

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTE INORGÂNICA DE FERRO NO
DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA HIPOFARINGEANA DE ABELHAS *Apis*
mellifera L.

ALEX JUNJI SHINOHARA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
dos requisitos para obtenção ao título de
Mestre.

BOTUCATU – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTE INORGÂNICA DE FERRO NO
DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA HIPOFARINGEANA DE ABELHAS *Apis*
mellifera L.

ALEX JUNJI SHINOHARA

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
dos requisitos para obtenção ao título de
Mestre.

BOTUCATU – SP

Junho – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S556e Shinohara, Alex Junji, 1992-
Efeito da suplementação de fonte inorgânica de ferro no desenvolvimento da glândula hipofaríngea de abelhas *Apis mellifera* L. / Alex Junji Shinohara. - Botucatu: [s.n.], 2018
viii, 28 f.: fots. color., grafs., ils. color.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Inclui bibliografia

1. Dieta. 2. Mineral. 3. Nutrição. 4. Entressafra. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

“(…)

Uma flor nasceu na rua!

Passem de longe, bondes, ônibus, rio de aço do tráfego.

Uma flor ainda desbotada

ilude a polícia, rompe o asfalto.

Façam completo silêncio, paralitem os negócios,

garanto que uma flor nasceu.

Sua cor não se percebe.

Suas pétalas não se abrem.

Seu nome não está nos livros.

É feia. Mas é realmente uma flor.

Sento-me no chão da capital do país às cinco horas da tarde

e lentamente passo a mão nessa forma insegura.

(…)

É feia. Mas é uma flor. Furou o asfalto, o tédio, o nojo e o ódio.”

A Flor e a Náusea – Carlos Drummond de Andrade

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Augusto S. Shinohara e Augusta M. Yuki Shinohara, por tudo que fizeram e deixaram de fazer por mim e pelos meus irmãos.

Aos meus familiares, em especial à minha tia Laura T. Shinohara e ao meu tio Alberto T. Shinohara. Obrigado por demonstrarem tamanha generosidade e por terem me ensinado que a família é o meu bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por demonstrar Seu imenso amor por mim através da Graça e por me abençoar de tantas formas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade de estudar num programa de excelência.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi pela amizade, orientação e paciência. Muito obrigado pelos conselhos e ensinamentos que levarei para a vida toda.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Jr. e ao Dr. Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos por me receber e auxiliar nas análises morfológicas realizadas no Laboratório de Matriz Extracelular – Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

Aos meus queridos amigos Thaís, Bolor, Adriana e Rodrigo pela amizade, aconselhamento e conversas sempre muito produtivas.

Aos amigos do grupo NECTAR, Maurício, Mineiro, Samir, Marcelo, Juliana, Roney, Cater, Maurice, Gabriel, alunos de iniciação científica e estagiários pela ajuda e amizade.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu.

Aos meus amigos Lucas e Guilherme, a quem eu considero meus irmãos.

A todos que, de alguma forma, me ajudaram nesta caminhada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Descendente de imigrantes japoneses, Alex Junji Shinohara nasceu na cidade de São Paulo – SP no dia 25 de Setembro de 1992. Mudou-se para Atibaia-SP aos três anos de idade com seus pais Augusto Sueo Shinohara e Augusta Massayo Yuki Shinohara, e dois irmãos, Hugo Hideyuki Shinohara e Vivian Hidemi Shinohara.

Na sua adolescência, durante os períodos de férias escolares, viajava com seus primos à casa de seus tios Irene Yuriko Shinohara e Jorge Tsuruta (*in memoriam*) no município de Paranã – TO. Isso fez com que pudesse ter contato com a vida rural e animais, o que o ajudaria a escolher uma futura carreira profissional.

No ano de 2010, mudou-se para Botucatu – SP após ingressar no curso de Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Em Julho de 2014 até novembro de 2015 foi contemplado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) com uma bolsa de estudos pelo Programa Ciência Sem Fronteiras para uma Graduação Sanduíche na Auckland University of Technology (AUT), na cidade de Auckland, Nova Zelândia.

Com objetivo de finalizar sua graduação, em Janeiro de 2016 realizou seu estágio obrigatório no Setor de Apicultura, onde teve maior contato com a área que posteriormente, seria o tema de sua dissertação de mestrado. Graduou-se em Zootecnia em Junho de 2016 e ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ, UNESP – Botucatu sob orientação do Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi. Seu trabalho de mestrado buscou avaliar os efeitos da suplementação de ferro no número e área dos ácinos das glândulas hipofaríngeas de abelhas *Apis mellifera* L.

Sumário

CAPÍTULO I	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
1. Histórico da apicultura no Brasil	2
2. <i>Apis mellifera</i> L.....	3
3. Sistema glandular	4
4. Nutrição.....	6
4.1. Minerais	7
4.1.1. Ferro	7
4.2. Suplementação artificial da dieta	8
5. Hipóteses e Objetivos	9
6. Referências bibliográficas.....	10
CAPÍTULO II	16
1. INTRODUCTION	17
2. MATERIAL AND METHODS	18
2.1. Treatment groups	18
2.2. Collection of nurse bees and morphological analysis	19
2.3. Statistical analysis	19
3. RESULTS	19
4. DISCUSSION	22
5. REFERENCES	24
CAPÍTULO III.....	27
IMPLICAÇÕES	28

LISTA DE FIGURAS

(Capítulo I)

Figura 1. Representação das castas de uma colmeia: operária (a), zangão (b) e rainha (c)..3

Figura 2. (Esq.) Representação da glândula hipofaringeana (GH) e sua localização na cabeça da abelha..5

Figura 3. Corte histológico da glândula hipofaringeana destacando o canal excretor e ácinos secretores (a)..5

(Capítulo II)

Figure 1. Hystological section of the hypopharyngeal glands of 6-day-old nurse bees (*Apis mellifera* L.) during the offseason.20

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Histórico da apicultura no Brasil

As diversas subespécies de abelhas *Apis mellifera* estão presentes em quase todos os continentes. Elas podem ser encontradas tanto em regiões de climas frios com invernos longos e rigorosos quanto nos trópicos, onde o inverno é quase imperceptível e as temperaturas são geralmente elevadas (GUPTA, 2014).

As linhagens europeias e africanas foram as subespécies introduzidas no Brasil, e apesar de possuírem características morfológicas únicas, são as comportamentais que mais se destacam (TOFILSKI, 2008). As abelhas europeias, no geral, constroem ninhos maiores em relação às africanas e possuem maior adaptação às baixas temperaturas. Além disso, possuem baixa defensividade e comportamento enxameatório (DE JONG, 1996; WINSTON, 1992). No entanto, as abelhas africanas apresentam maior resistência às doenças, melhor comportamento higiênico, alto comportamento enxameatório, e principalmente, maior defensividade (WINSTON, 1992; AUMEIER, 2001; MEDINA-FLORES et al., 2014).

As primeiras abelhas europeias foram introduzidas no Brasil aproximadamente no ano de 1839 pelo padre Antonio Carneiro Aureliano, que trouxe colmeias provenientes de Portugal e instalou-as no Rio de Janeiro. Neste período, a cera era muito utilizada para confeccionar velas para uso em atividades religiosas nas igrejas. Em 1845, imigrantes alemães trouxeram as *Apis mellifera mellifera* e iniciaram a apicultura na região sul do Brasil. Entre 1870 e 1880 foram introduzidas abelhas vindas da Itália (*A. m. linguistica*) (TRINDADE et al. 2004).

