

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITOS DO TRANSPORTE DE COLÔNIAS DE ABELHAS *Apis mellifera* L. NA
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNOLÓGICO**

MAURICE FABIAN SCALOPPI

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

Botucatu – SP

Setembro – 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITOS DO TRANSPORTE DE COLÔNIAS DE ABELHAS *Apis mellifera* L. NA
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNOLÓGICO**

MAURICE FABIAN SCALOPPI

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

COORIENTADOR: Dr. Samir Moura Kadri

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

Botucatu – SP

Setembro – 2019

S282e Scaloppi, Maurice Fabian
Efeitos do transporte de colônias de abelhas *Apis mellifera* L. na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico / Maurice Fabian Scaloppi. -- Botucatu, 2019
49 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Coorientador: Samir Moura Kadri

1. Abelha Criação. 2. Animais transporte. 3. Expressão gênica. 4. Stress (fisiologia). I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Elizabeth Ambiel Pires e Edmar José Scaloppi, com todo amor.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa de estudos concedida (Código de Financiamento 001).

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, pela oportunidade, paciência e válidos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP, por disponibilizar o laboratório para as análises genéticas.

Ao Dr. Samir Moura Kadri, pela amizade e todo suporte nas análises genéticas.

Ao funcionário do setor de apicultura e grande amigo Maurício César Silva.

Aos amigos do Grupo NECTAR: Daniel Cavalcante Brambila de Barros, Marcelo Polizel Camilli, Juliana Sartori Lunardi, Gabriel Moreno Martineli e Aimê de Almeida Longuini

“No que diz respeito ao empenho,
ao compromisso, ao esforço, à
dedicação, não existe um meio
termo. Ou você faz uma coisa
bem feita, ou não faz.”

Ayrton Senna

BIOGRAFIA DO AUTOR

Maurice Fabian Scaloppi nasceu em Logan, Utah, Estados Unidos da América, em 18 de abril de 1990. Mudou-se para Botucatu/SP aos três anos de idade com seus pais, Edmar José Scaloppi e Elizabeth Ambiel Pires e sua irmã, Julie Christine Scaloppi.

Aos dezessete anos de idade começou sua experiência com apicultura como apicultor assistente de seu professor da Aitiara Escola Waldorf, Márcio Piedade Vieira (Kaco), atuando na produção de mel e remoção de enxames.

Em 2009, mudou-se para Piracicaba/SP ao ingressar no curso de Ciências Econômicas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), graduando-se em 2014. Nesse período, foi estagiário do Laboratório de Insetos Úteis do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, atuando na área de apicultura em ambiente de campo e laboratório. Em 2011, iniciou sua própria criação de abelhas *Apis mellifera* no sítio São João e com apoio de seus pais, em Botucatu/SP. Em 2012, ingressou no curso de Engenharia Agrônoma na mesma instituição, concluindo-o em 2017. Durante a graduação, foi Assistente de Pesquisa da Ohio Agricultural Research and Development Center, Ohio State University (EUA), na área de apicultura, sob orientação do Prof. Reed Johnson, Ph.D, durante 6 meses.

Em fevereiro de 2017, integrou o Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional (NECTAR) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, (FMVZ/UNESP) *campus* Botucatu, como estagiário, ingressando no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ/UNESP sob orientação do Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, em agosto do mesmo ano. Seu trabalho de mestrado teve como objetivo avaliar os efeitos do transporte de colônias de abelhas *Apis mellifera* na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico.

