest entrance types of stingless bees (Hymenoptera: Apidae sensu lato) in a Tropical Dry Forest of mid-Western Brazil. *Sociobiology* [Internet]. 2013;60(4):421–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v60i4.421-428>
- Locke B. Natural Varroa mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2016;47(3):467–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-015-0412-8>
- da Luz CFP, Fidalgo A de O, Silva SAY, Rodrigues S dos S, Nocelli RCF. Comparative floral preferences in nectar and pollen foraging by *Scaptotrigona postica* (Latreille 1807) in two different biomes in São Paulo (Brazil). *Grana* [Internet]. 2019;58(3):200–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00173134.2019.1579257>
- Maucourt S, Fortin F, Robert C, Giovenazzo P. Genetic parameters of honey bee colonies traits in a Canadian selection program. *Insects* [Internet]. 2020;11(9):587. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/insects11090587>
- Medina LM, Hart AG, Ratnieks FLW. Hygienic behavior in the stingless bees *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini). *Genet. Mol. Res.* [Internet]. 2009;8(2):571–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.4238/vol8-2kerr010>
- Meunier J. Social immunity and the evolution of group living in insects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* [Internet]. 2015;370(1669):20140102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0102>
- Michener CD. The social behavior of the bees. London, England: Harvard University Press; 1974.
- Michener CD. The bees of the world. 2nd ed. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press; 2007.
- Naug D. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol. Conserv.* [Internet]. 2009;142(10):2369–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.007>

- Neumann P, Carreck NL. Honey bee colony losses. J. Apic. Res. [Internet]. 2010;49(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.01>
- Newton D, Ostasiewski N, (1986). A simplified bioassay for behavioral resistance to American Foulbrood in Honey-Bees (*Apis-Mellifera L*). Am. Bee J. 126: 278–281.
- Nogueira-Neto P: Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. São Paulo, Editora Nogueirapis, 1997.
- Nunes-Silva P, Imperatriz-Fonseca VL, Gonçalves LS. Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). Genet. Mol. Res. [Internet]. 2009;8(2):649–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.4238/vol8-2kerr026>
- Park OW. Testing for resistance to American foulbrood in honeybees. J. Econ. Entomol. [Internet]. 1937;30(3):504–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/30.3.504>
- Pedro SRM. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). Sociobiology [Internet]. 2014;61(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>
- Purkiss T, Lach L. Pathogen spillover from *Apis mellifera* to a stingless bee. Proc. Biol. Sci. [Internet]. 2019;286(1908):20191071. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.1071>
- Rinderer TE, Rothenbuhler WC, Gochnauer TA. The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus* larvae. J. Invertebr. Pathol. [Internet]. 1974;23(3):347–50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(74\)90100-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(74)90100-1)
- Rothenbuhler WC. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. Anim. Behav. [Internet]. 1964;12(4):578–83. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90082-x](http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472(64)90082-x)
- Sakagami SF, Yamane S. Oviposition behavior and related notes of the Taiwanese stingless bee: *Trigona (Lepidotrigona) ventralis* hoozana. J. Ethol. [Internet]. 1987;5(1):17–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02347891>
- Seeley TD. The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press; 1995.
- Shanks JL, Haigh AM, Riegler M, Spooner-Hart RN. First confirmed report of a bacterial brood disease in stingless bees. J. Invertebr. Pathol. [Internet]. 2017;144:7–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.004>
- Simone-Finstrom M, Spivak M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. Apidologie (Celle) [Internet]. 2010;41(3):295–311. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010016>

- Slaa EJ, Sánchez Chaves LA, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2006;37(2):293–315. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2006022>
- Spivak M, Danka RG. Perspectives on hygienic behavior in *Apis mellifera* and other social insects. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2021;52(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-020-00784-z>
- Spivak M, Downey DL. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* [Internet]. 1998;91(1):64–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/91.1.64>
- 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* [Internet]. 1998;79(4):169–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/0005772x.1998.11099408>
- Spivak M, Reuter GS. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 1998;29(3):291–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19980308>
- Starks PT, Blackie CA, Seeley TD. Fever in honeybee colonies. *Sci. Nat.* [Internet]. 2000;87(5):229–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s001140050709>
- Teixeira ÉW, Ferreira EA, Luz CFP da, Martins MF, Ramos TA, Lourenço AP. European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2020;172(107357):107357. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2020.107357>
- Teixeira ÉW, de Paiva Daibert RM, Glatzl Júnior LA, da Silva MVGB, Alves MLTMF, Evans JD, et al. Transcriptomic analysis suggests candidate genes for hygienic behavior in African-derived *Apis mellifera* honeybees. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2021;52(2):447–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-020-00834-6>
- Toledo-Hernández E, Peña-Chora G, Hernández-Velázquez VM, Lormendez CC, Toribio-Jiménez J, Romero-Ramírez Y, et al. The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2022;53(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-022-00913-w>
- Traynor KS, Mondet F, de Miranda JR, Techer M, Kowallik V, Oddie MAY, et al. Varroa destructor: A complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends Parasitol.* [Internet]. 2020;36(7):592–606. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Tritschler M, Vollmann JJ, Yañez O, Chejanovsky N, Crailsheim K, Neumann P. Protein nutrition governs within-host race of honey bee pathogens. *Sci. Rep.* [Internet]. 2017;7(1):14988. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15358-w>

- Veiga JC, Leão KL, Coelho BW, Queiroz ACM de, Menezes C, Contrera FAL. The Life Histories of the “Uruçu Amarela” Males (*Melipona flavolineata*, Apidae, Meliponini). *Sociobiology* [Internet]. 2018;65(4):780. Available from: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3451>
- Waddington KD, Rothenbuhler WC. Behaviour associated with hairless-black syndrome of adult honeybees. *J. Apic. Res.* [Internet]. 1976;15(1):35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1976.11099831>
- Wilfert L, Long G, Leggett HC, Schmid-Hempel P, Butlin R, Martin SJM, et al. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science* [Internet]. 2016;351(6273):594–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aac9976>
- Wilson EO, Hölldobler B. Eusociality: Origin and consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 2005;102(38):13367–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0505858102> .
- Wielewski P (2018). Identidade Taxonômica, notas Bionômicas e sobre o Comportamento Higiênico de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836),(Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

**(Capítulo 1) Caracterização do comportamento higiênico em abelhas sem ferrão
*Scaptotrigona aff. postica***

Autores: Yasmin G. Sousa¹, Ana Carolina F. Souza², Jamille C. Veiga³, Daniel S. Pereira⁴, Kamila L. Leão⁵, Anete P. Lourenço¹.

Afiliação:

1-Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Alto da Jacuba, 39100-000, Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

2-Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brazil.

3- Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável, Belém, Pará, Brazil.

4- Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brazil.

5- Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.

(Trabalho formatado para envio para Apidologie)

RESUMO

O comportamento higiênico (CH) é um mecanismo de defesa natural coletivo que os insetos sociais possuem visando diminuir a propagação de infecção e patógenos na área de cria em seus ninhos. Nas abelhas, as operárias detectam, desoperculam e removem a cria infectada promovendo a saúde da colônia. Nesse estudo caracterizamos o CH em uma espécie de abelha sem ferrão na Amazônia, *Scaptotrigona aff. postica*, comparando a sua expressão entre estágios de vida, larva e pupa. Os experimentos de CH foram realizados em 28 colônias localizadas no Pará, em três épocas do ano (três experimentos independentes). Para o teste de CH foi realizado o método de perfuração em áreas com imaturos em fase larval e pupal. As observações foram realizadas em 6 faixas de horários distintas após o sacrifício dos indivíduos (4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas). Foi possível constatar que as operárias removeram em média 10 vezes mais larvas sacrificadas do que pupas a partir de 8 horas de sacrifício nos três experimentos. Após 24 horas, a média de remoção geral em larvas foi de 75,65% ($\pm 9,67\%$), enquanto em pupas sacrificadas, as operárias removeram em média 7,9% ($\pm 7,4$). Em 48 horas, foram removidas 88% ($\pm 8\%$) de larvas e 32% ($\pm 9,7\%$) de pupas sacrificadas. Além disso, observamos diferenças na taxa de remoção da cria sacrificada entre as colônias, mas não houve diferença entre as épocas (experimentos). Assim, operárias de *S. aff. postica* apresentaram maior probabilidade de remoção em larvas sacrificadas do que de pupas, sendo necessário entender mais acerca dos aspectos que influenciam para essa diferença.

Palavras-chave: Meliponini, Imunidade Social, Mecanismo de defesa

ABSTRACT

Hygienic behavior (HB) is a collective natural defense mechanism that social insects have to reduce the spread of infection and pathogens in the brooding area of their nests. In bees, workers detect, uncap and remove infected brood, promoting colony health. In this study, we characterized CH in a species of stingless bee from the Amazon, *Scaptotrigona* aff. *postica*, comparing its expression between life stages, larvae and pupae. HB experiments were carried out in 28 colonies located in Pará, at three times in two years (three independent experiments). For the HB test, the pin-killed method was carried out in areas with immatures in the larval and pupal stages. Observations were carried out at 6 different time intervals after the individuals were sacrificed (4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours). It was possible to verify that the workers removed approximately 10 times more sacrificed larvae than pupae after 8 hours of sacrifice in the three experiments. After 24 hours, the mean overall removal in larvae was 75,65% ($\pm 9,67\%$), while in pupae, workers removed an mean of 7.9% (± 7.4). Within 48 hours, 88% ($\pm 8\%$) of larvae were removed and 32% ($\pm 9.7\%$) of sacrificed pupae. Furthermore, we observed differences in the rate of removal of sacrificed offspring between colonies, but there was no difference between seasons (experiments). Thus, workers of *S. aff. postica* were more likely to remove sacrificed larvae than pupae, and it is necessary to understand more about the aspects that influence this difference.

Keywords: Meliponini, Social Immunity, Defense mechanism

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são os principais polinizadores das plantas floridas nativas e cultivadas, sendo de vital importância para a manutenção de ecossistemas e da vida humana (Giannini et al. 2015). Apesar de a maior parte das espécies possuírem comportamento solitário (Batra et al. 1989), grandes populações de abelhas são encontradas no grupo de abelhas com comportamento eussocial (Michener 1974). Essas abelhas são um grupo específico de abelhas sociais que exibem um alto nível de organização social e cooperação dentro de suas colônias. Elas são caracterizadas por uma divisão de trabalho entre as castas, sobreposição de gerações e cuidado cooperativo da prole (Michener 1974). Dentre as abelhas, as que exibem comportamento eussocial pertencem às tribos Apini e Meliponini. A tribo Apini é composta somente pelo gênero *Apis*, sendo conhecidas de 9-12 espécies (Raffiudin e Crozier 2007), e dentro de Meliponini são conhecidas mais de 500 espécies, apresentando uma alta diversidade e importância na região Neotropical (Grüter 2020).

A vida em sociedade representa benefícios e malefícios para os insetos que desenvolveram a cooperação no estilo de vida social. Dentro dos ninhos dos insetos sociais essa cooperação entre indivíduos resulta em benefícios, como o cuidado coletivo com a prole, na coleta de diversos recursos na natureza e na defesa contra inimigos naturais (Cremer, Armitage e Schmid-Hempel 2007). Em contrapartida, viver em sociedade pode trazer algumas desvantagens; por encontrarmos um cenário de alta densidade populacional com indivíduos de alta similaridade genética e que exercem um frequente contato, encontramos um ambiente propício para infecção e transmissão de doenças ou patógenos (Schmid – Hempel 1998; Cremer, Armitage e Schmid-Hempel 2007; Stroeymeyt et al. 2018; Cremer 2019). Assim, essa sociedade desenvolveu uma série de mecanismos de defesa coletivos para limitar a propagação de infecções por patógenos e/ou doenças dentro de seus ninhos; estes mecanismos caracterizam a imunidade social (Cremer, Armitage e Schmid – Hempel 2007; Stroeymeyt et al. 2018; Cremer 2019).

A imunidade social é composta por uma série de mecanismos de defesa, que podem ser comportamentais, anatômicos, fisiológicos e imunológicos (Evans et al. 2006; Schmid-Hempel et al. 2008; Wilson-Rich et al. 2008). Os insetos sociais realizam diversos comportamentos para evitar a propagação de infecção dentro de suas colônias.

Em abelhas, operárias guardas se especializam no controle da entrada dentro da colônia, não permitindo a entrada de indivíduos infectados (Drum e Rothenbuhler 1985). Além disso, abelhas desinfectam materiais presentes dentro dos ninhos utilizando substâncias antimicrobianas coletadas na natureza como a resina vegetal ou com a deposição de própolis (cera misturada com resina vegetal) (Schmid-Hempel 1998; Cremer, Armitage e Schmid-Hempel 2007). As abelhas ainda realizam o comportamento conhecido como "undertaking", que é caracterizado por armazenar indivíduos mortos longe da área de cria e de alimento, e posteriormente remover para fora da colônia (Julian e Cahan 1999; Cremer, Armitage e Schmid-Hempel 2007). Além disso, as abelhas possuem outros comportamentos coletivos que visam dificultar a dispersão de infecções dentro das colônias, tais como, eliminação dos propágulos de parasitas, o isolamento espacial de indivíduos infectados ou com uma maior probabilidade de serem contaminados, e realocação dos ninhos. Existe ainda a imunidade organizacional, que consiste na organização dos indivíduos da colônia em grupos separados pela idade e tarefa, com o intuito de inibir a exposição aos propágulos de patógenos dos indivíduos que apresentam um alto valor para colônia, como por exemplo, as rainhas e as operárias mais jovens (Cremer, Armitage e Schmid-Hempel 2007; Simone, Evans e Spivak 2009; Stroeymeyt et al. 2018).

Dentre a série de comportamentos que vão influenciar diretamente na saúde de colônias de insetos sociais está o comportamento higiênico (CH). Este comportamento consiste em um mecanismo de defesa coletivo natural que é controlado por uma diversidade de loci gênicos e voltado para a contenção de doenças de cria e infecção por patógenos (Rothenbuhler 1964 a,b; Teixeira et al. 2021). As abelhas operárias expressam esse comportamento detectando a cria infectada ou morta, desoperculando as células e, finalmente, eliminando as crias de dentro da colônia (Rothenbuhler 1964 a,b). O CH foi primeiramente observado na abelha *Apis mellifera*, onde vem sendo muito estudado e utilizado como método de seleção genética em populações da espécie (Park et al. 1937). O CH começou a ser investigado em colônias resistentes à bactéria *Paenibacillus larvae*, causadora da cria pútrida americana, doença de alto impacto na apicultura (Rothenbuhler 1964). Posteriormente, esse mecanismo passou a ser estudado como mecanismo de defesa para outras doenças que ocorrem na cria e a ser investigado em outro grupo de abelhas eussociais, os meliponíneos (Medina et al. 2009; Nunes-Silva 2009; Al Toufalia et al. 2016; De Jesus et al. 2017; Le Gross et al. 2022).

Existem alguns métodos para mensurar a expressão do CH, sendo um dos mais tradicionais o de sacrifício por perfuração, consistindo em sacrificar uma área pré-determinada nos favos de cria, simulando uma doença na cria (Newton e Ostasiewski 1986). Após um determinado período após a realização do tratamento, analisa-se a taxa de remoção dos indivíduos sacrificados em relação a uma área controle, sem perfuração da cria (Newton e Ostasiewski 1986). Em *A. mellifera*, uma colônia é considerada higiênica quando expressa uma remoção dos indivíduos sacrificados acima de 95% em até 48 horas (Spivak e Downey 1998).

Com os recentes estudos que confirmam a presença de patógenos causadores de doenças de cria em colônias de abelhas sem ferrão (Nogueira-Neto 1997; Shanks et al. 2017; Purkiss e Lach 2019; Teixeira et al. 2020), analisar o CH é uma forma de conhecer mais acerca da imunidade social dentro do grupo, buscando conhecer os mecanismos de resistência aos patógenos causadores de doença de cria. Atualmente, nove espécies de abelhas da tribo Meliponini tiveram o seu CH como mecanismo de defesa observado, representando menos de 5% das 244 espécies de abelhas sem ferrão descritas no Brasil (Pedro 2014). Assim como a grande diversidade morfológica das abelhas, de construção de ninhos, e comportamentais (Grüter 2020), o CH higiênico também se apresenta diverso em abelhas sem ferrão. Enquanto algumas espécies apresentam alta taxa de remoção em 48h (> 95%), por exemplo, em *Melipona scutellaris* (Al Toufalia et al. 2016), *Plebeia remota* (Nunes-silva et al. 2009), *Scaptotrigona pectoralis* (Medina et al. 2009), em outras espécies a remoção foi baixa (< 95%), por exemplo, em *Tetragonisca angustula* (Al Toufalia et al. 2016) e *M. quadrifasciata anthidioides* (De Jesus et al. 2017). Nesse cenário, é perceptível a diversidade de expressão comportamental dentro do mesmo gênero e em gêneros e espécies diferentes, não sendo possível ainda classificar as abelhas sem ferrão em grupos distintos de abelhas higiênicas e não-higiênicas.

A abelha sem ferrão *Scaptotrigona* aff. *postica* é conhecida popularmente como abelha canudo por sua entrada ser característica com um formato tubular de coloração escurecida (Lima et al. 2013). É uma das espécies dentro do grupo das abelhas sem ferrão que representa um importante papel na polinização da flora natural e de várias culturas agrícolas, como por exemplo do açaí, sendo um eficiente agente polinizador para as regiões onde estão inseridas (Anderson et al. 1982; Slaa et al. 2006).