Com o intuito de impulsionar a apicultura brasileira por meio do melhoramento genético das abelhas, no ano de 1956 o professor Warwick Stevam Kerr trouxe para o Brasil rainhas da linhagem africana (em sua maioria da subespécie *A. m. scutellata*) para melhor adaptação ao clima brasileiro, maior potencial produtivo e maior resistência a doenças (WINSTON, 1992; OLIVEIRA, 2013). Entretanto, no ano de 1957, 26 enxames enxamearam e se estabeleceram no ambiente, iniciando o processo de africanização das abelhas, onde provavelmente rainhas europeias acasalaram com zangões africanos, produzindo um poli híbrido denominado “abelha africanizada”, que além de herdar comportamentos desejáveis como alto comportamento higiênico, resistência a doenças e adaptação ao clima tropical, também herdou o comportamento altamente defensivo e enxameatório, que embora tenham sido essenciais no processo de introdução e expansão da espécie, podem ser consideradas características indesejáveis para a apicultura (WINSTON, 1992).

Em aproximadamente 40 anos, as abelhas africanizadas estavam presentes em boa parte do continente, sendo limitadas às barreiras físicas e climáticas, como por exemplo, invernos rigorosos e cadeias montanhosas da Cordilheira dos Andes (DEL LAMA, 2004). Neste período

houve um impacto muito grande na apicultura e população, ocorrendo aumento nos casos de acidentes apílicos envolvendo humanos e animais (DE JONG, 1996).

2. *Apis mellifera* L.

As abelhas são insetos que pertencem à Família Apoidea da Ordem Hymenoptera. Dentre as mais de 20 mil espécies já identificadas, a *Apis mellifera* L. é a espécie com a distribuição mais ampla entre todas as espécies, presente em todos os continentes com exceção da Antártida (GUPTA, 2014).

As abelhas *Apis mellifera* L. vivem em uma complexa sociedade com sobreposição de gerações no ninho, cuidado cooperativo da prole e divisão de castas. Este comportamento social é chamado de eussocialidade e é o mais complexo tipo de organização social presente nos animais (YAN et al., 2014). As castas da colmeia são representadas pelas operárias (fêmeas semi-estéreis), zangões (machos férteis) e rainhas (fêmeas férteis) (Figura 1).

O número de operárias e zangões dentro de uma colmeia pode variar de acordo com vários fatores, como por exemplo, a época do ano, disponibilidade de alimento, genética e idade da rainha, e espaço disponível para expansão do ninho. No geral, uma única colmeia podem existir cerca de 2 a 80 mil operárias; de zero a aproximadamente 400 zangões; e uma rainha, que dentre várias outras funções, é responsável pela postura de aproximadamente 2500 a 3000 ovos todos os dias (EMBRAPA, 2003).



Figura 1. Representação das castas de uma colmeia: operária (a), zangão (b) e rainha (c). Fonte: Ferreira Apiary.

Durante os três primeiros dias após a eclosão dos ovos, todas as larvas se alimentam exclusivamente de geleia real. Após este período são alimentadas com mel e pólen, tendo seu desenvolvimento finalizado ao 21º dia para as operárias e 24º dia para os zangões. Para a formação de uma nova rainha, uma larva fêmea receberá geleia real até sua transformação em pupa, o que estimulará o desenvolvimento dos ovários e diminuirá o tempo total para o desenvolvimento, totalizando 14 dias para atingir a vida adulta (KAMAKURA, 2011).

O mecanismo pelo qual a alimentação exclusiva de geleia real induz esta diferenciação é incerto, porém CRIDGE et al., (2017) sugerem que processos epigenéticos podem ser responsáveis por estas mudanças fenotípicas entre as castas.

Após a emergência da célula de cria, a rainha continuará recebendo alimentação exclusiva de geleia real por toda a sua vida (CRAILSHEIM, 1992).

Os zangões não possuem ferrão nem anexos para o trabalho, sendo necessários apenas para a reprodução. As responsáveis por todo o trabalho dentro de uma colmeia são as operárias, cujas funções, em condições normais, são distribuídas de acordo com a faixa etária. Até o 3º dia após a emergência da célula de cria, as abelhas desempenham função de faxineiras limpando a colmeia. A partir do 4º ao 12º são denominadas “nutrizes” e alimentam as crias e rainhas com secreções de suas glândulas. Entre o 13º e 18º dia de vida adulta, as abelhas são chamadas de “engenheiras”, pois são responsáveis pela construção do ninho e produção de cera. No 19º e 20º dia são denominadas “guardiãs” e são encarregadas de proteger o ninho contra invasores. A partir do 21º até sua morte a abelha desempenha a função de campeira, buscando para o ninho recursos como água, resinas e alimento (WIESE, 2005).

É importante notar que diversos comportamentos e funções dentro e fora da colmeia estão diretamente ligados às secreções de glândulas, como a defesa do ninho, recrutamento de novas rainhas, comunicação entre indivíduos e interações trofaláticas (distribuição de alimento entre indivíduos do mesmo enxame) (SEELEY, 1995). Sendo assim, o sistema glandular das abelhas é essencial para o equilíbrio e manutenção de um enxame.

3. Sistema glandular

O sistema glandular das abelhas pode ser dividido em dois tipos de glândulas: glândulas endócrinas e glândulas exócrinas. As glândulas endócrinas, que possuem células produtoras de hormônios e caracterizam-se pela ausência de ductos. Já as endócrinas são caracterizadas pela presença de ductos para a condução da secreção. Exemplos de secreção de glândulas exócrinas incluem feromônios (ex: glândula de Dufour, glândula de Nasonov, glândula de Koschevnikov); cera, secretada pela glândula cerígena, é importante na construção do ninho; veneno, secretada pela glândula de veneno, sendo importante para a defesa da colmeia; e geleia real, secretada pelas glândulas hipofaríngea e mandibular, é um alimento essencial para todos os indivíduos da colmeia (DESEYN & BILLEN, 2005; BORTOLOTTI & COSTA, 2014).

Dentre as secreções glandulares, a geleia real destaca-se por ser uma substância complexa constituída de água, açúcares, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais. Este alimento é produzido pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas (Figura 2), localizadas na cabeça das abelhas (DESEYN & BILLEN, 2005).

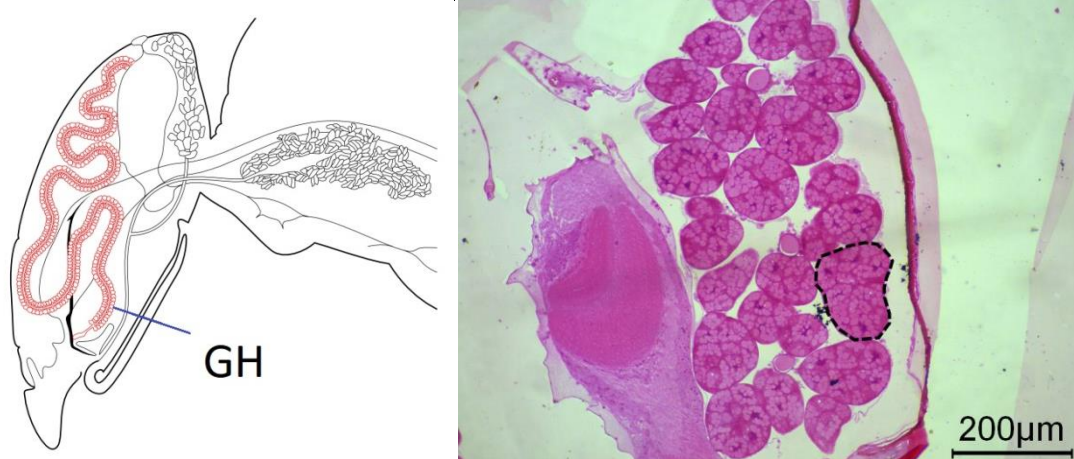


Figura 2. (Esq.) Representação da glândula hipofaringeana (GH) e sua localização na cabeça da abelha. (Dir.) Corte histológico da glândula, com destaque pontilhado no ácino. Corados com Hematoxilina e Eosina. Fontes: (Esq.) TOFILSKI (2012); (Dir) SHINOHARA (2018).