Sumário

ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE GRÁFICOS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	124
CAPÍTULO I	13
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
1.1. Importância e biologia das abelhas <i>Apis mellifera</i>	14
1.2. O surgimento da apicultura no mundo e no Brasil	16
1.3. Modalidades de apicultura	18
1.4. Estresse no transporte de colônias	19
1.5. Sistema imunológico da <i>Apis mellifera</i>	20
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO II	30
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1. Preparo e transporte das colônias	34
2.2. Análise da expressão de genes	35
2.3. Avaliação da mortalidade de abelhas	38
2.4. Avaliação do desenvolvimento populacional	38
2.5. Análise estatística	39
3. RESULTADOS	39
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO III	48
IMPLICAÇÕES	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores de genes do sistema imunológico (defensina-1, abaecina e HSP70) e constitutivo (actina) de abelhas <i>Apis mellifera</i> submetidas a diferentes durações de tempo de transporte.	37
---	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Expressão relativa dos genes defensina-1 (A), abaecina (B) e HSP70 (C) em abelhas <i>Apis mellifera</i> submetidas ao transporte por 1 hora (T1) e 2 horas (T2) e coletadas 0, 24 e 72 horas após.....	40
Gráfico 2. Mortalidade diária média de abelhas <i>Apis mellifera</i> não transportadas (T0) e submetidas ao transporte por 1 hora (T1) e 2 horas (T2).....	41
Gráfico 3. Área de cria fechada, área de cria aberta e área de alimento (cm ²) antes e depois do transporte.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagramas simplificados das vias metabólicas (A) Toll e (B) Imd, que culminam na produção dos peptídeos antimicrobianos.....	22
---	----

CAPÍTULO I

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. Importância e biologia das abelhas *Apis mellifera*

O surgimento das angiospermas, há cerca de 130 milhões de anos, possibilitou uma alteração no hábito alimentar de muitos insetos. Os grãos de pólen presentes nas flores, que são os gametas masculinos das plantas, passaram a ser consumidos como fonte de proteína e, desta forma, insetos predadores mudaram seu hábito alimentar (Hymenoptera: Apidae) (MICHENER, 2007). Ao buscarem os grãos de pólen como alimento, esses insetos contribuíam para a polinização de diversas espécies vegetais, surgindo assim uma relação planta-inseto que ocasionou a coevolução de inúmeras espécies, onde insetos polinizadores colaboravam para a reprodução das espécies vegetais; enquanto estas forneciam alimento por meio do pólen e, posteriormente, de outros recursos, tais como o néctar e óleos essenciais (RECH; AVILA-JUNIOR; SCHLINDWEIN, 2014).

Nesse sentido, diversos grupos de insetos, como besouros, borboletas, mariposas e particularmente as abelhas, apresentam enorme importância ecológica por contribuírem com a polinização de muitas espécies vegetais. Estima-se que cerca de 90% de todas as espécies de plantas ao redor do mundo possuam algum grau de dependência de agentes polinizadores bióticos, assim como 70% das espécies vegetais utilizadas na alimentação humana (KLEIN et al., 2007).

A diminuição na população de polinizadores tem prejudicado ou mesmo inviabilizado a polinização de diversas culturas agrícolas, além de comprometer a manutenção e regeneração de matas nativas. A importância ecológica da polinização proporcionada pelas abelhas de forma geral e a capacidade de se manejar colônias de abelhas da espécie *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) lhe confere grande importância ambiental e econômica por suprir a necessidade de polinizadores em diversas culturas agrícolas, colaborando para a produção de alimentos em todo o mundo (GARIBALDI et al., 2014; GOULSON et al., 2015).

Existem muitos casos de alta especificidade na relação entre espécies vegetais e agentes polinizadores. No entanto, as abelhas *A. mellifera* são altamente generalistas, não possuindo nenhuma especificidade conhecida com alguma planta. Mesmo sendo generalistas,

essas abelhas mantém fidelidade específica na coleta de néctar, buscando flores da mesma espécie em suas viagens de forrageamento, até que não haja mais disponibilidade ou alguma outra fonte seja mais vantajosa (WESTERKAMP, 1991). Apesar de não serem as mais eficientes na polinização de diversas culturas agrícolas, possuem atributos que proporcionam grande importância como polinizadoras de forma geral. Dentre essas características, tem-se a possibilidade de se deslocar colônias com facilidade e amplo raio de forrageamento (FREE, 1993).