Diante da importância destas abelhas e o pouco conhecimento do CH em abelhas sem ferrão, o objetivo deste trabalho foi avaliar e descrever o CH em *Scaptotrigona* aff. *postica* comparando entre dois estágios de vida, larvas e pupas, entre colônias, e entre experimentos independentes realizados em épocas distintas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Colônias de *Scaptotrigona* aff. *postica*

As colônias da abelha sem ferrão *Scaptotrigona* aff. *postica* utilizadas no teste do comportamento higiênico estavam localizadas no Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, Pará, Brasil (1°26'11.52"S, 48°26'35.50"O). As colônias foram mantidas em caixas de madeira medindo 25 cm × 25 cm × 34 cm (Leão et al. 2016), abrigadas em meliponários coletivos e em cavaletes individuais. Foram utilizadas um total de 28 colônias (Tabela 1) distribuídas em três experimentos independentes (E1, E2 e E3). As colônias estavam com uma condição de força da colônia média: apresentavam discos com tamanho regular (com aproximadamente 12 cm de diâmetro), um estoque mediano de alimento (potes de alimentos ocupando aproximadamente metade do sobreninho) e uma densidade populacional proporcional para manter todas as atividades dentro da colônia (Figura 1). Algumas destas colônias apresentavam sinais clínicos de doença de cria (Tabela 1), com discos falhados, e larvas de coloração escura depositadas sobre os discos de cria (Figura 2). O experimento 1 foi realizado em outubro de 2022, e os experimentos 2 e 3 em janeiro e fevereiro de 2023, respectivamente. Durante o período dos experimentos, as colônias foram alimentadas artificialmente uma vez em cada mês com cerca de 100 mL de xarope invertido de 2 partes de açúcar para 1 de água (2:1 p/v).

Tabela 1- Colônias de *Scaptotrigona* aff. *postica* utilizadas nas coletas 1, 2 e 3 (C1, C2 e C3) de comportamento higiênico e suas condições gerais.

ID	Coleta	Estágio de vida		Sintoma de doença
		Larva	Pupa	
S01	C1, C2, C3	C3	C1, C2	Não
S02	C1, C2, C3	C2	C1, C3	Não
S03	C1, C3	C1	C3	Não
S04	C1, C2, C3	C1, C2	C3	Não
S05	C1, C2	-	C1, C2	Não
S06	C1, C2, C3	C2	C1, C3	Não
S07	C1, C2, C3	C1	C2, C3	Sim
S08	C1, C2, C3	C2, C3	C1	Não
S09	C1, C2, C3	C1, C3	C2	Sim
S10	C1, C2, C3	-	C1, C2, C3	Não
S11	C1, C2, C3	C1	C2, C3	Sim
S12	C1, C2, C3	C2, C3	C1	Sim
S13	C1, C3	-	C1, C3	Não
S14	C1, C2, C3	C1	C2, C3	Sim
S15	C1, C2, C3	C1, C2, C3	-	Não
S16	C1, C2, C3	C1, C3	C2	Não
S17	C1	C1	-	Não
S18	C2, C3	C3	C2	Sim
S20	C1, C2	C1, C2	-	Não
S21	C2, C3	C2, C3	-	Não
S22	C2, C3	C3	C2	Não
S23	C2	-	C2	Sim
S24	C2, C3	C2	C3	Sim
S25	C2, C3	-	C2, C3	Não
S26	C2, C3	-	C2, C3	Não
S27	C2, C3	C2	C3	Não
S28	C2, C3	C2	C3	Sim
S29	C2, C3	C2, C3	-	Não



Figura 1 – Exemplo de colônia de *Scaptotrigona* aff. *postica* utilizada para realização teste do comportamento higiênico.



Imagem : Jamille Veiga

Figura 2 – Larvas mortas depositadas sobre os discos de cria, indicando sinais clínicos de doença de cria em uma colônia de *Scaptotrigona* aff. *postica*.

2.2- Desenho experimental

As colônias foram preparadas um dia antes da realização do teste do CH para minimizar os danos estruturais causados nestas. Essa preparação consistiu na retirada do excesso de própolis para melhorar a observação e na escolha do disco de cria que seria tratado de acordo com o desenvolvimento do imaturo (larva ou pupa). Foi utilizado um porta discos, consistindo em uma estrutura de plástico utilizada para acomodar o disco de cria pré-escolhido acima na região do sobreninho para facilitar a observação do CH (Figura 3). No experimento 1 houve uma diferença na metodologia que foi posteriormente adaptada nos outros ensaios. Nesse experimento, as células de cria na área de tratamento

dos discos foram perfuradas dentro da colônia, ou seja, o disco não foi retirado da colônia e levado ao laboratório para terem as células de cria sacrificadas. Nos experimentos 2 e 3, os discos foram armazenados em caixas, sendo identificadas por colônias, e levados para dentro do laboratório, onde as áreas de experimentação foram marcadas.

Em todos os três experimentos foram utilizadas colônias com discos com larvas em estágio de pré-pupas, e outras colônias com discos de imaturos em pupas de coloração dos olhos marrom-escuro e corpo branco ou amarelado. Para realizar a descrição e comparação do comportamento higiênico entre larva e pupa, foi utilizado o método da perfuração de crias – “Pin- Killed” (Newton e Ostasiewski, 1986). Para tanto, delimitamos com uso de tinta para tecido (Acrilex ®) duas áreas no disco de cria, uma destinada ao tratamento e outra ao controle (contendo de 64 a 72 células), de acordo com o tamanho do disco de cria (Figura 3). Em seguida, as crias na área de tratamento foram perfuradas com o auxílio de alfinete entomológico número 3 (diâmetro de 0,5 mm). Os discos de cria foram, então, devolvidos à respectiva colônia de origem, para acompanhamento. Na área de controle, os indivíduos foram mantidos vivos para realizarmos a comparação do número de larvas e pupas removidas ao final do experimento.

O experimento teve início pela manhã, os discos foram retirados das colônias e levados até o laboratório onde foi realizado o processo de perfuração das células de cria, após foram devolvidos por volta das 13:00 horas para as suas respectivas colônias. O comportamento higiênico começou a ser observado a partir das 16:00 horas, logo, a primeira observação aconteceu após 3 horas de tratamento e continuou sendo realizada em intervalos de 4 horas até um período de 24 horas (4, 8, 12 e 24h) e também 48 e 72 horas após o tratamento. O indivíduo sacrificado removido na área de tratamento era considerado como célula limpa. Após a primeira faixa de horário, ao anoitecer, as colônias foram fechadas e transportadas para dentro do laboratório onde ocorreram as observações durante a madrugada nas faixas de horário pré-determinadas com intervalos de quatro horas, como descrito acima. As observações foram feitas com todas as colônias fechadas dentro do laboratório até às 24 horas após a execução do teste, ao final eram devolvidas aos seus respectivos lugares em campo e liberadas ao forrageio novamente. As observações foram realizadas novamente em 48 e 72 horas, em campo.

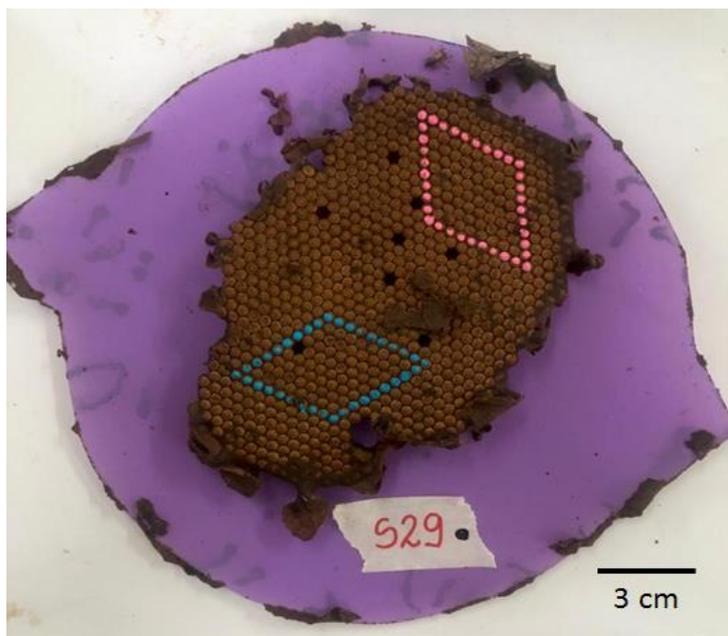


Figura 3- Disco de cria de *Scaptotrigona* aff. *postica* no porta discos evidenciando as áreas marcadas para controle (em azul) e para perfuração (em rosa)

2.3-Análise estatística

Com o auxílio do Software Excel se realizou a comparação do comportamento higiênico entre os estágios de vida (larva e pupa), os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney a variável porcentagem de abelhas removidas (por faixa de horário) foi considerada como variável resposta. Considerou-se o nível de significância para valores de p iguais a ou inferiores a 0,05. Além disso, foi realizada uma análise multivariada dos componentes principais (PCA) para compreender a variabilidade dos dados: Abelhas sacrificadas (AS) e Abelhas removidas (AR) em função das combinações das variáveis componentes originais.

3. RESULTADOS

Foi possível constatar a presença de operárias executando CH em *S. aff. postica*, com identificação da célula com cria morta, desoperculação e remoção da cria morta (Material suplementar - Video 01). Entretanto, constatamos que em algumas colônias com larvas sacrificadas, as operárias retiravam o indivíduo morto e deixavam sobre o disco de cria. Assim, essas larvas com o passar do tempo foram ressecando e escurecendo sobre os discos (Figura 5) (Material suplementar - Video 02).

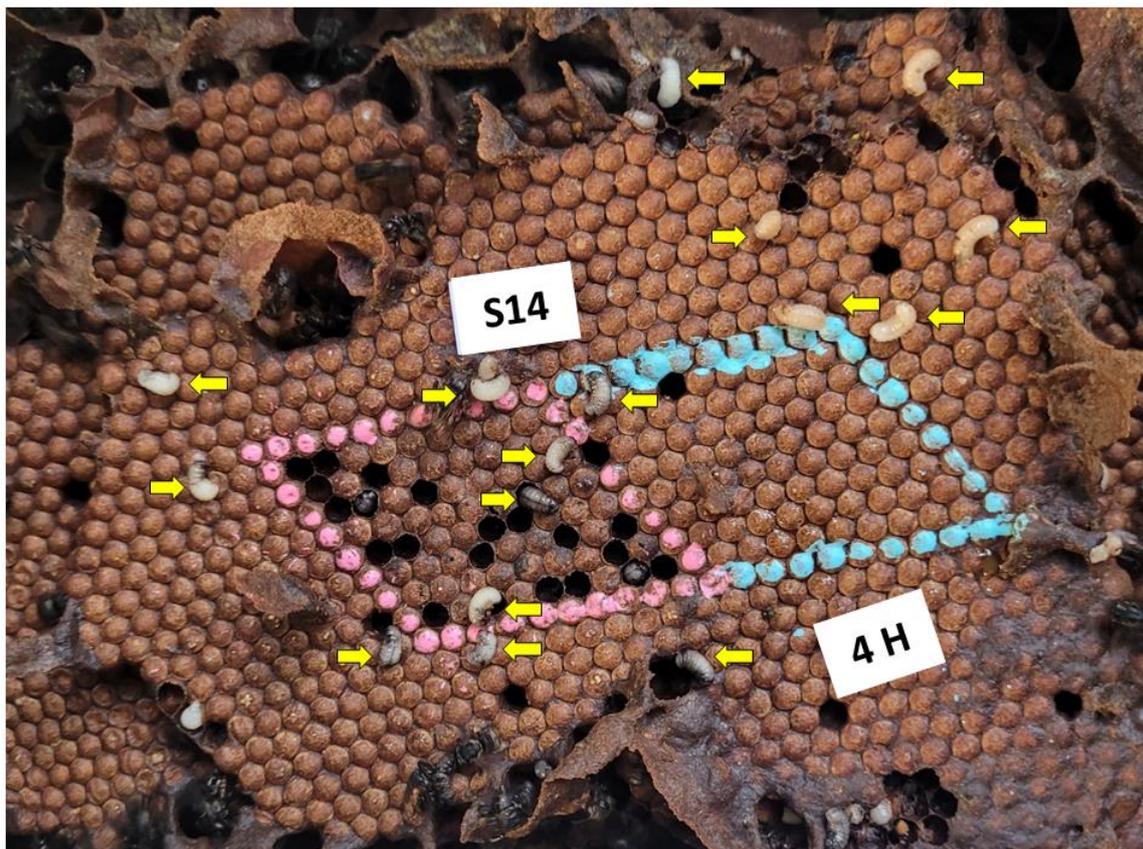


Figura 5 – Colônia de *Scaptotrigona aff. postica* indicando comportamento higiênico com remoção de larvas na área tratada por perfuração (delimitada em rosa). É possível observar larvas deixadas sobre os discos após operárias realizarem a remoção da célula de cria.

Considerando todos os três experimentos, em 24 horas, a média da porcentagem de remoção de larvas sacrificadas foi de 75,65% ($\pm 9,67\%$), enquanto de pupas sacrificadas, as operárias removeram em média 7,63% ($\pm 7,06\%$) (Tabela 3). Em 48h, foram removidas 91,08% ($\pm 5,87\%$) de larvas e 32,06% ($\pm 10,11\%$) de pupas sacrificadas. Vale ressaltar, que nas crias controle delimitadas foi observada remoção em duas colônias (C2:S21 e C3:S09), isso porque no manuseio dos discos de cria, algumas células acabaram sendo danificadas, matando os imaturos (Tabela 3).

Tabela 3- Média de remoção de larvas e pupas sacrificadas por perfuração (tratado) e controle das colônias de *Scaptotrigona* aff. *postica* após 24 e 48 horas de tratamento, em três experimentos independentes C1, C2 e C3.

	Larva					Pupa				
	24 h		48h			24 h		48h		
	ID	AT (%)	AC (%)	AT (%)	AC (%)	ID	AT (%)	AC (%)	AT (%)	AC (%)
C1	S17	89,06 (64)	0 (64)	100 (64)	0 (64)	S10	5,55 (72)	0 (72)	31,94 (72)	0 (72)
	S11	87,50 (64)	0 (64)	87,50 (64)	0 (64)	S12	0,0 (64)	0 (64)	0,00 (64)	0 (64)
	S14	93,06 (72)	0 (72)	95,83 (72)	0 (72)	S13	4,16 (72)	0 (72)	12,50 (72)	0 (72)
	S09	90,62 (64)	0 (64)	90,62 (64)	0 (64)	S02	96,87 (64)	0 (64)	96,87 (64)	0 (64)
	S15	1,56 (64)	0(64)	56,25 (64)	0 (64)	S01	3,12 (64)	0 (64)	6,25 (64)	0 (64)
	S20	97,22 (72)	0 (72)	98,61 (72)	0 (72)	S05	4,68 (64)	0 (64)	28,12 (64)	0 (64)
	S03	79,68 (64)	0 (64)	93,75 (64)	0 (64)	S08	0,0 (64)	0 (64)	31,25 (64)	0 (64)
	S04	92,18 (64)	0 (64)	93,75 (64)	0 (64)	S06	10,93 (64)	0 (64)	90,62 (64)	0 (64)
	S07	0,00 (64)	0 (64)	100 (64)	0 (54)	-	-	-	-	-
	S16	51,56 (64)	0 (64)	76,56 (64)	0 (64)	-	-	-	-	-
S18	95,31 (64)	0 (64)	95,31 (64)	0 (64)	-	-	-	-	-	
Méd. C1		68,25		89,29		15,67		37,2		
C2	S06	14,28 (63)	0 (64)	19,04 (62)	0 (64)	S16	0,0 (64)	0 (64)	3,1 (64)	0 (64)
	S08	3,22 (62)	0 (64)	98,38 (57)	0 (64)	S23	0,0 (64)	0 (64)	0,0 (61)	0 (64)

S04	4,68 (64)	0 (64)	4,68 (61)	0 (64)	S01	0,0 (64)	0 (64)	9,37 (64)	0 (64)	
S24	4,91 (61)	0 (64)	45,90 (61)	0 (64)	S18	0,0 (62)	0 (64)	64,51 (62)	0 (64)	
S21	44,44 (63)	3,7 (64)	49,20 (63)	3,7 (64)	S09	0,0 (64)	0 (64)	23,43 (64)	0 (64)	
S28	98,43 (64)	0 (64)	100 (60)	0 (64)	S10	0,0 (64)	0 (64)	35,93 (59)	0 (64)	
S15	95,23 (63)	0 (64)	95,23 (63)	0 (64)	S11	15,62 (64)	0 (64)	82,81 (64)	0 (64)	
S20	0,98 (64)	0 (64)	24,42(6 4)	0 (64)	S25	0,0 (63)	0 (64)	26,98 (60)	0 (64)	
S02	45,31 (64)	0 (64)	45,31 (64)	0 (64)	S26	7,8 (64)	0 (64)	100 (64)	0 (64)	
S12	6,25 (61)	0 (64)	6,25 (61)	0 (64)	S07	0,0 (64)	0 (64)	62,5 (61)	0 (64)	
S27	100 (64)	0 (64)	100 (64)	0 (64)	S05	0,0 (63)	0 (64)	6,3 (63)	0 (64)	
S29	98,43 (64)	0 (64)	98,43 (64)	0 (64)	S22	1,56 (64)	0 (64)	21,87 (64)	0 (64)	
-	-	-	-	-	S14	0,0 (64)	0 (64)	50,0 (63)	0 (64)	
Méd. C2	72,1		86,32			2,4		38,57		
C 3	S22	15,62 (64)	0 (64)	15,62 (64)	0 (64)	S06	0,0 (64)	0 (64)	0,0 (64)	0 (64)
	S15	32,81 (64)	0 (64)	34,37 (64)	0 (64)	S07	0,0 (64)	0 (64)	0,0 (64)	0 (64)
	S12	26,56 (64)	0 (64)	93,75 (64)	0 (64)	S02	0,0 (64)	0 (64)	0,0 (64)	0 (64)
	S21	100 (64)	43,75 (64)	100 (64)	43,75 (64)	S03	21,87 (64)	0 (64)	23,43 (64)	0 (64)
	S09	90,47 (64)	4,68 (64)	90,47 (64)	4,68 (64)	S24	1,56 (64)	0 (64)	1,56 (64)	0 (64)
	S08	98,43 (64)	0 (64)	98,43 (64)	0 (64)	S04	1,58 (64)	0 (64)	33,33 (64)	0 (64)

S16	71,42 (64)	0 (64)	73,01 (64)	0 (64)	S14	9,37 (64)	0 (64)	100 (64)	0 (64)
S29	0 (64)	0 (64)	3,12 (64)	0 (64)	S13	1,56 (64)	0 (64)	3,12 (64)	0 (64)
S01	18,75 (64)	0 (64)	51,56 (64)	0 (64)	S11	19,04 (64)	3,17 (64)	39,68 (64)	3,17 (64)
S18	37,5 (64)	0 (64)	43,75 (64)	1 (64)	S10	0,0 (64)	0 (64)	0,00 (64)	0(64)
-	-	-	-	-	S28	1,56 (64)	0(64)	1,56 (64)	0(64)
-	-	-	-	-	S27	0,00 (64)	0(64)	62,5 (64)	0(64)
-	-	-	-	-	S26	0,0 (64)	0(64)	9,37 (64)	0(64)
-	-	-	-	-	S25	0,0 (64)	0(64)	0,0 (64)	0(64)
Méd. C3	86,6		97,65			4,83		20,41	

Nota: ID – Identificação de colônias; AT (%) – Área de tratamento; AC (%) – Área de controle.