A glândula hipofaringeana está localizada próxima ao cérebro da abelha e é uma estrutura que é formada por cachos de ácinos ou alvéolos pluricelulares que pode chegar até a um centímetro de comprimento. Estes ácinos são ligados a um ducto que conduz as secreções para o meio externo (Figura 3) (CRUZ-LANDIM, 2009).

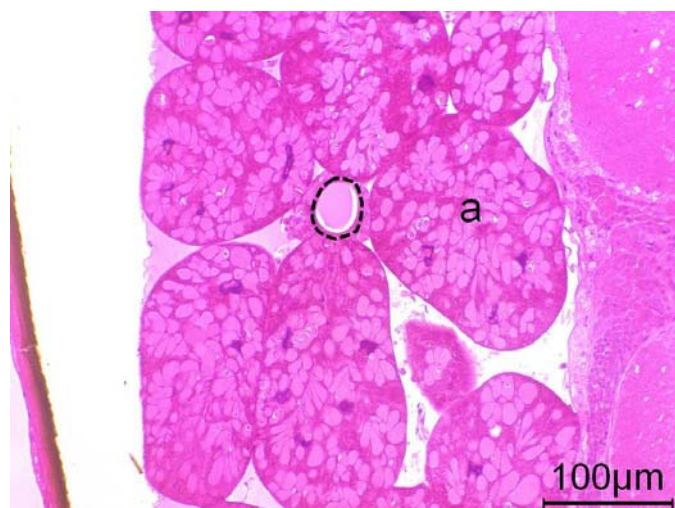


Figura 3. Corte histológico da glândula hipofaringeana destacando o canal excretor e ácinos secretores (a). Fonte: SHINOHARA, 2018.

Sabe-se que a capacidade de secreção está associada ao tamanho das glândulas. Sendo assim, glândulas mais desenvolvidas possuem maior capacidade de produção de geleia real (DESEYN & BILLEN, 2005).

DESEYN & BILLEN (2005) demonstram que a glândula hipofaringeana apresenta seu pico de desenvolvimento ao sexto dia após a emergência da célula de cria, quando comparada com

0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 dias. Após o 15º dia, os autores verificaram diminuição acentuada no tamanho dos ácinos e secreção de geleia real, porém estudos sugerem que a glândula mantém a função secretando enzimas como α -glucosidase e glucosidase-oxidase mesmo após o início da fase de campeira (OHASHI, et al., 1999; KUBO et al., 1996; CRUZ-LANDIM, 2009).

Além de fatores fisiológicos, alguns fatores externos também são capazes de afetar o desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas, como por exemplo, presença de cria (DESEYN & BILLEN, 2005) a época do ano (KELLER et al., 2005), exposição a agroquímicos (HATJINA et al., 2013; ZALUSKI et al., 2017), colheita de apitoxina (BOVI et al., 2017) e disponibilidade de alimento (HRASSNIGG & CRAILSHEIM, 1998).

O desenvolvimento prejudicado das glândulas trazem prejuízos à qualidade e quantidade de geleia real produzida (PERNAL & CURRIE, 2000), podendo acarretar na diminuição da taxa de postura devido à má nutrição da rainha e diminuição da quantidade de cria devido à falta de alimento para as larvas.

4. Nutrição

Toda alimentação das abelhas é obtida por meio dos recursos florais disponíveis no campo. O néctar é a principal fonte de carboidratos, fornecendo energia para realização de voos e termorregulação. O néctar é composto de três açúcares simples: sacarose e seus monossacarídeos glicose e frutose, tendo suas proporções variando de acordo com as espécies das plantas. O pólen é a principal fonte de proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais para o enxame (BRODSCHNEIDER & CRAILSHEIM, 2010; WRIGHT et al., 2017). O pólen será utilizado para a formação do “pão de abelha”, uma mistura fermentada de pólen, mel e secreções salivares de abelhas (SOBRAL et al., 2017; WRIGHT et al. 2017).

Por viverem em sociedade extremamente complexa e organizada, a nutrição das abelhas pode ser dividida em três níveis interdependentes entre si: nutrição da colônia, nutrição dos adultos e nutrição das crias. Sendo assim, a deficiência de pólen pode levar à má nutrição dos adultos e estes podem não alimentar as larvas de modo adequado. Por consequência, a próxima geração de operárias estará com número reduzido e pode não ser suficiente para cuidar das próximas gerações (BRODSCHNEIDER & CRAILSHEIM, 2010).

Durante os primeiros dias após a emergência das células de cria, as abelhas jovens consomem pólen para suprir suas necessidades proteicas, garantindo assim o desenvolvimento completo das glândulas. Por secretarem maior quantidade de enzimas proteolíticas no aparelho digestório, as abelhas nutrizas possuem maior capacidade de digestão do pólen, consumindo maior quantidade em relação às mais velhas. Assim, as abelhas nutrizas utilizam os nutrientes

do pólen para a síntese de geleia real e tornam os nutrientes disponíveis para as crias e rainha (CRAILSHEIM, 1992; DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2010; WRIGHT et al., 2017).

O pólen possui diferentes qualidades nutricionais que variam de acordo com a espécie vegetal do qual é coletado (BRODSCHNEIDER & CRAILSHEIM, 2010). ROULSTON et al. (2000) encontrou valores de proteína bruta que variaram entre 2,5 a 61%. Sendo assim, é importante que haja variedade de espécies vegetais no campo para que as abelhas possam equilibrar estes nutrientes para elaborar o pão de abelha, cujo teor de proteína bruta pode variar entre 14,8 a 24,3% (KAPLAN, 2016).

Colmeias utilizadas para serviços de polinização em áreas de monocultivo podem ter a dieta pouco diversificada, o que pode não ser suficiente para a adequada nutrição do enxame (ALAUX et al., 2010; BRODSCHNEIDER & CRAILSHEIM, 2010), podendo levar à diminuição de quantidade de cria, longevidade, resistência a doenças e da produtividade da colmeia. Além disso, a falta de alimento pode estimular o canibalismo de larvas jovens e operculamento precoce de larvas mais desenvolvidas, levando a um declínio populacional pela combinação da redução da produção de crias e da longevidade das abelhas adultas (ALAUX et al., 2010; BRODSCHNEIDER & CRAILSHEIM, 2010; DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2010; DOLEZAL & TOTH, 2018; IMDORF et al., 1998, NAUG, 2009).

4.1. Minerais

Além das necessidades energéticas e proteicas, as abelhas também possuem necessidades de outros nutrientes como vitaminas e minerais que são essenciais ao desenvolvimento do enxame (WRIGHT et al., 2017).