Entre as mais de 20.000 espécies de abelhas conhecidas, a *A. mellifera* apresenta reconhecida importância mundial. São pertencentes à tribo Apini, que engloba um único gênero com 10 espécies e 28 subespécies (ENGEL, 1999; ARIAS; SHEEPARD, 2005; MICHENER, 2007). Essas abelhas apresentam eussocialidade, considerado o mais alto nível de organização social entre os insetos, que é caracterizado por três fatores: cuidado coletivo com a prole; divisão social de trabalho em castas com indivíduos morfológicamente distintos; e sobreposição de gerações (WILSON, 1971).

As *A. mellifera* possuem três castas distintas, sendo uma rainha, milhares de operárias e centenas de zangões, dependendo das condições da colônia. O desenvolvimento reprodutivo da *A. mellifera* é haplodiploide com partenogênese arrenótoca, ou seja, as fêmeas são geradas a partir de ovos fecundados (diplóides) e os machos de óvulos não fecundados (haplóides). A rainha é a única fêmea fértil da colônia, sendo responsável pela oviposição e pela manutenção da ordem social por meio da emissão de feromônios específicos. Após sua emergência, realiza geralmente único voo nupcial, onde é fecundada em média por 12 zangões, que preenchem com sêmen uma estrutura denominada espermateca, para ser utilizado durante toda sua vida (TARPY; NIELSEN, 2002). A fecundação com múltiplos machos (poliandria) permite redução no risco de consanguinidade e redução na chance de toda prole advir de zangões geneticamente menos favoráveis, permitindo maior diversidade genética intracolônia. Além disso, algumas teorias sugerem que essa diversidade genética aumenta a resistência da colônia a doenças (GERULA et al., 2016). Uma rainha vive em média de 3 a 4 anos. Entretanto, na

apicultura comercial, é comum a reposição de rainhas após 1 ou 2 anos, quando sua taxa de oviposição diminui (AMIRI et al., 2017).

As operárias, também fêmeas, realizam todas as tarefas da colônia. A divisão de trabalho ocorre com uma sequência de sucessivas tarefas ao longo de sua vida, que estão relacionadas ao seu desenvolvimento fisiológico (polietismo etário) (NATSOPOULOU; MCMAHON; PAXTON, 2016). Em média, do 1º ao 3º dia de vida, desempenham a função de limpeza dentro da colônia. Do 3º ao 12º dia de vida, as glândulas responsáveis pela produção de geleia real (hipofaringeana e mandibular) atingem seu pico de desenvolvimento, tornando-as, assim, abelhas nutrizas, alimentando as larvas e também abelhas adultas. Do 12º ao 19º dia de vida, as glândulas cerígenas, que secretam cera, estão completamente desenvolvidas. Atuam, então, como abelhas construtoras ou engenheiras. No 20º dia de vida, seu reservatório de veneno está completo, assim, executam a tarefa de guardiãs, protegendo e verificando o fluxo de entrada na colônia. A partir do 21º dia de vida e até sua morte, que ocorre por volta do 42º dia, cumprem a tarefa de campeiras ou forrageadoras, buscando alimento (néctar e pólen), resina e água para toda colônia (WINSTON, 1987).

Os zangões são os únicos machos da colônia e possuem função reprodutiva, acasalando com rainhas virgens. São responsáveis pela propagação do conteúdo genético da colônia. Como sua criação e manutenção exigem um alto custo energético, são criados pela colônia quando há abundância nas reservas de alimento. Atingem a maturidade sexual com cerca de 18 dias e seu tempo de vida pode variar bastante, mas no máximo por cerca de 80 dias ou até realizarem a reprodução, quando perdem o aparelho reprodutor após a ejaculação morrendo em seguida (CURRIE, 1987; WINSTON, 1987).