Ao compararmos a remoção entre estágios de vida nas faixas de horários observadas, a diferença da taxa de remoção entre larvas e pupas sacrificadas pode ser observada nos três experimentos (Figura 6), sendo essa diferença observada em 8 horas após o tratamento nos três experimentos, tendo ocorrido maior remoção em larvas ($p < 0,05$) (Figura 6).

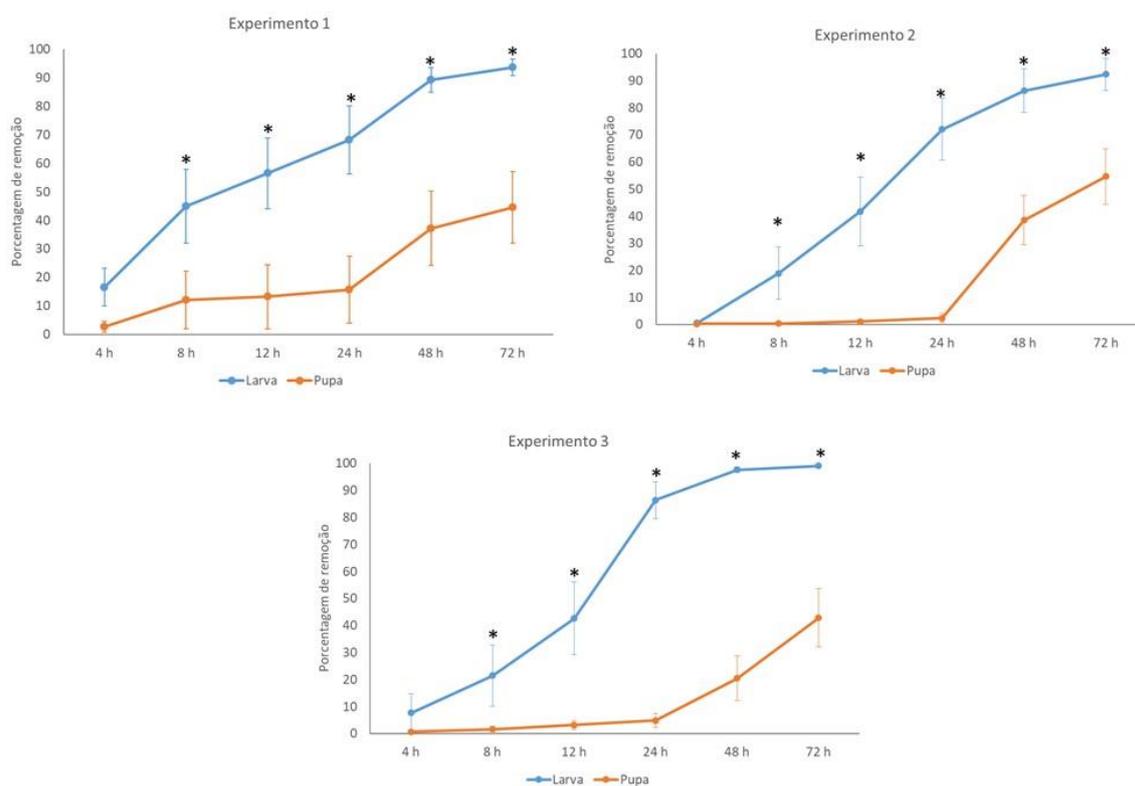


Figura 6- Porcentagem de remoção de larvas e pupas de *Scaptotrigona* aff. *postica* sacrificadas por perfuração em três experimentos (1 a 3).

Ao verificarmos a variabilidade dos dados (AS e AR) é possível constatar a relação das variáveis com o fenômeno do CH. Observamos que não existe diferença na variabilidade dos dados (AS e AR) relacionados com as variáveis meses do ano (Figura 7-A), ano (Figura 7-B), dia de coleta (Figura 7-C), hora (Figura 7-D) e doença (Figura 7-E). Em contrapartida, constatamos diferença na variável estágio de desenvolvimento (Figura 7-F).

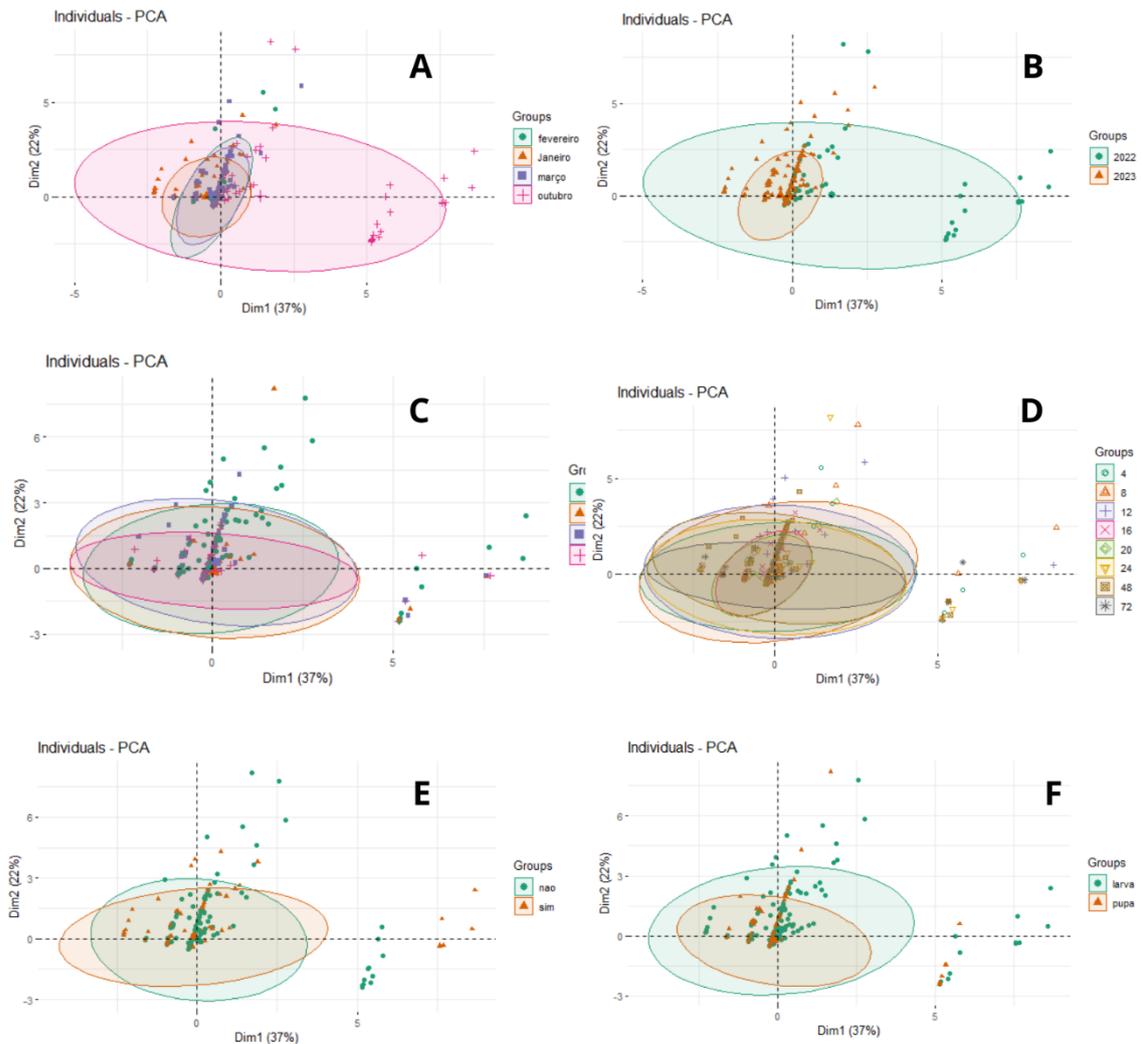


Figura 7- Análise da variabilidade dos dados em relação ao componentes principais do comportamento higiênico, sendo as variáveis meses do ano (A); ano (B); dia de coleta (C); hora (D); doença (E) e estágio de desenvolvimento larval (F).

Ao analisarmos as colônias individualmente quanto à expressão do CH, observamos diferenças na capacidade de remoção das crias sacrificadas (Tabela 3, Figura 8). Quando as larvas foram sacrificadas, o CH já era bastante expressivo em 24h. Com algumas colônias removeram 100% das crias sacrificadas (colônias S02 e S21), e 28 colônias (64,5%) apresentaram CH acima de 80%. A partir dessa porcentagem de remoção ($\geq 80\%$) em 24h de larvas sacrificadas de *A. mellifera*, a colônia é considerada higiênica (Gramacho et al. 1999). No entanto, algumas colônias apresentaram uma taxa de remoção muito baixa em 24h, conforme pôde ser observado principalmente nos experimentos 1 e 2 (Tabela 3, Figura 8). A maior parte dessas colônias com baixa remoção em 24h, teve em período maior de observação (48h e 72h) um aumento considerável na taxa de remoção (Figura 8).

Com relação à taxa de remoção de pupas sacrificadas, também observamos variação entre colônias (Tabela 3, Figura 8). Em 24h apenas uma colônia (S02) apresentou remoção de 96% das pupas sacrificadas, sendo 45,7% das colônias (n=35) com nenhuma pupa removida. Essa deficiência de remoção é superada em 48h e 72h (Figura 8). No entanto, somente três colônias (S02 em C1, S26 em C2, e S14 em C3) apresentaram remoção acima de 95% após 48h. Além disso, a maior parte das colônias, mesmo após 72h, não apresentaram taxa de remoção acima de 50% (Figura 8).

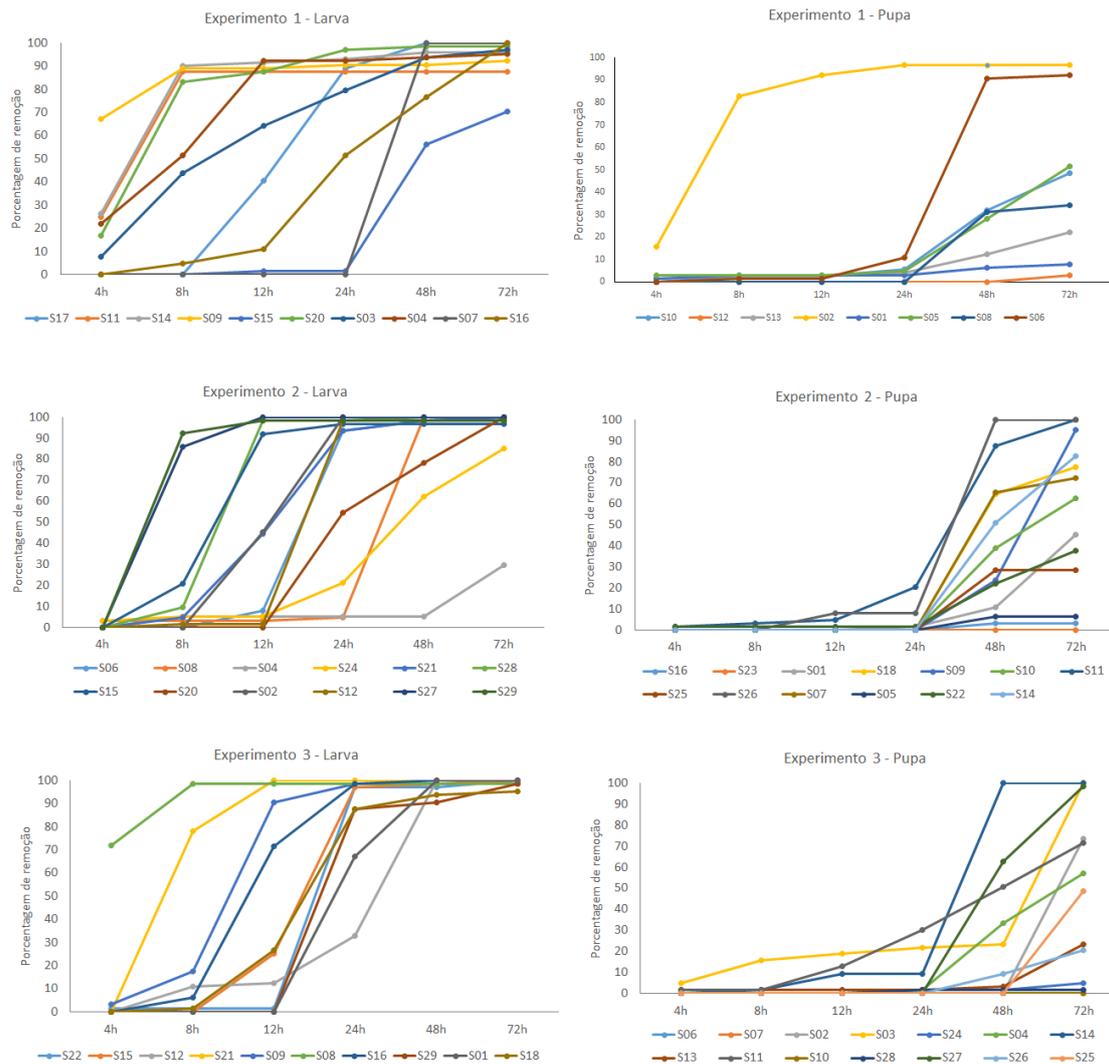


Figura 8- Variação do percentual de remoção de larvas ou pupas de *Scaptotrigona aff. postica* entre colônias distintas nos experimentos 1, 2 e 3.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho constatamos a presença do comportamento higiênico como mecanismo de defesa na abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. postica*. Observamos que o processo de detecção e remoção realizado por operárias se expressou de forma diferente para a espécie nos estágios de larva e pupa. Em 24 horas, a taxa média de remoção em larvas sacrificadas foi de 75,65% ($\pm 9,67$) enquanto para pupa a média de remoção foi cerca de 10 vezes menor que removeu 7,63% ($\pm 7,06$). Em 48h, foram removidas 91,08% ($\pm 5,87\%$) de larvas e 32,06% ($\pm 10,11\%$) de pupas sacrificadas. Esse resultado com larvas é similar ao observado em *A. mellifera*, em que larvas sacrificadas apresentaram, após

48h, um percentual de remoção acima de 95% em colônias selecionadas como higiênicas (Spivak e Downey 1998).