O pólen é a principal fonte de minerais para as abelhas. De uma forma geral, os minerais encontrados no pólen incluem: Potássio, Fósforo, Magnésio, Cálcio, Sódio, Enxofre, Ferro, Cobre, Manganês e Zinco (SOMERVILLE & NICOL, 2002).

Apesar de serem necessários em menor quantidade em relação às proteínas e carboidratos, são fundamentais para desenvolvimento normal dos organismos atuando como componentes estruturais e participando de processos metabólicos (SOETAN et al., 2010). HERBERT & SHIMANUKI (1978) sugeriram uma concentração de 1000ppm de potássio, 500ppm de cálcio, 300ppm de magnésio e até 50ppm de sódio, zinco, manganês, cobre e ferro nas dietas artificiais para abelhas.

4.1.1.Ferro

Os íons metálicos são essenciais para o funcionamento das células, pois atuam como componentes estruturais de sistemas enzimáticos. O ferro, por exemplo, é um micro-mineral

importante para uma série de processos metabólicos como transporte de oxigênio, manutenção do sistema imunológico, transferência de elétrons e síntese de DNA e RNA (LOCKE & NICHOL, 1992; SOETAN et al., 2010; GANZ & NEMETH, 2015).

O ferro é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, porém seu estado na forma férrica (Fe^{3+}) torna-o pouco disponível para plantas e animais. No estado ferroso (Fe^{2+}), o ferro torna-se mais solúvel, porém é rapidamente oxidado para o estado férrico na presença de oxigênio. Ambos estados são altamente reativos, podendo perder elétrons com facilidade. Por isso, em sistemas biológicos, o ferro deve estar associado a proteínas ou agentes quelantes (GANZ & NEMETH, 2015).

A ferritina e a transferrina são as principais proteínas envolvidas no metabolismo do ferro (NETO et al., 2013) e são responsáveis por mantê-lo não-reactivo (ANDREWS, 2008). Polens com altas concentrações de ferro, possivelmente provenientes de culturas demasiadamente fertilizadas, podem ser tóxicos ao organismo das abelhas causando peroxidação lipídica e, por consequência, redução da longevidade das abelhas (JUMARIE et al., 2017).

Em insetos, o ferro da dieta é absorvido pelas células do trato intestinal, sendo transportado do ápice até a membrana basal do epitélio do trato digestório, onde é transferido para a hemolinfa associado à transferrina, podendo ser utilizado pelas células ou armazenado nos tecidos na forma de ferritina (NICHOL et al., 2002).

No organismo das abelhas, o ferro é importante para a formação de grânulos de ferro no abdômen, que podem estar relacionados à percepção do campo magnético, importante para a atividade de forrageamento (GOULD, 1984; HSU & LI, 1993; HSU et al, 2007; LIANG et al, 2016; WRIGHT et al., 2017).

Sendo assim, a deficiência e excesso de ferro na dieta pode causar prejuízos individuais na fisiologia do organismo das abelhas e, portanto, em todo o enxame.

4.2. Suplementação artificial da dieta

Na natureza, o pólen e néctar coletado pelas abelhas geralmente supre as exigências nutricionais do enxame. Entretanto, em casos em que as fontes de alimento das abelhas são escassas ou pouco diversas, faz-se necessária a suplementação destes nutrientes (SOMERVILLE, 2005).

A suplementação artificial energética e proteica em períodos de escassez de alimentos no campo é uma prática já difundida na apicultura. Este manejo tem o objetivo de estimular o desenvolvimento do enxame para o início da florada, produzindo maior quantidade de abelhas campeiras e assim, permitindo maior capacidade de produção (BARBOSA et al., 2007). Os ingredientes utilizados por cada apicultor variam de acordo com os disponíveis na região. De

uma forma geral, os mais utilizados são farelo de soja para a suplementação proteica e xarope de açúcar para a suplementação energética (BARBOSA et al., 2007; SOMERVILLE, 2005).

Pouco se sabe a respeito da suplementação mineral na dieta das abelhas, porém estudos realizados por HERBERT & SHIMANUKI (1978) mostram que dietas artificiais suplementadas com 1% de cinzas de pólen aumentaram a área de cria quando comparado com os níveis 0,5, 2, 4 e 8%. Entretanto, a suplementação mineral deve ser realizada com cautela, visto que o excesso de minerais na dieta das abelhas pode ser prejudicial à longevidade das operárias e desenvolvimento das larvas (SOMERVILLE & NICOL, 2002).

Para que uma dieta seja eficiente, o conhecimento das exigências nutricionais é de extrema importância para que os nutrientes não sejam fornecidos em excesso ou em falta. No entanto, esta área de conhecimento sobre as abelhas ainda é limitado, o que dificulta a formulação de dietas sintéticas que suplementem a alimentação destes insetos de forma eficaz.

Sendo assim, estudos que investiguem os efeitos da suplementação de minerais na dieta de abelhas *Apis mellifera* são importantes para auxiliar na formulação de dietas artificiais que ajudarão a manter o potencial produtivo das colônias em períodos de escassez.

5. Hipóteses e Objetivos

A suplementação de ferro inorgânico durante o período de escassez de alimentos é capaz de alterar o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de ferro inorgânico durante o período de entressafra na morfologia das glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrízes provenientes de enxames africanizados.

O Capítulo II desta dissertação intitulado “**Effects of inorganic iron supplementation on the morphology of hypopharyngeal glands of six-day-old honey bees (*Apis mellifera*)**” será submetido à revista *Apidologie* e redigido conforme suas regras de publicação.

6. Referências bibliográficas

- ALAUX, C.; DUCLOZ, F.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y.. Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology letters**, p. rsbl20090986, 2010.
- ANDREWS, N. C. Forging a field: the golden age of iron biology. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 219-230, 2008.
- AUMEIER, P. Bioassay for grooming effectiveness towards *Varroa destructor* mites in Africanized and Carniolan honey bees. **Apidologie**, v. 32, n. 1, p. 81-90, 2001.
- BARBOSA A. L.; PEREIRA F. M.; VIEIRA NETO J. M.; RÊGO J. G. S.; LOPES M. T. R.; CAMARGO R. C. R. Criação de Abelhas: apicultura. 1 Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.
- BORTOLOTTI, L.; COSTA, C. Chemical communication in the honey bee society. 2014.
- BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 278-294, 2010.
- BOVI, T. S.; ONARI, P.; SANTOS, S. A. A.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. O. Apitoxin harvest impairs hypopharyngeal gland structure in *Apis mellifera* honey bees. **Apidologie**, v. 48, n. 6, p. 755-760, 2017.
- CRAILSHEIM, K. The flow of jelly within a honeybee colony. **Journal of Comparative Physiology B**, v.162, p.681-689, 1992.
- CRAILSHEIM, K.; SCHNEIDER, L. H. W.; HRASSNIGG, N.; BÜHLMANN, G.; BROSCHE, U.; GMEINBAUER, R.; SCHÖFFMANN, B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. **Journal of Insect Physiology**, v.38, n.6, p.409-419, 1992.
- CRIDGE, A.; HARROP, T.; LOVEGROVE, M. REMNANT, E.; DEARDEN, P. Nutrition and Epigenetic Change in Insects: Evidence and Implications. In: **Advances in Insect Physiology**. Academic Press, p. 31-54, 2017.

CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. 2009.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, n. 2, p. 67-70, 1996.

DEL LAMA, M.A.; SOUZA, R.O.; DURAN, X.A.A.; SOARES, A.E.E. Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile. **Hereditas**, Sweden, v.140, n.2, p.149-153, 2004.