É perceptível a variação da eficiência do comportamento higiênico entre o vasto número de espécies dentro das abelhas sem ferrão. Apesar disso, algumas espécies se assemelham ao esperado para as abelhas selecionadas higiênicas em *A. mellifera* apresentando um percentual de remoção acima de 95% em até 48 horas (Spivak e Downey 1998). Nesse sentido, em 48 horas espécies como *Pebleia remota*, *S. pectorallis* e *M. scutellaris* expressaram acima de 95% de remoção similar as colônias selecionadas higiênicas em abelhas melíferas, muito embora nesse grupo de abelhas o sacrifício sempre acontece em pupas, via de regra de olho rosa (de aproximadamente 14 dias) (Toufailia et al. 2016; Medina et al. 2009; Nunes- Silva et al. 2009). Em nosso experimento, *S. aff. postica* em algumas colônias com o estágio de vida em larvas sacrificadas apresentou uma máxima de remoção de 100% nesta mesma faixa de horário. Em contrapartida, outras espécies de abelha sem ferrão apresentam uma maior velocidade de limpeza de crias mortas, como é o caso de *Tetragonula carbonaria* que em 10 horas removeu 100% das células sacrificadas e *Tetragonula hockingsi* que esse percentual de remoção total foi atingido em 20 horas (Le Gross et al. 2022). Enquanto isso, outras espécies apresentaram um percentual de remoção menor em 48 horas como *S. depillis* com uma média de remoção de 79,5%, *T. angustula* com a média de remoção de 62% da cria morta e operárias de *Scaptotrigona bipunctata* removeram uma média de 59,14% na mesma faixa de horário (Toufailia et al. 2016; Wielewski 2018). Para a remoção de pupas sacrificadas em *S. aff. postica* encontramos operárias removendo em média 30% em 48 horas sendo bastante similar para *M. q. anthidioides* que removeu 34% de pupas na mesma faixa de horário (De Jesus et al. 2017). Em 72 horas, em outro estudo *M. anthidioides* expressou uma média de remoção de 70% da cria sacrificada e em *T. angustula* esse percentual foi de 60% na mesma faixa de horário sob as mesmas condições experimentais (Tenório 1996). Na espécie *Pebleia lucii* todo o processo de limpeza desde a perfuração por operárias da primeira célula de cria até o momento da remoção total da larva morta durou uma média de $55,6 \pm 33,8$ horas (Gava 2016). Assim, fica nítido a variação na expressão do comportamento higiênico entre espécies no grupo das abelhas sem ferrão e muitos fatores podem influenciar diretamente essa diversidade, existindo assim uma certa variação das estratégias comportamentais entre as espécies dependendo da necessidade de manutenção de sua saúde no habitat onde está inserida, ou seja, espécies que estão

mais suscetíveis a pressões (patógenos, pesticidas) provavelmente vão expressar maiores níveis de remoção com base no CH (Le Gross et al. 2022). Além disso, as populações manejadas de abelhas sem ferrão que até o momento tiveram o seu CH mensurado não passaram por um protocolo prévio de seleção genética, nem foram testadas de forma padronizada, em momentos específicos quanto às condições ambientais no que se refere ao fluxo de alimento na natureza, por exemplo. Estes aspectos influenciam o CH, dentre outras condições influenciando diretamente na variação da expressão deste comportamento interespecies (Uzunov et al. 2014; Büchler et al 2014; Bueno 2021). Os programas de melhoramento genético relacionados ao comportamento higiênico ainda são iniciativas iniciais dentro da meliponicultura como foi um dia o cenário da apicultura (Bueno 2021).

Os nossos resultados evidenciam que o estágio de vida dos indivíduos sacrificados influencia diretamente na capacidade de detecção e limpeza pelas operárias. Em *A. mellifera*, alguns fatores químicos e físicos influenciam diretamente a detecção de cria morta ou doente por operárias como os odores exalados pela larva morta, a ausência de vibração e temperatura dentro da célula quando a cria está viva (Gramacho e Gonçalves 2000). Nessa espécie, colônias consideradas higiênicas possuem uma maior sensibilidade olfativa, influenciando diretamente na detecção, desoperculação e remoção da cria morta através do comportamento higiênico (Gramacho e Spivak 2003). Assim, operárias de *S. aff. postica* envolvidas no comportamento higiênico podem ser mais sensíveis aos sinais olfativos emitidos pelas larvas sacrificadas em relação às pupas, refletindo em uma maior velocidade de remoção neste estágio de vida. Nesse cenário, acredita-se que para espécies de abelhas sem ferrão o sistema de receptores olfativos tenha um nível de complexidade similar à abelha *Apis*, pois operárias conseguiram detectar e identificar mudanças químicas em decorrência do processo de decomposição da larva morta em relação à pupa, tanto em condições experimentais como por infecção de patógenos e doenças, servindo para a indução do CH (Ramirez et al. 2023; Roubik 2023; Evans e Shutler 2023).

Nas abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* também foi observado que em colônias submetidas ao teste do CH nos diferentes estágios de vida, as operárias removeram mais larvas mortas do que pupas das células de cria, dentro de 48 horas (De Jesus et al. 2017). Essa diferença foi associada à constituição do tegumento das crias, onde operárias possuíam mais facilidade de remoção em larvas pela característica do seu corpo mole e seria mais fácil de serem retiradas de dentro da célula de cria (De Jesus et

al. 2017). Como o tegumento da pupa é mais complexo e esclerotizado (Landim 2009), resulta em uma maior dificuldade na remoção pelas operárias que realizam limpeza na área de cria. Além disso, no estágio de desenvolvimento larval a manipulação é mais fácil, devido a parede das células serem mais maleáveis pela ausência do casulo desenvolvido na fase de pupa (Tenório 1996). Em *M. quadrifasciata* foi observado que uma única operária removia facilmente a larva morta de dentro da célula de cria, enquanto para remoção de pupas, mais de uma operária estava envolvida no processo de limpeza que era realizado apenas depois de dilacerar o corpo da pupa (De Jesus et al. 2017). Em observações secundárias em nosso experimento, também foi possível visualizar esse comportamento, na remoção de pupas mortas uma operária dava início à limpeza, mas depois de um tempo outras operárias auxiliavam o processo de remoção (Material Suplementar - Video 03).

Os resultados mostraram uma diferença na remoção a partir de 8 horas entre estágios de desenvolvimentos em todos os experimentos. As operárias removeram média geral nos três experimentos igual a 28,47% ($\pm 14,38$) de larvas sacrificadas, enquanto a remoção de pupas sacrificadas foi muito abaixo desse valor 4,65% ($\pm 6,41$), nos três experimentos. Este resultado corroborou a maior habilidade em que as operárias possuem em detectar e remover a cria em estágio de larva (REF). Esta tendência se manteve na remoção se manteve até às 48 horas onde em larvas sacrificadas a média de remoção chegou a 89,29% ($\pm 13,57$) e em pupas sacrificadas as operárias removeram em média 37,20% ($\pm 36,86$), sendo que uma notável parte das colônias não apresentou uma remoção total dos indivíduos sacrificados até o final das nossas observações. Todavia, a maioria das colônias de larvas sacrificadas atingiu uma média de remoção acima de ($> 80\%$) a partir de 48 horas enquanto que considerando-se as pupas sacrificadas a maior parte das colônias atingiu uma média de remoção acima de ($> 40\%$) apenas em 72 horas de observação. Essas percentagens de remoção se assemelham a *M. q. anthidioides* que, em 48 horas, apresentou uma média de remoção de 75% em larvas e de 15% em pupas, sendo que a remoção total aconteceu em 2,9 dias para larvas e de 5,02 dias para pupas (De Jesus et al. 2017).

Nós também observamos que em algumas colônias com larvas sacrificadas, as operárias exercem o comportamento de ao limparem as células de cria, deixarem sobre o disco de cria a larva morta removida. Com o tempo, esta larva escurece e resseca (Figura 6). Esse comportamento já havia sido descrito em *Melipona scutellaris*, onde foi

constatado que as operárias, em vez de retirarem a cria mortas com aparência de indivíduos mal desenvolvidos das células, e jogarem para fora da colônia, deixavam sobre os discos de cria (Nogueira-Neto 1997). Além disso, esse comportamento se assemelha a um dos sinais clínicos de doenças de cria observado em espécies de abelhas sem ferrão, onde operárias ao realizar a limpeza deixam sobre os discos de crias as larvas mortas com coloração escura, cujo comportamento, no entanto, não é compatível com eliminação do foco da doença, permitindo decomposição e proliferação de microorganismos indesejáveis no interior da colônia (Teixeira et al. 2020).

Ao observarmos o comportamento higiênico entre colônias percebemos uma variação no percentual de remoção dos indivíduos sacrificados. Assim, conseguimos visualizar picos de remoção em determinadas faixas de horários, onde em colônias com larvas sacrificadas foi perceptível que a atividade de remoção foi maior nas primeiras faixas de horário de observação (4, 8, 12 e 24 horas) enquanto nas colônias de pupas sacrificadas essa atividade de remoção foi maior nas últimas faixas de horário de observação (24, 48 e 72 horas) (Figura 7). A variação de remoção entre colônias foi observada em espécies de abelhas sem ferrão como em *M. q. anthidioides*, *T. carbonaria* e *S. bipunctata* e em outras espécies dentro de gênero *Apis*, chegando a ter uma variação de remoção 0 a 100 % em *A. mellifera* (Gramacho 1998; Rasolofoarivao et al. 2015; De Jesus et al. 2017; Wielewski 2018; Le Gross et al. 2022). É importante ressaltar que este trabalho foi realizado em um grupo de colônias não selecionadas geneticamente, então, essa variação possivelmente é influenciada pelo traço genético responsável pela expressão do comportamento higiênico naturalmente apresentado por cada colônia (Rothenbuhler 1964 a, b).

Ao observar o percentual de remoção acumulado nas mesmas faixas de horário, entre meses, não constatamos diferença estatística na expressão do CH. Em contrapartida, uma série de estudos constataram que a expressão do CH além de está associado a genética dos enxames é altamente influenciado por fatores bióticos (Uzunov et al. 2014; Büchler et al 2014). Dessa forma, os efeitos climáticos do ambiente podem influenciar diretamente no desenvolvimento e dinâmica da colônia o que reflete diretamente na realização do CH pelas operárias (Hatjina et al. 2014; Büchler et al 2014). Além disso, fatores como a disponibilidade e o fluxo de recursos no ambiente (néctar e pólen) também estão associados à expressão do CH (Spivak e Gilliam 1998; Johnson 2003). Realizamos os experimentos em períodos climáticos distintos, C1 foi realizado em outubro (período

menos chuvoso) enquanto C2 e C3 foram realizados em janeiro e fevereiro, respectivamente (período mais chuvoso) e mesmo assim não detectamos diferença estatística na expressão do CH entre os meses. Em outros estudos o período em que o teste do CH foi realizado influenciou diretamente no percentual de remoção dos indivíduos mortos entre colônias (Panasiuk et al. 2009; Güler e Toy 2013).

A variação do percentual de remoção entre espécies confirma a variedade do comportamento higiênico já observado dentro dos meliponíneos. Como o grupo das abelhas sem ferrão é tão diverso de espécies e comportamentos, a necessidade de se conhecer aspectos e estratégias desenvolvidas por essas abelhas se torna cada vez mais urgente, uma vez que influenciam. Com base em nossos resultados concluímos que a operárias de *S. aff. postica* possuem uma maior facilidade de remoção quando a cria morta se encontra em estágio larval influenciando diretamente na imunidade social da espécie (Cremer et al. 2007). Além disso, constatamos variação nas taxas de remoção do CH entre colônias, corroborando com a constatação de que esse é um comportamento fortemente influenciado por traços genéticos e ambientais (Rothenbuhler 1964 a,b; Uzunov et al. 2014). Assim, a pesquisa ora desenvolvida fornece informações importantes acerca do CH na espécie que podem auxiliar em programas de melhoramento genético das populações manejadas de interesse socioeconômico na meliponicultura.

Agradecimentos

Agradecemos a parceria e colaboração à Embrapa Amazônia Oriental pelo fornecimento de colônias dos projetos no. 20.21.10.014.00.00 e no. 16.17.01.004.00.00. Aos colaboradores Marta S., Lucas B., João M., Elder S., Bárbara L. pelo auxílio no manejo das colônias e coletas de campo. O presente trabalho foi realizado com apoio de bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Com apoio financeiro da CAPES e FAPEMIG. As coletas foram realizadas sob licença SISGEN no. A9C5291.

REFERÊNCIAS

- Anderson DL, Sedgley M, Short JRT, Allwood AJ. Insect pollination of mango in northern Australia. *Aust. J. Agric. Res.* [Internet]. 1982;33(3):541. Available from: <http://dx.doi.org/10.1071/ar9820541>
- Büchler R, Costa C, Hatjina F, Andonov S, Meixner MD, Conte YL, et al. The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. *J. Apic. Res.* [Internet]. 2014;53(2):205–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.3896/ibra.1.53.2.03>
- Cremer S. Social immunity in insects. *Curr. Biol.* [Internet]. 2019;29(11):R458–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.035>
- Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P. Social immunity. *Curr. Biol.* [Internet]. 2007;17(16):R693–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>
- Drum NH, Rothenbuhler WC. Differences in non-stinging aggressive responses of worker honeybees to diseased and healthy bees in may and July. *J. Apic. Res.* [Internet]. 1985;24(3):184–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1985.11100669>
- Evans JD. Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2006;93(2):135–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.004>
- Evans JV, Shutler D. The importance of *Apis mellifera* olfaction to social immunity. *J. Apic. Res.* [Internet]. 2023;1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2023.2246233>
- Gava M (2016). Comportamento higiênico em *Plebeia lucii* Moure, 2004 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).
- Garcia Bulle Bueno F (2021). Native bees as alternative crop pollinators: Reproductive behaviour of *Tetragonula carbonaria* (Doctoral dissertation).
- Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, Cartolano EA Jr, Veiga AK, Imperatriz-Fonseca VL, et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*

- (Celle) [Internet]. 2015;46(2):209–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
- Ramirez WC, Thomas NKT, Muktar IJ, Riabinina O. The neuroecology of olfaction in bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* [Internet]. 2023;56(101018):101018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2023.101018>
- Gramacho KP, Gonçalves LS, Rosenkranz P, De Jong D. Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 1999;30(5):367–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19990502>
- Gramacho KP, Gonçalves LS. Descrição das etapas envolvidas no processo de limpeza de crias operculadas de operárias de *Apis mellifera*. *Anais.* 2000
- Gramacho KP, Spivak M. Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behav. Ecol. Sociobiol.* [Internet]. 2003;54(5):472–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-003-0643-y>
- Gros L, Makinson KS, Spooner-Hart JC. Hygienic behaviour in the Australian stingless bees *Tetragonula carbonaria* and *T. hockingsi*. *J Apic Res.* 2022;61:578–90.
- Gruter C. *Stingless bees: Their behaviour, ecology and evolution.* 1st ed. Cham, Switzerland: Springer Nature; 2020.
- Güler A, Toy H. Relationship between dead pupa removal and season and productivity of honey bee (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae) colonies. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* [Internet]. 2013;37:462–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.3906/vet-1205-48>
- Hatjina F, Costa C, Büchler R, Uzunov A, Drazic M, Filipi J, et al. Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. *J. Apic. Res.* [Internet]. 2014;53(2):233–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.3896/ibra.1.53.2.05>
- de Jesus JN, Chambó ED, da Silva Sodr  G, de Oliveira NTE, de Carvalho CAL. Hygienic behavior in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini). *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2017;48(4):504–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-017-0495-5>

- Johnson BR. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. Proc. Biol. Sci. [Internet]. 2003;270(1511):147–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2207>
- Jones RL, Rothenbuhler WC. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. II. Responses of two inbred lines to various amounts of cyanide-killed brood. Anim. Behav. [Internet]. 1964;12(4):584–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90083-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472(64)90083-1)
- Julian GE, Cahan S. Undertaking specialization in the desert leaf-cutter ant *Acromyrmex versicolor*. Anim. Behav. [Internet]. 1999;58(2):437–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/anbe.1999.1184>
- Landim C da C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. Editora UNESP; 2009.
- Lima Fv De O, Silvestre R, Balesieri J. Nest entrance types of stingless bees (Hymenoptera: Apidae sensu lato) in a Tropical Dry Forest of mid-Western Brazil. Sociobiology. 2013;60:421–8.
- Medina LM, Hart AG, Ratnieks FLW. Hygienic behavior in the stingless bees *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini). Genet. Mol. Res. [Internet]. 2009;8(2):571–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.4238/vol8-2kerr010>
- Michener CD. The social behavior of the bees. London, England: Harvard University Press; 1974.
- Newton D, Ostasiewski N, (1986). A simplified bioassay for behavioral resistance to American Foulbrood in Honey-Bees (*Apis-Mellifera* L). Am. Bee J. 126: 278–281.
- Nogueira-Neto P: Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. São Paulo, Editora Nogueirapis, 1997.
- Nunes-Silva P, Imperatriz-Fonseca VL, Gonçalves LS. Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). Genet. Mol. Res. [Internet]. 2009;8(2):649–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.4238/vol8-2kerr026>

- Park OW. Testing for resistance to American foulbrood in honeybees. *J. Econ. Entomol.* [Internet]. 1937;30(3):504–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/30.3.504>
- Panasiuk, B; Skowronek, W; Gerula, D (2009) Effect of period of the season and environmental conditions on rate of cleaning cells with dead brood. *Journal of Apicultural Science* 53(1): 95-103.
- Pedro SRM. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* [Internet]. 2014;61(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>
- Purkiss T, Lach L. Pathogen spillover from *Apis mellifera* to a stingless bee. *Proc. Biol. Sci.* [Internet]. 2019;286(1908):20191071. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.1071>
- Raffiudin R, Crozier RH. Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* [Internet]. 2007;43(2):543–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.013>
- Rasolofoaivao H, Delatte H, Raveloson Ravaomanarivo LH, Reynaud B, Clémencet J. Assessing hygienic behavior of *Apis mellifera* unicolor (Hymenoptera: Apidae), the endemic honey bee from Madagascar. *Genet. Mol. Res.* [Internet]. 2015;14(2):5879–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.june.1.5>
- Rothenbuhler WC. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Anim. Behav.* [Internet]. 1964;12(4):578–83. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472\(64\)90082-x](http://dx.doi.org/10.1016/0003-3472(64)90082-x)
- Roubik DW. Stingless bee (Apidae: Apinae: Meliponini) ecology. *Annu. Rev. Entomol.* [Internet]. 2023;68(1):231–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-120120-103938>
- SchmidHempel, P. 1998. Parasites in social insects (Vol. 60). Princeton University Press.
- Schmidhempel P. Parasite immune evasion: a momentous molecular war. *Trends Ecol. Evol.* [Internet]. 2008;23(6):318–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2008.02.011>

- Shanks JL, Haigh AM, Riegler M, Spooner-Hart RN. First confirmed report of a bacterial brood disease in stingless bees. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2017;144:7–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.004>
- Simone M, Evans JD, Spivak M. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution* [Internet]. 2009;63(11):3016–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00772.x>
- Slaa EJ, Sánchez Chaves LA, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2006;37(2):293–315. Available from: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2006022>
- Spivak M, Downey DL. Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* [Internet]. 1998;91(1):64–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/91.1.64>
- Stroeymeyt N, Grasse AV, Crespi A, Mersch DP, Cremer S, Keller L. Social network plasticity decreases disease transmission in a eusocial insect. *Science* [Internet]. 2018;362(6417):941–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aat4793>
- Tenório EG (1996). Comportamento higiênico em abelhas indígenas (*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 e *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811) e em abelhas africanizadas (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758).
- Teixeira ÉW, Ferreira EA, Luz CFP da, Martins MF, Ramos TA, Lourenço AP. European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2020;172(107357):107357. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2020.107357>
- Teixeira ÉW, de Paiva Daibert RM, Glatzl Júnior LA, da Silva MVGB, Alves MLTMF, Evans JD, et al. Transcriptomic analysis suggests candidate genes for hygienic behavior in African-derived *Apis mellifera* honeybees. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2021;52(2):447–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-020-00834-6>
- Toufaily A, Alves H, Bento DA, Marchini J, Ratnieks LC. Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. *Biol Open.* 2016;5:1712–8.