DEGRANDI-HOFFMAN, G., CHEN, Y. HUANG, E. HUANG, M. H. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 9, p. 1184-1191, 2010.

DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 49-57, 2005.

DOLEZAL, A. G.; TOTH, A. L. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. **Current Opinion in Insect Science**, 2018.

EMBRAPA. **Organização social e desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera***. Embrapa meio norte. 2003. Disponível em: <goo.gl/Wc2C6c >. Acesso em: 26/02/2018.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 500, 2015.

GOULD, J. L. Magnetic field sensitivity in animals. **Annual Review of Physiology**, v. 46, p. 585-598, 1984.

GUPTA, R. K. Taxonomy and distribution of different honeybee species. In: **Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security**. Springer, Dordrecht, 2014. p. 63-103.

HATJINA, F.; PAPAETHIMIOU, C.; CHARISTOS, L.; DOGAROGLU, T.; BOUGA, M.; EMMANOUIL, C.; ARNOLD, G. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. **Apidologie**, v. 44, n. 4, p. 467-480, 2013.

Herbert Jr, E. W., & Shimanuki, H. (1978). Mineral requirements for brood-rearing by honeybees fed a synthetic diet. *Journal of Apicultural Research*, 17(3), 118-122.

HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Insect Physiology**, v.44, p.393-404, 1998.

HSU, C. Y.; LI, C. W. The ultrastructure and formation of iron granules in the honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Experimental Biology**, v.180, p.1-13, 1993.

HSU, C. Y.; KO, F. Y.; LI, C. W. FANN, K. LUE, J. T. Magnetoreception system in honeybees (*Apis mellifera*). **PloS one**, v. 2, n. 4, p. e395, 2007.

IMDORF, A., RICKLI, M., KILCHENMANN, S. B., WILLE, H. Nitrogen and mineral constituents of honey bee worker brood during pollen shortage. **Apidologie**, v. 29, n. 4, p. 315-325, 1998.

JUMARIE, C.; ARAS, P.; BOILY, M. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. **Chemosphere**, v. 168, p. 163-170, 2017.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 478, 2011.

KAPLAN, M.; KARAOGLU, O.; EROGLU, N. SILICI. S. Fatty acid and proximate composition of bee bread. **Food technology and biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 497, 2016.

KELLER, I.; FLURI, P.; IMDORF, A. Pollen nutrition and colony development in honey bees: part 1. **Bee World**, v. 86, n. 1, p. 3-10, 2005.

KUBO, T.; SASAKI, M.; NAKAMURA, J.; SASAGAWA, H.; OHASHI, K. TAKEUCHI, H.; NATORI, S. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. **The Journal of Biochemistry**, v. 119, n. 2, p. 291-295, 1996.

LIANG, C. H.; CHUANG, C. L.; JIANG, J. A.; YANG, E. C. Magnetic Sensing through the Abdomen of the Honey bee. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

LOCKE, Michael; NICHOL, H. Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. *Annual review of entomology*, v. 37, n. 1, p. 195-215, 1992.

MEDINA-FLORES, C. A.; GUZMÁN-NOVOA, E.; HAMIDUZZAMAN, M. M.; ARÉCHIGA-FLORES, C. F.; LÓPEZ-CARLOS, M. A. Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in Mexico. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 7282-7293, 2014.

NAUG, D. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. **Biological Conservation**, v. 142, n. 10, p. 2369-2372, 2009.

NETO, M. A. C. S.; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. (Ed.). **Topicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. Itabajara da Silva Vaz Junior, 2013.

NICHOL, H.; LAW, J. H.; WINZERLING, J. J. Iron metabolism in insects. **Annual review of entomology**, v. 47, n. 1, p. 535-559, 2002.

OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age- dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). **The FEBS Journal**, v. 265, n. 1, p. 127-133, 1999.

OLIVEIRA, M.E.C. **Polietismo e detecção de vírus deformador de asas em abelhas *Apis mellifera scutellata* (Africanizada) e *Apis mellifera ligustica* (Europeia)**. 2013. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências/ Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PERNAL, S.F.; CURRIE, R.W. Pollen quality of fresh na 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v.31, p.387-409, 2000.

HOULSTON, T. H.; CANE, J. H.; BUCHMANN, S. L.. What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen–pistil interactions, or phylogeny?. **Ecological monographs**, v. 70, n. 4, p. 617-643, 2000.

SEELEY, T. D. **The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies**. Harvard University Press, 1995.

SOBRAL, F. et al. Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in northeast Portugal. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 248, 2017.

SOETAN, K. O.; OLAIYA, C. O.; OYEWOLE, O. E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African journal of food science**, v. 4, n. 5, p. 200-222, 2010.

SOMERVILLE, D. **Fat Bees Skinny Bees. A manual on honey bee nutrition for beekeepers.** Australian Government Rural Industries Research and Development Corporation, Goulburn. 2005. 142p.

SOMERVILLE, D. C. & NICOL, H. I. Mineral content of honeybee-collected pollen from southern New South Wales. **Australian journal of experimental agriculture**, v. 42, n. 8, p. 1131-1136, 2002.

TOFILSKI, A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. **Apidologie**, v. 39, n. 5, p. 558-563, 2008.

TRINDADE, M. S. A.; SOUSA, A. H.; VASCONCELOS, W. E.; FREITAS, R. S.; SILVA, A. M. A.; PEREIRA, D. S.; MARACAJÁ, P. B. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, 2004.

WIESE, H. **Apicultura: Novos tempos.** 2ª ed. Guaíba: Agrolivros, 2005. 378p.

WINSTON, M. L. The biology and management of Africanized honey bees. **Annual Review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 173-193, 1992.

WRIGHT, G. A.; NICOLSON, S. W.; SHAFIR, S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. **Annual review of entomology**, v. 63, 2017.

YAN, H.; SIMOLA, D. F.; BONASIO, R.; LIEBIG, J.; BERGER, S. L.; REINBERG, D. Eusocial insects as emerging models for behavioural epigenetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 10, p. 677, 2014.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15217, 2017.

CAPÍTULO II

Effects of inorganic iron supplementation on the morphology of hypopharyngeal glands of six-day-old honey bees (*Apis mellifera*)

Abstract

Iron is a trace mineral important to many metabolic processes such as oxygen transport, maintenance of the immune system, electron transfer and DNA and RNA synthesis. The aim of this research was to supplement inorganic iron during the offseason, and evaluate the effects on the morphology of hypopharyngeal glands of 6-day-old honey bees via morphological analysis of the acini. Twelve nucleus colonies were distributed in four groups: T0Fe, sugar syrup with no supplementation of inorganic iron; T25Fe, sugar syrup with supplementation of 25 mg L⁻¹; T50Fe, with 50 mg L⁻¹ and T100Fe, with 100 mg L⁻¹. Ten six-day-old bees were collected every month from each treatment and its heads were embedded in metachrylate resin, which were cut using a rotating microtome to conduct the morphological analysis of the hypopharyngeal glands. It can be seen that the morphology of hypopharyngeal glands of 6-day-old honey bees supplemented with different levels of inorganic iron during the offseason did not significantly change ($p < 0.05$). It is possible that the ferrous state of iron in the syrup was oxidized to the ferric state, an insoluble form of free iron, making its absorption more difficult. In conclusion, the supplementation of inorganic iron during the offseason did not significantly change the development of hypopharyngeal glands of 6-day-old nurse bees.

Key-words: diet, mineral, nutrition, offseason.