Uzunov A, Costa C, Panasiuk B, Meixner M, Kryger P, Hatjina F, et al. Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in a pan-European experiment. *J. Apic. Res.* [Internet]. 2014;53(2):248–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.3896/ibra.1.53.2.06>

Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* [Internet]. 2008;54(10–11):1392–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>

Wilewski P (2018). Identidade Taxonômica, notas Bionômicas e sobre o Comportamento Higiénico de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836),(Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

(Capítulo 2) Detecção molecular de patógenos associados a abelhas *Apis* em abelhas sem ferrão *Scaptotrigona aff. postica*, em açazais no Pará-Brasil

Autores: Yasmin G. Sousa¹, Raphaella O.N. Silveira¹, Jamille C. Veiga², Daniel S. Pereira³, Kamila L. Leão⁴, Anete P. Lourenço¹

Afiliação:

1-Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Campus JK, Alto da Jacuba, 39100-000, Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

2- Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável, Belém, Pará, Brazil.

3- Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brazil.

4- Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.

(Trabalho formatado para envio para Journal of Apicultural Research)

RESUMO

As abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) são importantes agentes polinizadores em regiões tropicais e subtropicais do planeta. As populações manejadas do grupo vêm sofrendo pressões como a fragmentação do habitat, uso indiscriminado de insumos agrícolas e doenças. Nos últimos anos os relatos de doenças de cria nas abelhas sem ferrão aumentaram. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de possíveis agentes patogênicos em colônias da espécie *Scaptotrigona* aff. *postica* em áreas de açazais localizados em diferentes municípios da Amazônia paraense. Muitas colônias nessas áreas apresentam área de cria falhada, larvas com aspecto ressecado e coloração escura, assemelhando-se a sinais clínicos de doenças de cria. Sabendo que a alimentação também pode ser um fator de ameaça para as abelhas, propiciando surgimento de doenças, analisamos a nutrição das colônias identificando os tipos polínicos presentes na dieta proteica. Para investigar possíveis patógenos comuns de *Apis mellifera* nessas abelhas, foram realizadas análises moleculares para a presença das bactérias *Melissococcus plutonius* e *Paenibacillus larvae*, e dos seis vírus mais comuns em colônias de abelhas (ABPV, BQCV, DWV, IAPV, KBV e CBPV). Houve amplificação por PCR de primers desenhados para *M. plutonius* em apenas 1 colônia e para *P. larvae* em 4 colônias. Amplificação por PCR também foi observada para o vírus BQCV, em três fases de desenvolvimento (larvas, pupas e adultos), enquanto que para ABPV, amplificação foi observada somente em adultos. Apesar de algumas abelhas recém-emergidas terem apresentado asas deformadas, o vírus DWV não foi molecularmente detectado. Todas as amplificações por PCR ainda necessitam de confirmação do patógeno por sequenciamento de DNA. Com relação ao espectro polínico, na maioria das colônias o pólen de açaí foi o mais frequente. Assim, concluímos que colônias manejadas ou em ninhos naturais de *S. aff. postica* parecem ser suscetíveis às infecções bacterianas e virais típicas de *Apis*. Além disso, a baixa diversidade e riqueza no espectro polínico das colônias investigadas em áreas de plantio pode ter influenciado diretamente na saúde dessas abelhas.

Palavras-chaves: Agentes patogênicos, Meliponini, Alimentação polínica, Doenças de cria

ABSTRACT

Stingless bees (Apidae: Meliponini) are important pollinators in tropical and subtropical regions of the planet. The group's managed populations have been suffering pressures such as habitat fragmentation, indiscriminate use of agricultural inputs and diseases. In recent years, reports of brood diseases in stingless bees have increased. The objective of this work was to investigate the presence of possible pathogenic agents in colonies of the species *Scaptrotigona* aff. *postica* in areas of açai groves located in different municipalities in the Amazon of Pará. Many colonies in these areas have a failed brood area, larvae with a dry appearance and dark color, resembling clinical signs of brood diseases. Knowing that food can also be a threat factor for bees, leading to the emergence of diseases, we analyzed the nutrition of colonies by identifying the pollen types present in the protein diet. To investigate possible common pathogens of *Apis mellifera* in these bees, molecular analyzes were carried out for the presence of the bacteria *Melissococcus plutonius* and *Paenibacillus larvae*, and the six most common viruses in bee colonies (ABPV, BQCV, DWV, IAPV, KBV and CBPV). There was PCR amplification of primers designed for *M. plutonius* in only 1 colony and for *P. larvae* in 4 colonies. Amplification by PCR was also observed for the BQCV virus, in three stages of development (larvae, pupae and adults), while for ABPV, amplification was observed only in adults. Although some newly emerged bees had deformed wings, the DWV virus was not molecularly detected. All PCR amplifications still require confirmation of the pathogen by DNA sequencing. Regarding the pollen spectrum, in most colonies açai pollen was the most frequent. Therefore, we conclude that managed colonies or natural nests of *S. aff. postica* appear to be susceptible to bacterial and viral infections typical of *Apis*. Furthermore, the low diversity and richness in the pollen spectrum of the colonies investigated in planting areas may have directly influenced the health of these bees.

Keywords: Pathogenic agents, Meliponini, Pollen feeding, Brood disease

1. INTRODUÇÃO

Atualmente vem se observando um crescente declínio populacional de colônias de abelhas (McMenamin e Flenniken, 2018; Yañez et al., 2020). Alguns fatores podem estar diretamente ligados a esse fenômeno como a perda do habitat natural, o aumento de ambientes estressores para as abelhas, o uso indiscriminado de agrotóxicos e a infecção por patógenos e infestação por parasitas (Pires et al., 2016; Potts et al., 2016).

As abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) são importantes polinizadores de diversas culturas da região Neotropical, tendo sua grande diversidade de espécies como visitantes florais de um vasto número de plantas de grande importância para a manutenção dos ecossistemas e da vida humana (Heard, 1999; Gianni et al., 2015). A criação e manejo de abelhas sem ferrão, conhecido como meliponicultura, vem crescendo no Brasil e no mundo, não só pela sua importância ambiental, também pela geração de renda e fortalecimento da segurança alimentar (Jaffé et al., 2015). Com a expansão da meliponicultura se faz necessário conhecer mais sobre os patógenos e doença que ocorrem neste grupo de abelhas (Nogueira-Neto 1997; Shanks et al., 2017; Purkiss e Lach, 2019; Teixeira et al., 2020; Toledo-Hernández et al., 2022).

Durante muito tempo se acreditou que não existia doenças e patógenos que acometiam as abelhas sem ferrão, devido às características de sua biologia, as quais inibiriam o processo de transmissão de doenças entre os integrantes da colônia ou de material contaminado. Uma característica dentro do grupo é o provisionamento de células, onde o indivíduo tem todo o seu desenvolvimento desde ovo até o nascimento dentro das células de cria fechada, sem contato externo. Além disso, as células de cria são desfeitas por operárias após a emergência da abelha adulta (Nogueira-Neto 1997; Toufaily et al., 2016; Grüter, 2020). Em contrapartida, a sobreposição de colônias manejadas de *Apis mellifera* e colônias de espécies dos meliponíneos ocasiona um compartilhamento de micro-organismos entre as espécies, principalmente, durante a coleta de recursos nas plantas (Purkiss e Lach, 2019; Alger et al., 2019).

Os relatos de doenças dentro do grupo das abelhas sem ferrão são crescentes. A bactéria gram positiva *Melissococcus plutonius*, causadora de uma doença de cria muito conhecida em *A. mellifera*, a cria pútrida européia (*European Foulbrood*: EFB), foi detectada em espécies do gênero *Melipona* no Brasil como agente patogênico (Teixeira et al., 2020). Além disso, outro tipo de bactéria, a *Lysinibacillus sphaericus*, também causadora de doença de cria, foi detectada na abelha sem ferrão australiana *Tetragonula carbonara* (Shanks et al., 2017). Esses agentes patogênicos infectam a cria, matando larvas e pupas, o que influencia diretamente na densidade populacional de indivíduos adultos das colônias, podendo levar estas ao colapso (Teixeira et al., 2020).

É comum que abelhas abriguem patógenos, como vírus e bactérias, sem demonstrar sinais visíveis de doença (Guimarães-Cestaro et al., 2020; Dias et al., 2023; Deutsch et al., 2023). Diversos são os fatores que podem influenciar esta condição, como a capacidade de resposta imunológica das abelhas, a ausência de fatores estressores, como pesticidas, e a nutrição (Di Pasquale et al., 2013; Castelli et al., 2020; Barascou et al., 2021). A alimentação pode desempenhar um papel importante na promoção da saúde dos polinizadores e na resistência a patógenos. Uma dieta polínica pouco diversa ou de baixa qualidade protéica pode deixar colônias de abelhas susceptíveis a doenças (Di Pasquale et al., 2013; Tritschler et al., 2017). A nutrição polínica, portanto, pode atuar em conjunto com outros fatores na redução da resistência das abelhas e agravar os efeitos de vírus, pesticidas ou parasitas, resultando eventualmente na perda de colônias (Huang, 2012).

A abelha sem ferrão *Scaptotrigona* aff. *postica*, popularmente conhecida como abelha canudo, ocorre em vários biomas do país e representa grande valor ecológico para as regiões onde está inserida (Da Luz et al., 2019). Colônias dessas abelhas apresentam uma grande densidade populacional, logo possuindo uma grande atividade ecossistêmica, com uma expressiva polinização e visitação floral em várias culturas de interesse socioeconômico (Campbell et al., 2018; Campbell et al., 2023). No estado do Pará, tem sido observado colônias de *S. aff. postica* presentes em açazais com características que podem ser sinais clínicos de doença na cria, tais como: i) a presença de discos de crias falhados e ii) larvas ressecadas com coloração escura encontradas pela área do disco sob células ainda operculadas (Shanks et al., 2017; Teixeira et al., 2020). Estas características se assemelham a outros relatos de doenças provocadas por patógenos em outras abelhas sem ferrão (Shanks et al., 2017; Teixeira et al., 2020). Assim, objetivamos investigar, por análise molecular, a possível presença de bactérias patogênicas comuns às abelhas,

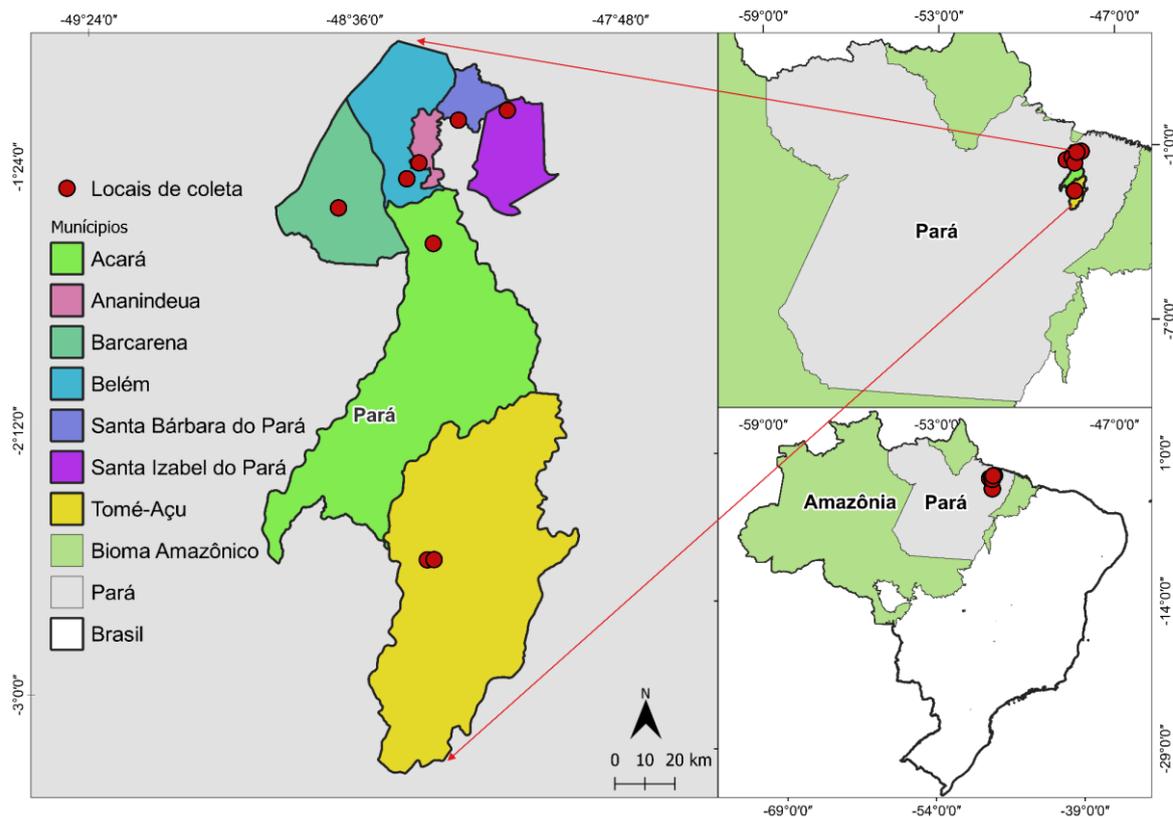
Melissococcus plutonius e *Paenibacillus larvae*, e também a presença dos seis vírus de abelhas mais comum no Brasil: *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Black queen cell virus* (BQCV), *Deformed wing virus* (DWV), *Israeli acute paralysis virus* (IAPV), *Kashmir bee virus* (KBV) e *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) em abelhas *S. aff. postica* de colônias em açazais. Por fim, realizamos análise palinológica do alimento dos potes de pólen das colônias com sinais clínicos de doença, para observar a possível influência da nutrição polínica no aparecimento de doenças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Colônias de *Scaptotrigona aff. postica*

As colônias de *Scaptotrigona aff. postica* utilizadas neste trabalho estavam inseridas em açazais de sete localidades no estado do Pará: Tomé-Açu (n= 10 colônias) (Lat.: -2,59075 e Log.: -48,38136111/ Lat.: -2,59008333 e Log.: -48,36116667), Barbacena (n=5) (Lat.: -1,524658 e Log.: -48,648936) , Acará (n=2) (Lat.: -1,632619 e Log.: -48,363472), Belém (n=5) (Lat.: -1,43653333 e Log.: -48,44319444), Ananindeua (n=2) (Lat.: -1,38838889 e Log.: 48,40666667), Santo Izabel do Pará (n=1) (Lat.: -1,22909 e Log.: -48,14078) , e Santa Bárbara do Pará (n=2) (Lat.: -1,25903 e Log.: -48,287971) (Figura 1; Tabela S1). As colônias sintomáticas apresentaram discos de crias falhadas, com larvas mortas removidas das células e deixadas sobre os discos, ou larvas escurecidas e pegajosas dentro das células (Figura 2 A-D).

O material biológico colhido (partes de disco de cria, contendo larva e pupa), ou mesmo in natura vivos (Tabela S1) foi enviado para o Laboratório de Estudos Integrados de Abelhas (LEIA), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina-MG, Brasil, para as análises moleculares. As larvas, pupas e adultos vivos foram separados para extração de RNA (Figura 3 A-E). Algumas fêmeas adultas recém-emergidas apresentaram asas deformadas (Figura 3F), e também foram separadas para análise molecular (PCR Multiplex).



Elaborado por: Fabrício Farias

Figura 1- Localização das colônias de *Scaptotrigona aff. postica* nas sete cidades indicadas na figura, no estado do Pará (Brasil), que apresentaram sinais clínicos de doenças, cujo material biológico (discos com larvas e pupas e pólen dos potes) foi coletado para análise.

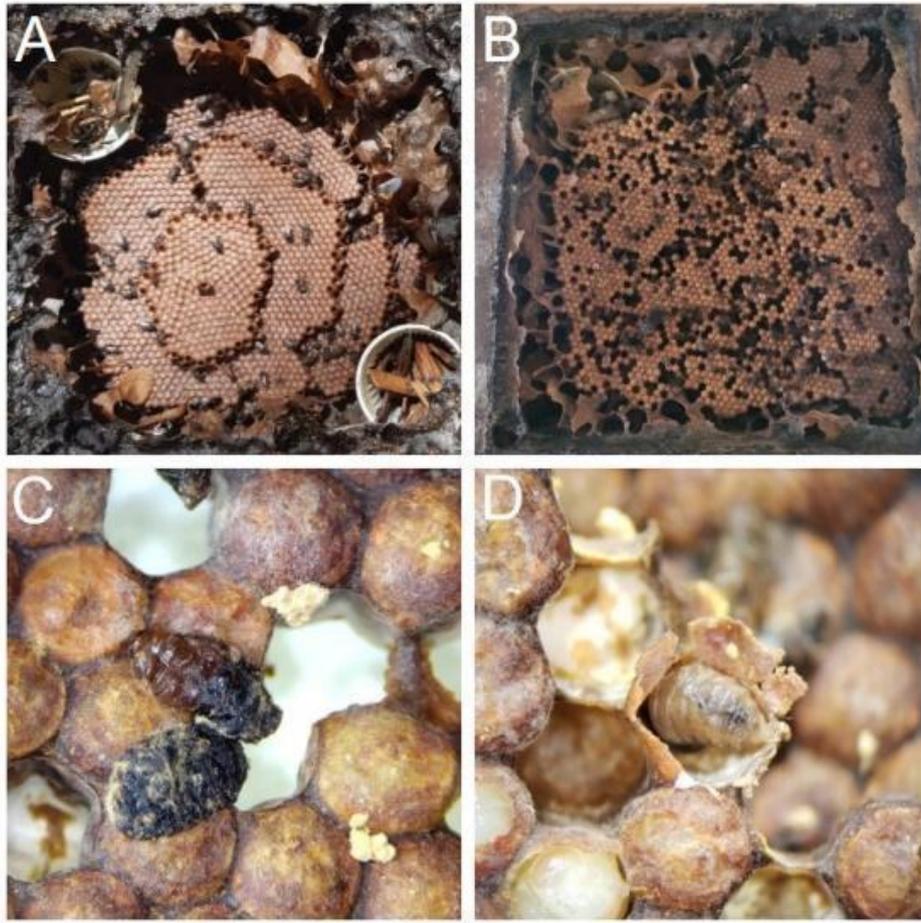


Figura 2- (A) Colônia sadia e (B) colônia com sinais de doença (disco de cria falhado) de *Scaptotrigona* aff. *postica*. Larvas escuras doentes largadas em cima dos discos (C) ou larvas escurecidas ainda dentro da célula de cria (D).



Figura 3- Indivíduos de *Scaptotrigona* aff. *postica* utilizados para detecção de vírus patógenos em abelhas. Da esquerda para direita: larva, pupa de olho branco (Pw), pupa de olho rosa (Pp), pupa de olho marrom (Pb), recém emergida (NE) e recém emergida com asa deformada (NEDW).

2.2- Extração de DNA e amplificação por PCR de DNA das bactérias *Melissococcus plutonius* e *Paenibacillus larvae*

O DNA genômico foi extraído de larvas, pupas e adultos (1 a 5 indivíduos) de *S. postica* utilizando-se o kit de Extração de DNA Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), seguindo-se a instrução do fabricante para extração de DNA de tecido animal. Após extração do DNA genômico foram feitas amplificações em PCRs distintas para as duas bactérias. Para as PCRs utilizamos primers para amplificação de um fragmento do DNA ribossomal 16S de *M. plutonius* e de um fragmento do DNA ribossomal 18S de *P. larvae* (Tabela 1), segundo descrito em Evans (2006), Teixeira et al. (2008) e Dias et al. (2023).

Para verificação de extração de DNA genômico, foi feita PCR utilizando primers (F:GACTGTCTCGAACGCAAGGAAG, R:TCAACACACCGGTTTCAACA) que amplificam 176 pb no cDNA e 373 pb de uma região genômica do fator de alongação 1 alpha em abelhas sem ferrão (Tabela 1; Freitas et al., 2020). A PCR foi feita usando as seguintes condições: 94 °C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 60 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg e extensão final de 72 °C por 7min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e fotografados sob luz ultravioleta. A confirmação das análises moleculares serão realizadas por sequenciamento de DNA das amplificações po PCR.

Tabela 1- Sequência dos primers para bactéria e vírus patógenos de abelha.

Patógeno	Tamanho o amplico n (pb)	Primer 5' → 3'	Condições de PCR
<i>Melissococcus plutonius</i>	27 2	F- ACGCCTTAGAGATAAGGTTTC R- GCTTAGCCTCGCGGTCTTGCGTC	94°C/5min; 40x 94°C/30seg, 60°C/30seg,72°C/40seg; 72°C/7min
<i>Paenibacillus larvae</i>	11 3	F-TTCACGGCTAACAAAATTAAACA R- TTCGCAGAAGTTCCGGTTAC	
DWV	12 9	F- GAGATTGAAGCGCATGAACA R- TGAATTCAGTGTGCCCCATA	
ABPV	50 0	F- TCTGATGATGCTGAAGAGAGAAA R- ATTCATCATTGCCGGCTCTA	94°C/5min; 40x 94°C/40seg, 54°C/40seg,72°C/40seg; 72°C/7min
BQCV	70 0	F- TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC R- GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	

IAPV	45 7	F- GCGGAGAATATAAGGCTCAG R- CTTGCAAGATAAGAAAGGGGG
KBV	41 5	F- GATGAACGTCGACCTATTGAA R- TGTGGGTTGGCTATGAGTTCA
CBPV	45 5	F- AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG R- TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG

2.3- Extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação por PCR de cDNA de vírus

As larvas, pupas e abelhas adultas foram colocadas inteiras individualmente em 500 µL de Trizol® (Invitrogen) para extração de RNA total de acordo com instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I Amp Grade (Invitrogen) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico. O cDNA foi sintetizado utilizando-se SuperScript™ III (Invitrogen), aproximadamente 5 µg de RNA total e oligo(dT)₂₀.

Para a detecção de vírus PCR foi realizada com primers específicos para os seis vírus ABPV, BQCV, DWV, IAPV, KBV e CBPV (Tabela 1). BQCV e ABPV foram investigados por PCR duplex; IAPV e KBV foram investigados usando outra PCR duplex; e DWV e CBPV foram investigados usando PCR simples (Teixeira et al., 2008, 2020). As amplificações por PCR foram realizadas usando Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Ampliqon), seguindo as condições: 94°C/5min; 40x 94°C/40seg, 54°C/40seg, 72°C/40seg; 72°C/7min . Os controles positivos eram DNA de *A. mellifera* infectado com cada vírus oriundos do Bee Research Laboratory - USDA (Beltsville, MD) fornecidos pelo LASA/IB/APTA-SAA,SP. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com SYBR(™) Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) e fotografados sob luz ultravioleta.

2.4- Análise da alimentação polínica

As amostras de pólen foram coletadas nas mesmas colônias utilizadas para a realização de identificação de patógenos (Tabela S1). O pólen foi coletado diretamente dentro dos potes de alimento da colônia (Figura 4). Para isso, com o auxílio de um canudo plástico, utilizando uma secção (cerca de 4 cm) que foi pressionada contra de 1 a 3 potes

de pólen encontrados na colônia, obteve-se um perfil da massa de pólen que é coletada pelas abelhas para o posterior processo de acetólise (Frias et al., 2016). Assim, após a coleta, as amostras foram armazenadas em tubos cônicos, tipo Falcon, e refrigeradas para posterior análise polínica no laboratório LEIA.



Figura 4- Metodologia realizada para coleta de amostras de pólen nos potes de alimento em colônias de *Scaptotrigona aff. postica*

Para conseguirmos visualizar a variedade dos grãos de pólen, as amostras foram submetidas a um processo de acetólise seguindo um método de extração dos grãos e posterior observação para identificação dos tipos polínicos (Erdtman, 1960). Após o processo de acetólise foram preparadas duas lâminas com gelatina glicerinada para a visualização dos grãos de pólen no microscópio. Para analisarmos o pólen de uma forma quantitativa, constatamos a abundância dos grãos contando um número mínimo, de grãos de pólen (600 a 900 grãos) nas duas lâminas de cada amostra. Assim, conseguimos identificar os tipos polínicos e também a abundância destes em cada amostra.

3. RESULTADOS

3.1- Detecção de *Melissococcus plutonius* e *Paenibacillus larvae* por meio de análise molecular

Para investigar a suspeita de *M. plutonius* e *P. larvae* foram utilizados primers específicos em amostras de DNA genômico extraídos de pupas de *S. aff. postica*. As PCRs mostraram a possibilidade da presença de *M. plutonius* apenas em uma colônia de Barcarena (Figura 5A). Enquanto que amplificação com primers para *P. larvae* foi observada em quatro colônias, duas em Belém (Embrapa), uma em Barcarena e uma em Santa Bárbara do Pará (Figura 5B). A checagem de qualidade do DNA genômico foi feita com amplificação de um trecho do gene *ef1-alfa* de abelha, e obtivemos como resultado a amplificação de quase todas as amostras, exceto as amostras 9 (ST29 TA) e 23 (C1 LS1) (Figura 5C). Deste modo, estas colônias foram desconsideradas para a detecção de bactérias patogênicas.

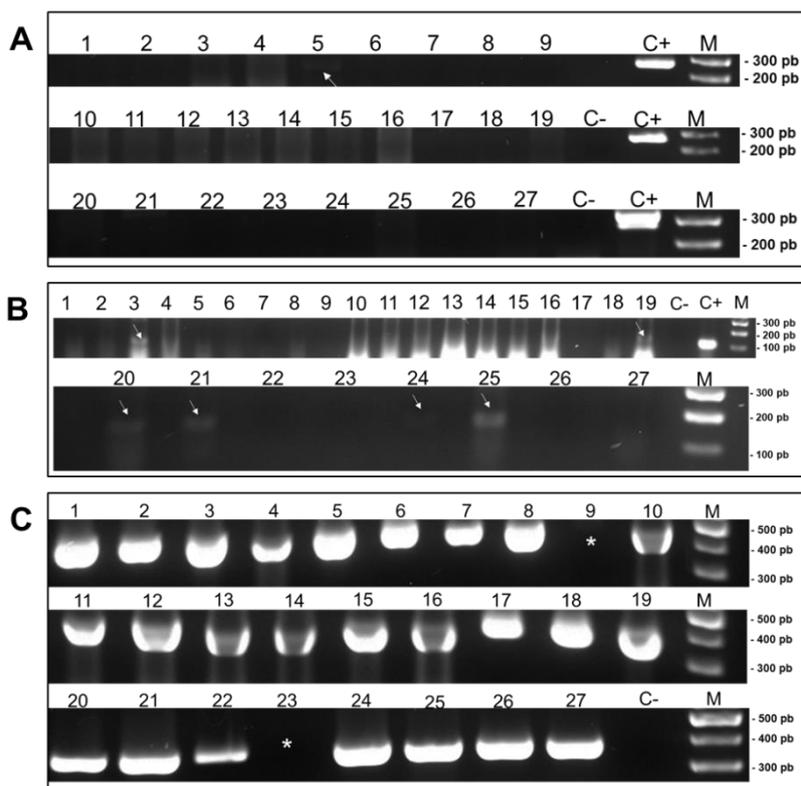


Figura 5- PCR para detecção de (A) *Melissococcus plutonius* e (B) *Paenibacillus larvae* em pupas de *Scaptotrigona aff. postica*. O gene *ef1-alfa* foi utilizado como controle interno de qualidade do DNA genômico (C). A correspondência das colônias com relação ao número das amostras encontra-se na Tabela S1. C+: Controle positivo; C-: Controle negativo; M: Marcador de peso molecular. * amostras retiradas das análises pois *ef1-alfa* não amplificou.

3.2- Detecção de vírus por análise molecular

As amostras utilizadas para detecção de vírus foram provenientes de duas colônias de Belém (Embrapa; C1 e S23). Bandas de tamanhos esperados para BQCV e ABPV foram amplificadas por PCR em duas colônias, sendo que primers para BQCV apresentaram amplificação nas amostras de larvas, pupas e adultos enquanto que para ABPV, apenas nas amostras de adultos (Figura 6A). Nenhuma amplificação para os vírus IAPV, KBV e DWV foi observada nas amostras analisadas (Figuras 6B e 6D). Vale ressaltar que nem mesmo nas abelhas recém emergidas com asas deformadas foi detectado o DWV. Foi amplificada uma banda esperada para CBPV somente na amostra c5 (adulto recém emergido da colônia C1) (Figura 6C). A análise de qualidade do cDNA indicou que todas as amostras se apresentaram adequadas para detecção dos vírus (Figura 6E).

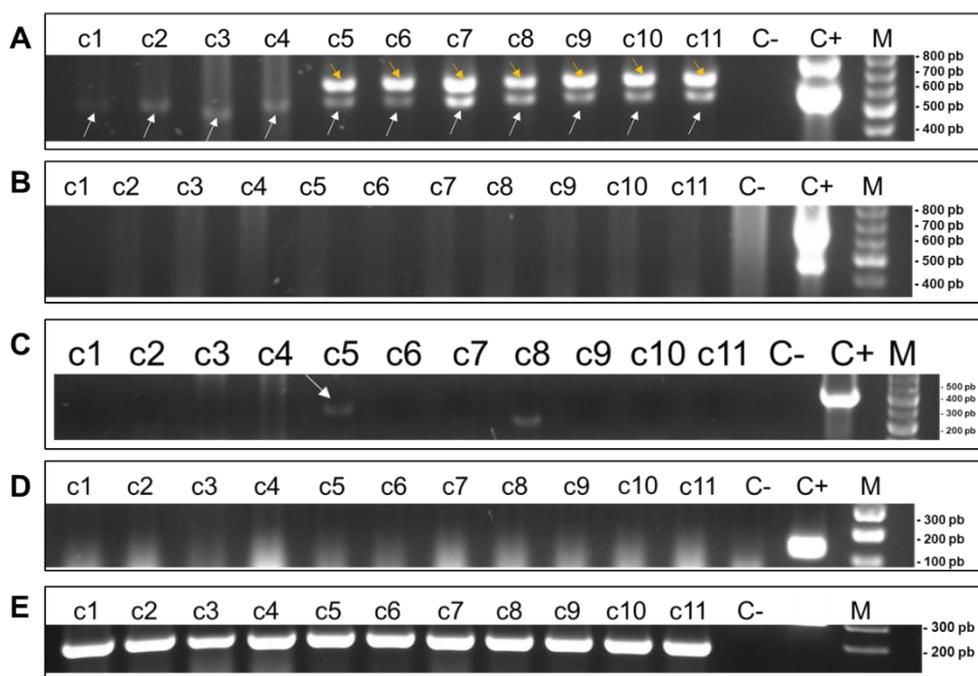


Figura 6- PCR para detecção de (A) BQCV e ABPV, (B) IAPV e KBV, (C) CBPV e (D) DWV em larvas, pupas e adultos de *Scaptotrigona aff. postica*. O gene *ef1-alfa* foi utilizado como controle interno de qualidade do cDNA (E). A correspondência das colônias com relação ao número das amostras encontra-se na Tabela S2. C+: Controle positivo; C-: Controle negativo; M: Marcador de peso molecular. Em (A) setas amarelas indicam BQCV e setas brancas ABPV.

3.3- Espectro polínico dos potes de pólen de colônias da abelha sem ferrão *S. aff. postica* em açazais da Amazônia paraense

Entre as 28 amostras coletadas em diferentes meliponários localizados em açazais foram encontrados 13 diferentes tipos polínicos, pertencentes a oito famílias botânicas: Myrtaceae, Arecaceae, Fabaceae, Verbenaceae, Anacardiaceae, Melastomataceae, Malpighiaceae e Asteraceae (Figura 7 e 8). Com relação ao tipo polínico mais frequente, a família Arecaceae representada pelo tipo polínico do açaí (*Euterpe oleraceae*) foi o mais abundante na maior parte das amostras (Figura 8C). Na maioria das amostras (54%), este tipo polínico representou mais de 50% dos tipos encontrados, e destas, nove amostras (32%) apresentaram mais de 80% deste tipo. Com relação à riqueza, as amostras tiveram uma média de 5 tipos polínicos, variando de 3 a 8 tipos (Tabela 2).