1. INTRODUCTION

Although the diet of the bees is focused in carbohydrates and proteins, minerals are fundamental to the normal functioning of the living-organisms, acting as structural components and participating in important metabolic processes (Soetan et al., 2010). Iron is a trace mineral important to many metabolic processes such as oxygen transport, maintenance of the immune system, electron transfer and DNA and RNA synthesis (Soetan et al., 2010; Locke & Nichol, 1992). Iron is also important to the formation of iron granules in the abdomen of the bees, which might be involved with the perception of the Earth's magnetic field, being important during the foraging activity (Hsu & Li, 1993; Gould, 1984; Hsu et al, 2007; Liang et al, 2016; Wright et al., 2018).

Therefore, iron deficiency in the diet could negatively impact in bees' physiology, and consequently, impair the whole colony. The study of variables that could affect the development

of the hypopharyngeal glands is crucial for better understanding the biology and behaviour of the colony. Although many research confirm the importance of proteins to honey bees and its effects on hypopharyngeal glands and colony maintenance (Standifer, 1960; Crailsheim et al., 1992; Hrassnigg & Crailsheim, 1998; Pernal & Currie, 2000; De Grandi-Hoffman et al., 2010), few is known concerning the response of different levels of minerals in the diet.

It is known that nutrients of available pollen significantly changes according to the species and seasons of the year (Somerville & Nicol, 2002; Di Pasquale et al., 2013; Keller et al., 2005). In addition, unpublished data from our research group showed lower iron concentrations in bee-collected pollen during winter when compared to other months.

The glandular system of honey bees is essential to the maintenance of the colony. Many behaviours inside and outside of the hive are directly connected to its secretions, such as the defence and construction of the hive, queen rearing, communication among individuals and trophallactic interactions (Seeley, 1995).

Royal jelly is a substance is produced by hypopharyngeal and mandibular glands, located in the head of nurse honey bees. It represents a complex substance composed of water, sugars, proteins, lipids, vitamins and minerals. It is used to feed all larvae younger than 3 days-old and for the queen during all its life (Deseyn & Billen, 2005). In addition, it is responsible for caste differentiation, stimulating the ovaries and accelerating the development of the body of the new queen (Kamakura, 2011).

The secretory activity of hypopharyngeal glands are correlated to the size of acini. Thus, most developed glands have greater capacity of producing royal jelly (Deseyn & Billen, 2005). The hypopharyngeal glands reach their maximum size and activity at the sixth day of age of the bee after the development of the glands is induced by the consumption of large quantities of pollen (Brodschneider & Crailsheim, 2010; Keller et al., 2015; Corby-Harris, 2016), which is the major source of proteins, lipids, vitamins and minerals to the hive (Brodschneider & Crailsheim, 2010; Wright et al., 2018).

Thus, the aim of this research was to supplement inorganic iron during the offseason and verify the effects in the number and area of acini of hypopharyngeal glands of six-day-old honey bees.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Treatment groups

Twelve colonies of honey bees (*Apis mellifera*) housed in nucleous with similar numbers of brood and food combs were used. The colonies were divided in four groups: T0Fe, which received sugar syrup with no iron supplementation; T25Fe, sugar syrup with supplementation of

25 mg L⁻¹; T50Fe, with 50 mg L⁻¹ and T100Fe, with 100 mg L⁻¹ of inorganic iron. These concentrations were chosen based on suggestions of previous studies (50 mg/kg) by Hebert & Shimanuki, 1978 and concentrations found in pollen from different species (14-520 mg/kg) (Somerville & Nicol, 2002).

The source used was ferrous sulfate (FeSO₄·7H₂O), which was diluted in sugar syrup (1:1) and fed to the hives using an entrance feeder during the offseason period.

2.2. Collection of nurse bees and morphological analysis

Ten six-day-old nurse bees were collected every month using methodology described by Bovi et al., (2017). The heads of ten 6-day-old nurse bees were dehydrated in a series of ethanol and embedded in metachrylate resin (HistoResin©; Leica Microsystems) following the methodology described by Zaluski et al. (2018). Using a rotating microtome, semi-serial sections of 3µm thick were made with a 30µm gap in between to guarantee that the acini were measured only once. Slides were stained with haematoxylin and eosin. The images of the slides were captured using a Leica DMC 2900 camera connected to a Leica DM 2500 microscope and analysed with the software Leica QWin V3.

All the acini of hypopharyngeal glands were counted and measured. The values (µm²) then were divided in categories as described by Zaluski et al. (2018), which were: <29,999; 30,000 – 59,999; and 60,000 – 89,999µm² for statistical analysis.

2.3. Statistical analysis

The data was compared using non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's test using GraphPad Prism 6. Means were considered statistically different when $p < 0.05$.

3. RESULTS

The secretory units of the hypopharyngeal glands of 6-day-old nurse bees supplemented with different levels of inorganic iron are shown in Figure 1.

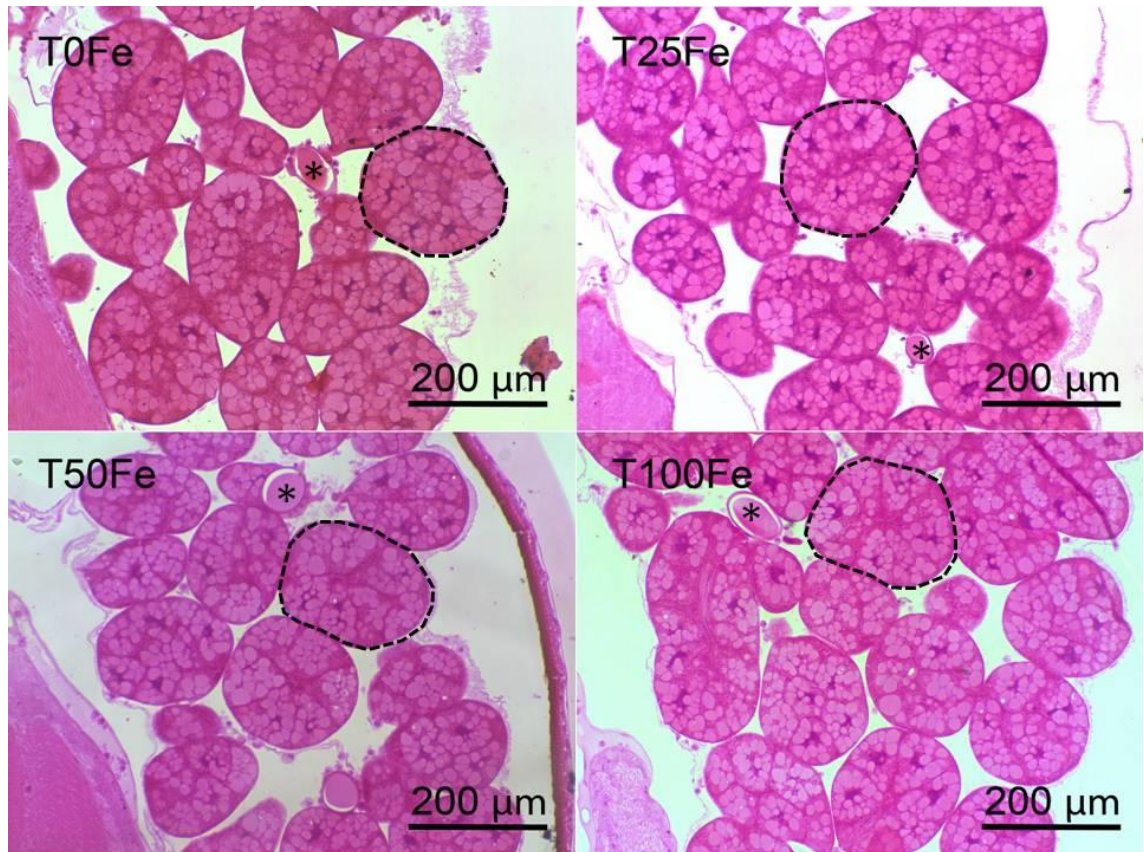


Figure 1. Hystological section of the hypopharyngeal glands of 6-day-old nurse bees (*Apis mellifera* L.) during the offseason. Ducts are marked with asterisks (*) and acini are circled to emphasize. T0Fe: without iron supplementation; T25Fe: 25 mg L⁻¹; T50Fe: 50 mg L⁻¹; and T100Fe: 100 mg L⁻¹. Stained with Haematoxylin and Eosin.