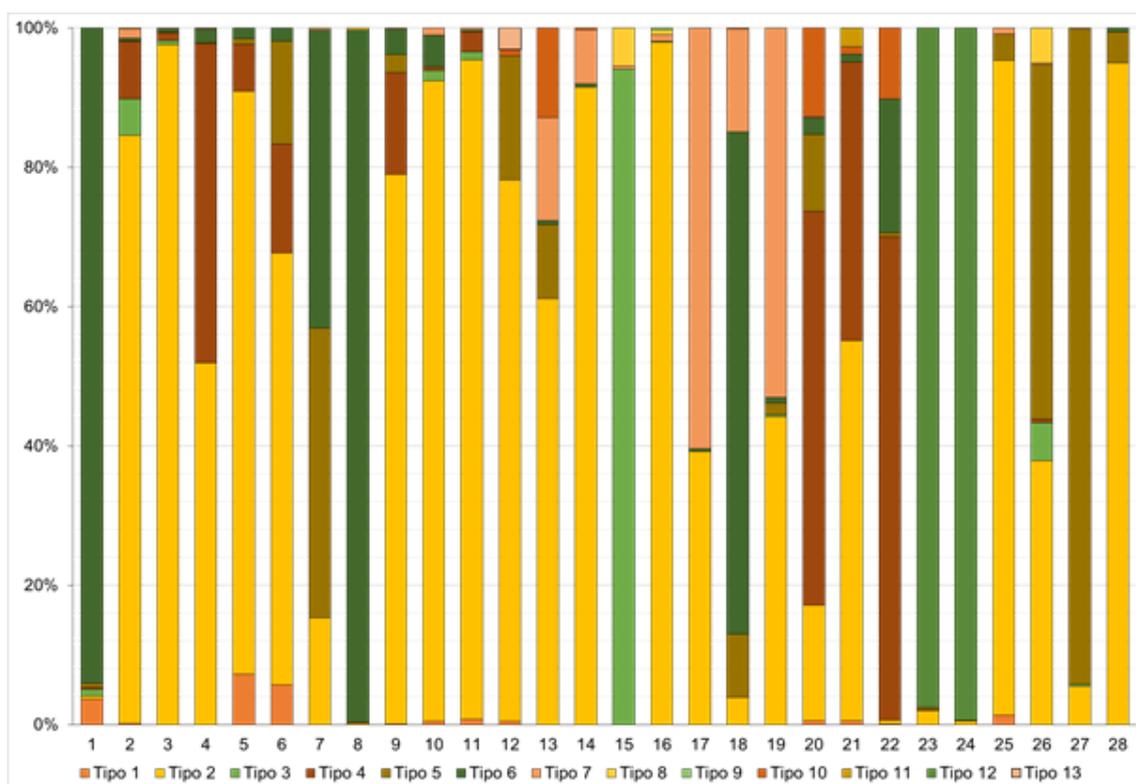


Figura 7 - Quantidade e frequência dos tipos polínicos encontrados em amostras analisadas de colônias de *Scaptotrigona* aff. *postica* localizadas em açazais da Amazônia paraense.

Nota: T1 – Myrtaceae; T2 – Arecaceae/*Euterpe oleraceae*; T3 – Fabaceae- Mimosidea; T4- Fabaceae – *Mimosa*; T5- Verbenaceae; T6- Fabaceae – *Dicorynia*; T7- Fabaceae- Mimosidea/ *Stryphnodendron guianense*; T8- Anacardiaceae – *Tapirira guianensis*; T9- Malpighiaceae; T10- Melastomataceae- *Miconia*; T11 – Asteraceae; T12- Myrtaceae; T13- Não identificado.

Tabela 2– Porcentagem de cada tipo polínico (T1 a T13) nas amostras de pólen dos potes de colônias de *Scaptotrigona aff. postica* em diversas localidades do Pará.

Locais	Amostras por local	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
Tomé - Açú	1	3,66	0,42	0,98	0,28	0,56	94,08							
	2	0,16	84,42	5,24	8,19	0,16	0,32	1,31				0,16		
	3		97,58	0,56	1,13	0,14	0,42	0,14						
	4		51,9		45,8	0,15	1,98				0,15			
	5	7,25	83,67		6,73	0,77	1,55							
	6	5,7	61,96		15,68	14,73	1,9							
	7		15,31			41,65	42,72	0,3						
	8		0,15		0,15		99,37		0,31					
	9	0,15	78,84		14,61	2,58	3,65	0,15						
	10	0,49	91,91	1,48	0,49		4,62	0,99						
	11	0,73	94,68	1,18	2,8		0,29	0,29						
		12	0,48	77,7			17,77					0,96		3,06
Barcarena	13		61,13			10,67	0,52	14,75			12,91			
	14		91,49				0,48	7,7			0,32			
	15			94,1				0,45	5,43					
	16		97,92				0,15	0,95	0,63	0,31				
	17		39,18				0,47	60,34						
Acará	18		3,88			9,11	72,04	14,79			0,14			
	19		44,16	0,33		1,66	0,83	53						
Belém	20	0,57	16,59		56,5	11,01	2,43	0,14			12,73			
	21	0,54	54,56		40	1,08				1,08	2,71			
	22	0,15	0,46		69,39	0,61	19,16				10,2			
Ananindeua	23		2,01		0,15	0,31							97,51	
	24		0,46			0,15							99,38	
Santa Izabel do Pará	25	1,35	93,95			3,77		0,9						
Santa Bárbara do	26		37,85	5,49	0,51	50,89		0,25	4,98					

Pará	27	5,5	0,27	94,07	0,13
	28	94,97		4,46	0,55

Nota: T1 – Myrtaceae; T2 – Arecaceae; T3 – Fabaceae- *Mimosidea*; T4- Fabaceae – *Mimosa*; T5- Verbenaceae; T6- Fabaceae – *Dicorynia*; T7- Fabaceae- *Mimosidea/ Stryphnodendron guianense*; T8- Anacardiaceae – *Tapirira guianensis*; T9- Malpighiaceae; T10- Melastomataceae- *Miconia*; T11 – Asteraceae; T12- Myrtaceae; T13- Não identificado.



Figura 8 – Grãos de pólen referentes às famílias, gêneros e espécies botânicas identificados em colônias de *Scaptotrigona* aff. *postica*. A-B: Myrtaceae, C: Arecaceae- *Euterpe oleracea*, D- Fabaceae – *Mimosidea*, E: Fabaceae - *Mimosa*, F-G: Verbenaceae, H: Fabaceae – *Dicorynia*, I: Fabaceae- *Mimosoideae/ Stryphnodendron guianense*, J-K: Anacardiaceae - *Tapirira guianensis*, L: Malpighiaceae, M: Melastomataceae- *Miconia*, N: Asteraceae, O: Myrtaceae, P: tipo polínico não foi identificado.

4. DISCUSSÃO

Na realização da identificação dos agentes patogênicos em *Scaptotrigona* aff. *postica* por PCR foram amplificadas sequências de DNA com tamanhos esperados para duas bactérias: *Melissococcus plutonius* e *Paenibacillus larvae*, causadoras respectivamente de EFB (*European Foulbrood*) e AFB (*American Foulbrood*), sugerindo a presença dessas bactérias. A confirmação será feita por sequenciamento de DNA.

A EFB, loque europeia, é considerada uma das doenças mais infecciosas no grupo das abelhas e foi identificada em uma colônia dentre as amostras analisadas, sendo esta doença de notificação obrigatória, quando confirmada, pela sua importância (OIE, 2019 a). Em *A. mellifera*, a doença atinge larvas não operculadas que acabam morrendo entre 4 a 5 dias (Forsgren, 2010). O primeiro passo para infecção é a colonização assintomática da bactéria no intestino, ou seja, a larva é infectada com células bacterianas de *M. plutonius* ao serem ingeridas com alimentos contaminados, se multiplicam de uma forma

rápida no intestino larval (Bailey, 1960; Forsgren, 2010). Com o avanço da infecção sinais clínicos se tornam evidentes, as larvas perdem a coloração saudável (branco perolado) passam a ter uma cor amarronzada e com avanço da infecção ficam com um aspecto aquoso de cor acinzentado preto (Forsgren 2010; Arai et al., 2012). Após a infecção, uma série de invasores secundários estão associados ao *M. plutonius*, representando um risco para a colônia infectada, já que, podem vir a se tornar agentes patogênicos (Forsgren 2010; Nakai et al., 2018). Uma das formas de resistência à infecção por *M. plutonius* é o mecanismo de defesa natural que as abelhas sociais realizam, o comportamento higiênico. Assim, quando essa larva infectada vem a óbito, antes de se desenvolver em pupa, a maioria das bactérias nela contida é eliminada da colônia no processo de limpeza executado por operárias (Forsgren, 2010). A detecção e diagnóstico em campo é crucial para impedir a infecção do agente patogênico em um maior número de colônias. A EFB não é considerada um grande problema para a apicultura brasileira, mas existem relatos de sinais clínicos esporádicos em algumas regiões do país sem grandes perdas e a seleção através do comportamento higiênico é um método eficiente para controlá-la (Freiberg et al., 2012).

Nas abelhas sem ferrão, a bactéria *M. plutonius* foi confirmada nas espécies *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. mandacaia* e *M. mondury*, no sudeste do Brasil (Teixeira et al., 2020) sendo, se confirmado por sequenciamento, detectada pela primeira vez neste trabalho na espécie *Scaptotrigona* aff. *postica*. A sintomatologia é bem similar ao que ocorre em colônias acometidas por EFB de *A. mellifera*, encontrando larvas doentes com coloração marrom e aspecto aquoso dentro das células de cria e, sendo uma consequência do comportamento higiênico, larvas mortas escuras na área do disco de cria (Teixeira et al., 2020). Esse mecanismo de defesa está diretamente associado à imunidade social das abelhas melíferas (Facchini et al., 2019) e nas abelhas sem ferrão (Toufaily et al., 2016) sendo crucial na resistência das colônias a doenças e pragas causadas por uma série de agentes patogênicos (Forsgren, 2010). A EFB pode ser transmitida para colônias de abelha sem ferrão através do compartilhamento de mel e pólen para alimentação suplementar com origem de abelhas melíferas, prática comum no sudeste do Brasil (Teixeira et al., 2020).

O outro agente patogênico suspeito em 4 colônias deste estudo foi a bactéria gram-positiva *Paenibacillus larvae*, causadora da loque americana (AFB), doença de grande impacto na apicultura mundial (White, 1913; Matovic et al., 2023). Os sinais clínicos da

AFB são similares clinicamente a EFB, sendo muitas vezes confundida (Forsgren, 2010; Matovic et al., 2023). É uma doença que acomete exclusivamente as larvas de abelhas, a infecção se instala no intestino médio da larva infectada causando danos em seu tecido, e a cria morre em um período de 3 a 12 dias após a infecção (Matovic et al., 2023). Naturalmente, a infecção ocorre através da alimentação dos indivíduos imaturos com material contaminado com os endósporos de *P. larvae*, sendo uma bactéria altamente infecciosa podendo haver mais de um milhão destes em uma única célula com larva infectada (Yue et al., 2008; Ebeling et al., 2016; Matovic et al., 2023). Além disso, seu material patogênico permanece infeccioso durante décadas, por isso a medida de prevenção contra a AFB é a erradicação de qualquer colônia infectada (Matovic et al., 2023). Quando operárias realizam o comportamento higiênico, removendo as larvas infectadas ou mortas por *P. larvae*, auxiliam na diminuição da propagação da doença dentro da própria colônia e dentro do apiário (Matovic et al., 2023).

Nos últimos anos, a primeira doença bacteriana de cria em meliponíneo foi descoberta em uma abelha sem ferrão australiana – *Tetragonula carbonaria* (Shanks et al., 2017), com a presença da bactéria *Lysinibacillus sphaericus*. Os autores observaram enfraquecimento da colônia com a diminuição da densidade populacional, larvas com coloração escura no disco de cria, um odor de podridão e a observação de operárias com atividade letárgica (Shanks et al., 2017). Os relatos dos sinais clínicos de doenças em espécies de abelhas sem ferrão vêm acontecendo desde século XIX com base em observações nos manejos de colônias em campo, na transferência de ninhos naturais e no desenvolvimento de trabalhos científicos que estão reunidos e podem ser consultados no livro a vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão (Nogueira – Neto 1997).

Dos seis vírus estudados que mais ocorrem em abelhas brasileiras, foi amplificado DNA de tamanho esperado de dois em duas colônias de *S. aff. postica*: ABPV e BQCV. Além disso, DNA do vírus CBPV foi amplificado somente em uma amostra da colônia C1. O ABPV é o vírus da paralisia aguda e sua sintomatologia para abelhas melíferas adultas consiste em uma aparência escura e brilhosa por conta da perda de pelos, movimentos corporais trêmulos e a incapacidade de voar (Miranda et al., 2010). Esse vírus já foi confirmado para outras espécies de abelhas sem ferrão: *Melipona scutellaris* e *Plebeia emerinoidea* (Ueira-Vieira et al., 2015; Alvarez et al., 2018). Enquanto que o BQCV é conhecido como vírus da célula de rainha negra afetando diretamente pupas de células reais que ficam enegrecidas após a infecção (Benjeddou et al., 2001). Este vírus já foi identificado em colônias de outras espécies de abelhas sem ferrão - *Tetragona*

elongata, *Melipona colimana*, *Nannotrigona perilapoides*, *Scaptotrigona mexicana*, *Trigona fluviventris* (Tapia-González et al., 2019; Morfin et al., 2020). Enquanto o vírus DWV (*Deformed wing virus*) comumente conhecido nas abelhas por causar uma deformidade na asa de operárias recém emergidas já foi identificado em uma série de espécies nas abelhas sem ferrão: *Tetragonisca angustula*, *Tetragonisca fiebrig*, *T. elongata*, *Trigona fluviventris*, *M. colimana*, *Melipona subnitida*, *Frieseomelitta varia*, *N. perilapoides*, *S. mexicana* (Alvarez et al., 2018; Souza et al., 2019; Tapia-González et al., 2019; Morfin et al., 2020; Guimarães-Cestaro et al., 2020; Dias et al., 2023). Em nossas amostras, mesmo em abelhas recém emergidas com asa deformada não foi detectável amplificação por PCR do vírus da asa deformada (DWV). Em uma espécie de abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* já foram detectados os vírus BQVC, ABPV e DWV (Dias et al., 2023). Um dos estudos pioneiros que buscou analisar a infecção viral em meliponíneos constatou cerca de 23,4% de vírus nas amostras em ninhos de três espécies: *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Tetragona elongata* (Guimarães- Cestaro et al., 2020). Assim, o vírus mais encontrado entre as amostras foi o ABPV com 10,8 %, enquanto BQCV e DWV se apresentaram com 5,1% cada (Guimarães- Cestaro et al., 2020). Já em nosso estudo, identificamos que a presença do vírus BQCV ocorreu em indivíduos em estágio de desenvolvimento (larvas e pupas) e em operárias adultas, enquanto o ABPV foi detectado apenas em operárias adultas e o CBPV foi identificado em operária adulta recém emergida. Além disso, em determinados estudos as taxas de infecção viral de ABPV e BQCV sofreram alteração ao longo do período estudado acontecendo uma espécie de ocorrência sazonal sendo em alto nível para o vírus DWV e baixo nível para o vírus CBPV (Guimarães- Cestaro et al., 2020). A presença de vírus e outros agentes patogênicos no grupo das abelhas sem ferrão está diretamente associado ao compartilhamento e exploração de recursos alimentares com *A. mellifera* (Guzman-Novoa et al., 2016). Dessa forma, mesmo com a presença de indivíduos assintomáticos dentro dos ninhos das abelhas sem ferrão a infecção viral acaba sendo muitas vezes uma realidade para essas populações que podem servir como hospedeiras dos vírus para a disseminação em colméias de *A. mellifera* (Alvarez et al., 2018).

A nutrição possui uma importante influência na saúde e resposta imunológica das colônias, por mais que isso ainda não seja tão compreendido dentro das abelhas, uma dieta com uma boa qualidade e diversidade proteica está associada diretamente a incidência e mortalidade por doenças infecciosas nas colônias (Cunningham-Rundles et

al., 2005; Ponton et al., 2011; Tritschler et al., 2017). Assim, é crucial observarmos o espectro polínico de uma determinada espécie para conhecermos a base da sua dieta alimentar buscando relacionar com longevidade e resistência a infecções (Thomas Rinderer e Kathleen Dell Elliott 1977; Jack et al., 2016; Brunner et al., 2014). Nesse cenário, o sintoma dos favos de cria com células falhadas observado em colônias de *S. aff. postica* pode se dar tanto pela presença das bactérias detectadas nesse estudo como pela má nutrição dos enxames com uma dieta de baixa diversidade e qualidade. Em nossos resultados, identificamos 13 tipos polínicos encontrados nas colônias de *S. aff. postica* distribuídos em 8 famílias botânicas nas áreas de plantios de açazais na amazônia paraense, logo representando uma baixa diversidade polínica. Outra espécie do gênero, *Scaptotrigona fulvicutis*, com colônias localizadas na amazônia central brasileira (Manaus, AM) operárias forrageiras coletaram pólen de 97 espécies diferentes distribuídas 73 gêneros e 36 famílias representando um espectro polínico mais diverso comparado ao que identificamos (Marques-Souza et al., 2006). Adicionalmente, ao observar a frequência polínica das espécies *Scaptotrigona nigrohirta* e *Scaptotrigona* sp. foram encontrados, respectivamente, 43 e 29 tipos polínicos que estavam sendo coletados pelas espécies (Rezende et al., 2019). Assim, essa diferença na riqueza de tipos polínicos provavelmente se dá pelo fato das colônias em nosso estudo estarem localizadas em áreas de plantio possuindo uma alta oferta e disponibilidade de pólen do açáí, logo, em mais da metade das colônias a família botânica mais abundante encontrada foi *Arecaceae* pertencendo a espécie do açáí (*Euterpe oleracea*). Identificamos ainda uma variação média de 5 tipos polínicos por colônia representando uma riqueza não tão expressiva na diversidade da dieta proteica destas em comparação com outras espécies do gênero em ninhos localizados em áreas de mata silvestre como em *S. nigrohirta* e *Scaptotrigona* sp. (Rezende et al., 2019).

Concluimos ao amplificar por PCR trechos de DNA com tamanhos esperados para as bactérias *M. plutonius* e *P. larvae* juntamente com os vírus ABPV e BQCV, que essas bactérias e vírus podem estar acometendo as colônias de *S. aff. postica*. Dessa forma, a presença dos sinais clínicos de doença de cria na espécie possivelmente se deu por conta das infecções bacterianas, sugerindo a ameaça que estas populações manejadas sofrem por patógenos que historicamente ofereciam risco somente para *A. mellifera*. Por isso, é necessário evitar a utilização de produtos apícolas (alimentação, materiais de manejo) em colônias de abelhas sem ferrão. Vale ressaltar que, a realização do sequenciamento nas amostras com sinais clínicos está planejada para a confirmação. Além disso, ao

investigarmos a dieta polínica das colônias manejadas foi possível constatar a baixa diversidade de fonte de proteínas que os indivíduos do ninho têm acesso para consumo influenciando diretamente na saúde e resistência a doenças das colônias, isso tudo auxilia no fornecimento de informações para o desenvolvimento de programas de resistência a doenças e infecções dentro do grupo das abelhas sem ferrão.