The number and mean area (μm²) of acini in the hypopharyngeal glands of 6-day-old nurse bees are shown in Figure 2.

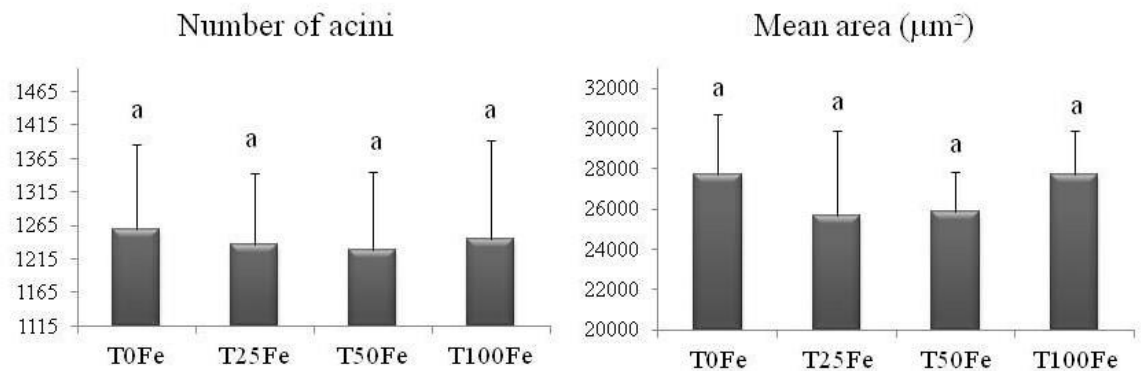


Figure 2. Number and mean area of the acini of hypopharyngeal glands of 6-day-old nurse bees during the offseason. T0Fe: Hives without supplementation; T25Fe: 25 mg L⁻¹; T50Fe: 50 mg L⁻¹; T100Fe: 100 mg L⁻¹ of inorganic iron supplementation. Different letters indicate significant differences between treatments (Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Dunn's Test, $p < 0.05$).

There was no significant difference among treatments in the number and area of acini of hypopharyngeal glands of 6-day-old honey bees supplemented with 0, 25, 50 and 100mg L⁻¹ of inorganic iron.

The numbers of acini of hypopharyngeal glands within the categories $<29.999 \mu\text{m}^2$, $30.000 - 59.999 \mu\text{m}^2$ and $>60.000 \mu\text{m}^2$ are represented in Figure 3.

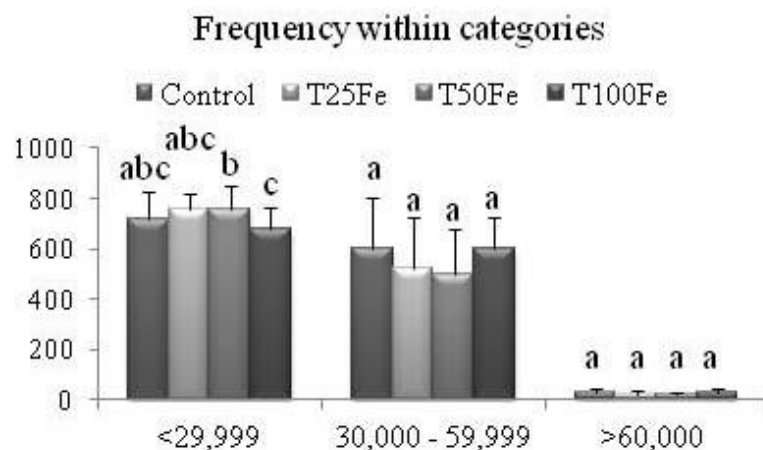


Figure 3. Quantity, within categories ($<29.999 \mu\text{m}^2$, $30.000 - 59.999 \mu\text{m}^2$ and $>60.000 \mu\text{m}^2$), of acini of hypopharyngeal glands of 6-day-old nurse bees during the offseason. T0Fe: Hives without supplementation; T25Fe: 25 mg L⁻¹; T50Fe: 50 mg L⁻¹; T100Fe: 100 mg L⁻¹ of inorganic iron supplementation. Different letters indicate significant differences between treatments (Kruskal-Wallis one-way ANOVA, followed by Dunn's Test, $p < 0.05$).

Although group T100Fe showed significantly fewer number of acini within category $<29,999 \mu\text{m}^2$ when compared to T50Fe, no significant differences were observed when the treatments were compared to T0Fe.

4. DISCUSSION

Overall, the supplementation of inorganic iron, in the experimental conditions of this study, did not show evident effects in the structure of the hypopharyngeal glands, even in similar concentrations suggested by Hebert & Shimanuki (1979) (50 mg kg^{-1}) and those found in honey bee-collected pollen samples from different species of plants (14 to 520 mg kg^{-1}) by Somerville & Nicol (2002).

The hypopharyngeal glands of nurse bees secrete part of the components of royal jelly (Wright, 2017), reaching its peak of development at the 6th day after emergence of brood cell (Deseyn & Bilen, 2005). Deficiencies in quality or quantity of this secretion could significantly interfere on the queen's nourishment, and consequently, in all balance of the hive.

At the end of the experiment, the frequency within categories between T0Fe and other groups did not significantly differ. However, it could be observed that T100Fe showed significantly lower number of acini within category $<29,999 \mu\text{m}^2$ when compared to T50Fe. Given the fact that acini size in nurse bees is correlated with their activity (Deseyn & Bilen, 2005; Hrassnigg & Crailsheim, 1998; Škerl & Gregorc, 2015), groups that presents greater number of acini within the categories $30,000\text{-}59,999 \mu\text{m}^2$ and $>60,000 \mu\text{m}^2$ and lower number of acini within the category $<29,999 \mu\text{m}^2$ can be considered more active. In spite of that, the mean areas (μm^2) of the acini of the groups were not affected by the different distribution among categories.

There are many factors that might modulate the development of the glands, especially in experiments conducted in the field. Recent studies showed that stressful managements (Bovi et al., 2017), exposition to agrochemicals (Hatjina, et al., 2013; Zaluski et al., 2017), quantity and quality of food (Di Pasquale et al., 2013; Omar et al., 2016) and mite infestations (Ayoub et al., 2015) are capable of impairing the structure of the hypopharyngeal glands. In addition, although iron is an essential micronutrient in the organism of insects such as honey bees (Wright et al., 2017), high concentrations of free iron can be toxic to the organism, causing lipid peroxidation and thus, damages to the structure of cell wall leading to cell death (Jumarie et al. (2017)). These effects, however, could not be observed in the morphology of the hypopharyngeal glands.

A possible explanation to absence of the differences could also be the low availability of inorganic iron used in this experiment. The source of inorganic iron used in this study was ferrous sulfate diluted in sugar syrup. It is possible that the ferrous state of iron (Fe^{++}) in the

syrup was oxidized to ferric state (Fe^{+++}), an insoluble form of free iron, making its absorption more difficult (López & Martos, 2004). In order to maintain the iron in its reduced form, the addition of an antioxidant such as the ascorbic acid (Ferrero et al., 2017) is recommended. However, this component was not added in the sugar syrup used in this experiment. It is plausible that the inorganic iron used in this experiment was not absorbed in a sufficient quantity capable of affecting the hypopharyngeal glands and induce any detectable effect in its morphology.

Another possible explanation could be the transport of absorbed iron to the abdomen of the bees. A previous unpublished study conducted by our research group investigated the effects of the same levels of inorganic iron in the organism of nurse bees and in the proteomic profile of royal jelly. It could be observed an increase of iron content in the abdomen of the bees, possibly due to the formation of iron granules in the abdomen of the bees, which are thought to be responsible for magnetoreception, that is, the sensitivity of Earth's magnetic field, important during foraging activities (Liang et al., 2016). In addition, it was observed an improvement in the quality of royal jelly produced by colonies supplemented with 100mg L^{-1} of inorganic iron, as it showed an increase in protein content and number of protein spots in two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) analysis. These results suggest that the supplementation of 100 mg L^{-1} of inorganic iron could be used in periods of shortage of pollen to improve the quality of royal jelly and the colony's nutrition without impairing the morphology of hypopharyngeal glands of 6-day-old worker bees.

Another plausible reason the inorganic iron supplementation did not affect the hypopharyngeal glands of 6-day-old honey bees is that minerals appears to be less essential to their development (Herbert & Shimanuki, 1978). This could explain the fact that the morphology was not affected by the iron supplementation, and yet, the quality of royal jelly and iron content in the abdomen significantly changed in the same conditions of this experiment.

In conclusion, at the end of the experiment, the supplementation of inorganic iron during the offseason did not significantly change the development of hypopharyngeal glands of 6-day-old nurse bees.

5. REFERENCES

- Ayoub, Z. N., Ahmed, D. S., Mosa, M. H., & Abdulla, M. (2015). Impact of Varroa mite infestation on the mandibular and hypopharyngeal glands of honey bee workers. *Acarina. Русский акарологический журнал*, 23(1), 92-97.
- Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294.
- Bovi, T. S., Onari, P., Santos, S. A., Justulin, L. A., & Orsi, R. O. (2017). Apitoxin harvest impairs hypopharyngeal gland structure in *Apis mellifera* honey bees. *Apidologie*, 48(6), 755-760.
- Corby-Harris, V., Meador, C. A., Snyder, L. A., Schwan, M. R., Maes, P., Jones, B. M., WALTON, A., Anderson, K. E. (2016). Transcriptional, translational, and physiological signatures of undernourished honey bees (*Apis mellifera*) suggest a role for hormonal factors in hypopharyngeal gland degradation. *Journal of insect physiology*, 85, 65-75.
- Crailsheim, K., Schneider, L. H. W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., & Schöffmann, B. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *Journal of insect Physiology*, 38(6), 409-419.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E., & Huang, M. H. (2010). The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology*, 56(9), 1184-1191.
- Deseyn, J., & Billen, J. (2005). Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 36(1), 49-57.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchali, S., Brunet, J. L., Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PloS one*, 8(8), e72016.
- Gould, J. L. (1984). Magnetic field sensitivity in animals. *Annual review of physiology*, 46(1), 585-598.

- Hatjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L., Dogaroglu, T., Bouga, M., Emmanouil, C., & Arnold, G. (2013). Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie*, 44(4), 467-480.
- Herbert Jr, E. W., & Shimanuki, H. (1978). Mineral requirements for brood-rearing by honeybees fed a synthetic diet. *Journal of Apicultural Research*, 17(3), 118-122.
- Hrassnigg, N., & Crailsheim, K. (1998). The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 44(5-6), 393-404.
- Hsu, C. Y., & Li, C. W. (1993). The ultrastructure and formation of iron granules in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology*, 180(1), 1-13.
- Hsu, C. Y., Ko, F. Y., Li, C. W., Fann, K., & Lue, J. T. (2007). Magnetoreception system in honeybees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 2(4), e395.
- Jumarie, C., Aras, P., & Boily, M. (2017). Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere*, 168, 163-170.
- Kamakura, M. (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348), 478.
- Keller, I., Fluri, P., & Imdorf, A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees: part 1. *Bee World*, 86(1), 3-10.
- Liang, C. H., Chuang, C. L., Jiang, J. A., & Yang, E. C. (2016). Magnetic sensing through the abdomen of the honey bee. *Scientific reports*, 6, 23657.
- Locke, M., & Nichol, H. (1992). Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. *Annual review of entomology*, 37(1), 195-215.
- López, M. A., & Martos, F. C. (2004). Iron availability: An updated review. *International journal of food sciences and nutrition*, 55(8), 597-606.
- Omar, E., Abd-Ella, A. A., Khodairy, M. M., Moosbeckhofer, R., Crailsheim, K., & Brodschneider, R. (2017). Influence of different pollen diets on the development of

hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 48(4), 425-436.

Pernal, S. F., & Currie, R. W. (2000). Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31(3), 387-409.

Seeley, T. D. (2009). *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press.

Škerl, M. I. S., & Gregorc, A. (2015). Characteristics of hypopharyngeal glands in honeybees (*Apis mellifera carnica*) from a nurse colony. *Slovenian Veterinary Research*, 52(2).

Soetan, K. O., Olaiya, C. O., & Oyewole, O. E. (2010). The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants-A review. *African journal of food science*, 4(5), 200-222.

Somerville, D. C., & Nicol, H. I. (2002). Mineral content of honeybee-collected pollen from southern New South Wales. *Australian journal of experimental agriculture*, 42(8), 1131-1136.

Standifer, L. N., McCaughey, W. F., Todd, F. E., & Kemmerer, A. R. (1960). Relative availability of various proteins to the honey bee. *Annals of the Entomological Society of America*, 53(5), 618-625.

Wright, G. A., Nicolson, S. W., & Shafir, S. (2017). Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annual review of entomology*, (0).

Zaluski, R., Justulin, L. A., Orsi, R. O. (2017). Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Scientific reports*, 7(1), 15217.

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES

Ao final deste experimento, verificamos que a suplementação de ferro inorgânico não teve efeitos na morfologia das glândulas hipofaringeanas de abelhas de seis dias de idade.

No entanto, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, ainda não publicados, mostraram que a suplementação de 100 mg L^{-1} de ferro aumentou o teor proteico e número de spots proteicos da geleia real, sugerindo que este nível de ferro inorgânico em dietas artificiais para abelhas poderia ser utilizado.

Espera-se, com este resultado, contribuir com o desenvolvimento de uma dieta artificial que complemente a nutrição das abelhas em períodos em que os recursos disponíveis no campo são escassos ou pouco diversos.

O número reduzido de trabalhos na área da nutrição e morfologia de glândulas de abelhas foi uma dificuldade encontrada durante a realização do presente estudo, bem como o papel do ferro no organismo dos insetos. Sendo assim, futuros estudos com diferentes fontes e concentrações de ferro são sugeridos para avaliar o efeito da suplementação nas glândulas hipofaringeanas e na fisiologia geral das abelhas.