Agradecimentos

Agradecemos a parceria e colaboração à Embrapa Amazônia Oriental pelo fornecimento de colônias dos projetos no. 20.21.10.014.00.00 e no. 16.17.01.004.00.00. Aos colaboradores Marta S., Lucas B., João M., Elder S., Bárbara L. pelo auxílio no manejo das colônias e coletas de campo. Ao Fabrício Farias pela elaboração do Mapa de localização de coletas. O presente trabalho foi realizado com apoio de bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Com apoio financeiro da CAPES e FAPEMIG. As coletas foram realizadas sob licença SISGEN no. A9C5291.

REFERÊNCIAS

- Al Toufalia H, Alves DA, Bento JMS, Marchini LC, Ratnieks FLW. Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. *Biol. Open* [Internet]. 2016;5(11):1712–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/bio.018549>
- Alger SA, Burnham PA, Brody AK. Flowers as viral hot spots: Honey bees (*Apis mellifera*) unevenly deposit viruses across plant species. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(9):e0221800. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0221800>
- Alvarez LJ, Reynaldi FJ, Ramello PJ, Garcia MLG, Sguazza GH, Abrahamovich AH, et al. Detection of honey bee viruses in Argentinian stingless bees (Hymenoptera: Apidae). *Insectes Soc.* [Internet]. 2018;65(1):191–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-017-0587-2>
- Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, et al. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(3):e33708. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033708>
- Bailey L. The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Insect. Pathol.* 1960;2:67–83.
- Barascou L, Sene D, Barraud A, Michez D, Lefebvre V, Medrzycki P, et al. Pollen nutrition fosters honeybee tolerance to pesticides. *R. Soc. Open Sci.* [Internet]. 2021;8(9):210818. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.210818>
- Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* [Internet]. 2001;67(5):2384–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.5.2384-2387.2001>
- Brunner FS, Schmid-Hempel P, Barribeau SM. Protein-poor diet reduces host-specific immune gene expression in *Bombus terrestris*. *Proc. Biol. Sci.* [Internet]. 2014;281(1786):20140128. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.0128>
- Campbell AJ, Carnevalheiro LG, Maués MM, Jaffé R, Giannini TC, Freitas MAB, et al. Anthropogenic disturbance of tropical forests threatens pollination services to açai palm in the Amazon river delta. *J. Appl. Ecol.* [Internet]. 2018;55(4):1725–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.13086>
- Campbell AJ, Silva FD da S e., Maués MM, Leão KL, Carnevalheiro LG, Moreira EF, et al. Forest conservation maximises açai palm pollination services and yield in the

- Brazilian Amazon. *J. Appl. Ecol.* [Internet]. 2023;60(9):1964–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.14460>
- Castelli L, Branchiccela B, Garrido M, Invernizzi C, Porrini M, Romero H, et al. Impact of nutritional stress on honeybee gut Microbiota, immunity, and *Nosema ceranae* infection. *Microb. Ecol.* [Internet]. 2020;80(4):908–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-020-01538-1>
- Cristina Dias A, Taís Ferreira J, Weinstein Teixeira É, Pedro Lourenço A. Honey bee viruses in solitary bees in South America: simultaneous detection and prevalence. *J. Apic. Res.* [Internet]. 2023;1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2023.2190066>
- Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* [Internet]. 2005;115(6):1119–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2005.04.036>
- Deutsch KR, Graham JR, Boncristiani HF, Bustamante T, Mortensen AN, Schmehl DR, et al. Widespread distribution of honey bee-associated pathogens in native bees and wasps: Trends in pathogen prevalence and co-occurrence. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2023;200(107973):107973. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2023.107973>
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, et al. Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* [Internet]. 2013;8(8):e72016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>
- Ebeling J, Knispel H, Hertlein G, Fünfhaus A, Genersch E. Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [Internet]. 2016;100(17):7387–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7716-0>
- Evans JD. Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2006;93(2):135–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.004>
- Erdtman, G. (1960). Pollen walls and angiosperm phylo-geny. *Botaniska Notiser*, 113, 41-45.
- Facchini E, Bijma P, Pagnacco G, Rizzi R, Brascamp EW. Hygienic behaviour in honeybees: a comparison of two recording methods and estimation of genetic parameters. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2019;50(2):163–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-018-0627-6>
- Forsgren E. European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2010;103:S5–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>
- Freiberg M, De Jong D, Message D, Cox-Foster D. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genet. Mol. Res.* [Internet].

- 2012;11(3):3310–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.4238/2012.September.12.14>
- Frias BED, Barbosa CD, Lourenço AP. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2016;47(1):15–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-015-0373-y>
- Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, Cartolano EA Jr, Veiga AK, Imperatriz-Fonseca VL, et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2015;46(2):209–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
- Gruter C. *Stingless bees: Their behaviour, ecology and evolution*. 1st ed. Cham, Switzerland: Springer Nature; 2020.
- Guimarães-Cestaro L, Martins MF, Martínez LC, Alves MLTMF, Guidugli-Lazzarini KR, Nocelli RCF, et al. Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. *Sci. Nat.* [Internet]. 2020;107(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-020-1670-5>
- Heard TA. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* [Internet]. 1999;44(1):183–206. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.183>
- Huang Z. Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terr. Arthropod Rev.* [Internet]. 2012;5(2):175–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1163/187498312x639568>
- Jack CJ, Uppala SS, Lucas HM, Sagili RR. Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *J. Insect Physiol.* [Internet]. 2016;87:12–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.004>
- Jaffé R, Pope N, Carvalho AT, Maia UM, Blochtein B, de Carvalho CAL, et al. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(3):e0121157. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121157>
- da Luz CFP, Fidalgo A de O, Silva SAY, Rodrigues S dos S, Nocelli RCF. Comparative floral preferences in nectar and pollen foraging by *Scaptotrigona postica* (Latreille 1807) in two different biomes in São Paulo (Brazil). *Grana* [Internet]. 2019;58(3):200–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00173134.2019.1579257>
- Marques-Souza AC, Absy ML, Kerr WE. Pollen harvest features of the Central Amazonian bee *Scaptotrigona fulvicutis* Moure 1964 (Apidae: Meliponinae), in Brazil. *Acta Bot. Brasilica* [Internet]. 2007;21(1):11–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062007000100002>
- Matović K, Žarković A, Debeljak Z, Vidanović D, Vasković N, Tešović B, et al. American foulbrood—old and always new challenge. *Vet. Sci.* [Internet]. 2023;10(3):180. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci10030180>

- McMenamin AJ, Flenniken ML. Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Curr. Opin. Insect Sci.* [Internet]. 2018;26:120–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.009>
- Michener CD, Michener MH. *American social insects: A book about bees, ants, wasps, and termites.* Literary Licensing; 2013.
- de Miranda JR, Cordonni G, Budge G. The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2010;103:S30–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014>
- Morfin N, Gashout HA, Macías-Macías JO, De la Mora A, Tapia-Rivera JC, Tapia-González JM, et al. Detection, replication and quantification of deformed wing virus-A, deformed wing virus-B, and black queen cell virus in the endemic stingless bee, *Melipona colimana*, from Jalisco, Mexico. *Int. J. Trop. Insect Sci.* [Internet]. 2021;41(2):1285–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s42690-020-00320-7>
- Nakai Y, Ishihara M, Arai R, Takamatsu D. A scientific note on improved isolation methods for *Melissococcus plutonius* from diseased *Apis mellifera* larvae. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2018;49(4):459–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-018-0572-4>
- OiE, 2019a. Infection of honey bees with *Melissococcus plutonius* (European foulbrood), in: *Terrestrial Animal Health Code (2019)*. OIE, Paris, pp. 1–4. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_melissococcus_plutonius.pdf.
- de Paula Freitas FC, Lourenço AP, Nunes FMF, Paschoal AR, Abreu FCP, Barbin FO, et al. The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* – a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. *BMC Genomics* [Internet]. 2020;21(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-020-06784-8>
- Pires CSS, Pereira F de M, Lopes MT do R, Nocelli RCF, Malaspina O, Pettis JS, et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? *Pesqui. Agropecu. Bras.* [Internet]. 2016;51(5):422–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2016000500003>
- Ponton F, Wilson K, Cotter SC, Raubenheimer D, Simpson SJ. Nutritional immunology: A multi-dimensional approach. *PLoS Pathog.* [Internet]. 2011;7(12):e1002223. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002223>
- Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* [Internet]. 2016;540(7632):220–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature20588>
- Purkiss T, Lach L. Pathogen spillover from *Apis mellifera* to a stingless bee. *Proc. Biol. Sci.* [Internet]. 2019;286(1908):20191071. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.1071>

- Rezende ACC, Absy ML, Ferreira MG, Marinho HA, Santos O dos A. Pollen of honey from *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919, *Scaptotrigona nigrohirta* Moure, 1968 and *Scaptotrigona* sp. Moure, 1942 (Apidae: Meliponini) reared in Sataré Mawé indigenous communities, Amazon, Brazil. *Palynology* [Internet]. 2019;43(2):255–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/01916122.2018.1458664>
- Rinderer TE, Dell Elliott K. Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*: Influence of Diet. *J. Econ. Entomol.* [Internet]. 1977;70(4):431–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/70.4.431>
- Shanks JL, Haigh AM, Riegler M, Spooner-Hart RN. First confirmed report of a bacterial brood disease in stingless bees. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2017;144:7–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.004>
- de Souza FS, Kevill JL, Correia-Oliveira ME, de Carvalho CAL, Martin SJ. Occurrence of deformed wing virus variants in the stingless bee *Melipona subnitida* and honey bee *Apis mellifera* populations in Brazil. *J. Gen. Virol.* [Internet]. 2019;100(2):289–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.001206>
- Tapia-González JM, Morfin N, Macías-Macías JO, De la Mora A, Tapia-Rivera JC, Ayala R, et al. Evidence of presence and replication of honey bee viruses among wild bee pollinators in subtropical environments. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2019;168(107256):107256. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2019.107256>
- Teixeira EW, Chen Y, Message D, Pettis J, Evans JD. Virus infections in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2008;99(1):117–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.014>
- Teixeira ÉW, Ferreira EA, Luz CFP da, Martins MF, Ramos TA, Lourenço AP. European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. *J. Invertebr. Pathol.* [Internet]. 2020;172(107357):107357. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2020.107357>
- Toledo-Hernández E, Peña-Chora G, Hernández-Velázquez VM, Lormendez CC, Toribio-Jiménez J, Romero-Ramírez Y, et al. The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2022;53(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-022-00913-w>
- Tritschler M, Vollmann JJ, Yañez O, Chejanovsky N, Crailsheim K, Neumann P. Protein nutrition governs within-host race of honey bee pathogens. *Sci. Rep.* [Internet]. 2017;7(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15358-w>
- Ueira-Vieira C, Almeida LO, de Almeida FC, Amaral IMR, Brandeburgo MAM, Bonetti AM. Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. *Apidologie (Celle)* [Internet]. 2015;46(5):628–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-015-0353-2>
- White GF. Sacbrood, a disease of bees. Washington: Govt. print. off; 1913.

- Yañez O, Piot N, Dalmon A, de Miranda JR, Chantawannakul P, Panziera D, et al. Bee viruses: Routes of infection in Hymenoptera. *Front. Microbiol.* [Internet]. 2020;11. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00943>
- Yue D, Nordhoff M, Wieler LH, Genersch E. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*): FISH analysis of AFB pathogenesis. *Environ. Microbiol.* [Internet]. 2008;10(6):1612–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01579.x>

MATERIAL SUPLEMENTAR

Local	IAG	Data de coleta	ID	SD	PP	RP (%)	AP
Tomé - açú	1	23.02.2022	ST13 (TA)	Sim	Não	83.67	5
Barcarena	2	16.02.2022	18 (Barcarena)	Sim	Não	39.18	17
Santa Bárbara do Pará	3	01.03.2022	17 (Fernando)	Sim	<i>P. larvae</i>	5.50	27
Tomé - açú	4	24.02.2022	ST59 (TA)	Sim	Não	78.84	9
Barcarena	5	16.02.2022	16 (Barcarena)	Sim	<i>M. Plutonius</i>	37.85	16
Acará	6	07.10.2021	29 (Paulo)	Sim	Não	44.16	19
Belém	7	17.02.2022	05 (Embrapa)	Sim	Não	0.46	22
Belém	8	17.02.2022	01 (Embrapa)	Sim	Não	16.59	20
Tomé - açú	9	23.02.2022	ST29 (TA)	Não	Não	Não	Não
Santa Bárbara do Pará	10	01.03.2022	20 (Fernando)	Sim	Não	94.97	28
Santa Bárbara do Pará	11	01.03.2022	16 (Fernando)	Sim	Não	37.85	26
Tomé - açú	12	23.02.2022	ST8 (TA)	Sim	Não	51.90	4
Tomé - açú	13	23.02.2022	ST7 (TA)	Sim	Não	97.58	3
Tomé - açú	14	23.02.2022	ST52 (TA)	Sim	Não	15.31	7
Acará	15	07.10.2021	28 (Paulo)	Sim	Não	3.88	18
Tomé - açú	16	23.02.2022	ST14 (TA)	Sim	Não	Não	Não

Tomé - açú	17	23.02.2022	ST21 (TA)	Sim	Não	94.68	11
Tomé - açú	18	23.02.2022	ST6 (TA)	Não	Não	Não	Não
Barcarena	19	16.02.2022	10 (Barcarena)	Sim	<i>P. larvae</i>	Não	Não
Embrapa	20	03.03.2023	C1(A1)	Sim	Não	Não	Não
Embrapa	21	03.03.2023	C1(A2)	Sim	<i>P. larvae</i>	Não	Não
Embrapa	22	03.03.2023	C1(LM1)	Sim	Não	Não	Não
Embrapa	23	03.03.2023	CI(LS1)	Sim	Não	Não	Não
Embrapa	24	03.03.2023	S23(A1)	Sim	Não	Não	Não
Embrapa	25	03.03.2023	S23(A2)	Sim	<i>P. larvae</i>	Não	Não
Embrapa	26	03.03.2023	S23(LM1)	Sim	Não	Não	Não
Embrapa	27	03.03.2023	S23(LS1)	Sim	Não	Não	Não
Tomé - açú	-	23.02.2022	ST1 (TA)	Sim	Não	Não	Não
Tomé - açú	-	23.02.2022	ST44 (TA)	Não	Não	61.96	6
Tomé - açú	-	23.02.2022	ST25 (TA)	Sim	Não	91.91	10
Tomé - açú	-	23.02.2022	ST53 (TA)	Não	Não	77.70	12
Tomé - açú	-	24.02.2022	ST56 (TA)	Não	Não	0.15	8
Tomé - açú	-	23.02.2022	ST1 (TA)	Sim	Não	0.42	1
Barcarena	-	16.02.2022	10.1 (Barcarena)	Sim	Não	61.13	13
Barcarena	-	16.02.2022	10.2 (Barcarena)	Sim	Não	91.49	14
Barcarena	-	16.02.2022	14 (Barcarena)	Sim	Não	0	15

Belém	-	17.02.2022	04 (Embrapa)	Não	Não	54.56	21
Ananindeua	-	14.02.2022	08 (Rubens)	Não	Não	2.01	23
Ananindeua	-	14.02.2022	09 (Rubens)	Sim	Não	0.46	24
Santa Izabel do Pará	-	28.02.2022	G1	Sim	Não	93.95	25

Nota: IAG – Identificação amostra géis; SD – Sinais clínicos de Doenças; PP – Presença de patógenos; RP (%) – Riqueza; AP- Amostras de pólen (Figura 7).

Tabela S2- Amostras de larvas (L), pupas (Pw, Pp e Pb) e adultos (NE e NEDW) de *Scaptotrigona aff. postica* utilizadas para análise de detecção de vírus.

Localidade	Identificação amostra géis	Data de coleta	ID	Sintoma de doença
Embrapa	c1	03.03.2023	C1 (L1)	Sim
Embrapa	c2	03.03.2023	C1 (PW1)	Sim
Embrapa	c3	03.03.2023	S23 (Pp1)	Sim
Embrapa	c4	03.03.2023	S23 (Pb1)	Sim
Embrapa	c5	03.03.2023	C1 (NE1)	Sim
Embrapa	c6	03.03.2023	C1 (NE2)	Sim
Embrapa	c7	03.03.2023	S23 (NE1)	Sim
Embrapa	c8	03.03.2023	S23 (NE2)	Sim
Embrapa	c9	03.03.2023	C1 (NEDW1 +2)	Sim
Embrapa	c10	03.03.2023	S23 (NEDW1)	Sim
Embrapa	c11	03.03.2023	S23 (NEDW2)	Sim

Os arquivos em vídeos (MP4) estão disponíveis mediante solicitação aos autores..

Vídeo 01 - Operárias de *Scaptotrigona aff. postica* realizando o comportamento higiênico na cria sacrificada.

Vídeo 02- Operária de *S. aff. postica* carregando por alguns minutos uma larva sacrificada e deixando-a sobre o disco de cria próximo a área de tratamento.

Vídeo 03- Duas operárias de *S. aff. postica* envolvidas no processo de remoção de pupa sacrificada carregando-a para fora do disco de cria.