1.2. O surgimento da apicultura no mundo e no Brasil

Hipóteses sugerem como centro de origem da espécie *A. mellifera* as regiões do Oriente Médio e do nordeste da África, com posteriores irradiações distintas para Europa e Ásia (CRIDLAND; TSUTSUI; RAMÍREZ, 2017). A associação da humanidade com as abelhas ocorre há milhares de anos. Pinturas rupestres encontradas na Espanha datadas cerca

de 8.000 anos, possivelmente retratam um ser humano retirando mel de uma colônia. A presença das abelhas nas culturas de povos antigos também é encontrada em escavações arqueológicas nas regiões da Eurásia e no norte da África. Nesses locais, há registros de potes de barro usados como colmeias em Israel que datam dos séculos X e IX a.C. e de iconografias com abelhas no Egito, de cerca de 2400 a.C. (MAZAR et al., 2008; ROFFET-SALQUÉ et al., 2016).

No entanto, uma das grandes revoluções da apicultura (denominação da criação racional de abelhas *A. mellifera*) ocidental ocorreu em 1851 com a invenção da caixa de quadros móveis pelo Reverendo Lorenzo Langstroth nos Estados Unidos da América. Os quadros são espaçados em cerca de 9 mm, que configura o “espaço-abelha”, permitindo o fluxo e trabalho das abelhas entre os quadros. O uso dessa caixa possibilitou averiguar as condições do ninho e extrair mel e outros produtos apícolas sem causar avarias e comprometer o desenvolvimento da colônia (CRANE, 1999).

As abelhas *A. mellifera* foram introduzidas no Brasil no século XIX, sendo que a primeira introdução data de 1839, pelo padre jesuíta Antônio Carneiro na cidade do Rio de Janeiro, que trouxe colônias da subespécie *A. m. mellifera*. Subsequentemente, ocorreram outras introduções de estirpes europeias, entre essas a *A. m. ligustica* (NOGUEIRA-NETO, 1964).

Em 1956, visando o melhoramento genético da *A. mellifera* no Brasil, rainhas da subespécie *A. m. scutellata* foram introduzidas no país por um programa conduzido pelo Prof. Warwick Kerr. As colônias africanas foram acidentalmente liberadas no meio e cruzaram com as colônias europeias, gerando um polihíbrido denominado de abelha “africanizada”. Essas abelhas têm como característica alta taxa de reprodução, que promove expressivo comportamento enxameatório, causando assim sua rápida dispersão por grande parte do continente americano, atingindo os EUA em 1990 (PINTO et al., 2005).

Além desse aspecto, a genética da subespécie africana apresenta comportamento altamente defensivo, que manifestou dominância sobre as genéticas europeias, gerando uma adaptação no manejo dessas abelhas no Brasil e que se estendeu aos outros países americanos

para onde a abelha africanizada migrou. Esse manejo consistiu principalmente no uso de equipamento de proteção individual robusto, com macacão, luvas e botas compostos por materiais adequados; na maior necessidade no uso da fumaça; e na manutenção de apiários localizados a distâncias seguras para pessoas e animais (WINSTON, 1992; DE JONG, 1996).

1.3. Modalidades de apicultura

Atualmente, a apicultura apresenta duas principais modalidades: fixa ou estacionária e migratória. A primeira consiste em manter permanentemente o apiário no mesmo local. Deste modo, a produção das colônias é limitada pela oferta de recursos (néctar, pólen, resina e água), determinada pelo potencial florístico local. Assim, o aumento da produção depende do enriquecimento floral da área de forrageamento das abelhas por meio do plantio de espécies de interesse apícola, sejam nectaríferas, poliníferas e/ou resiníferas, dependendo do interesse do apicultor (BARBOSA; SOUSA, 2013).

A segunda modalidade compreende o deslocamento de colmeias para locais que possuam determinadas floradas ao longo do ano. A apicultura migratória se apresenta como um método desenvolvido pelos apicultores com dois objetivos: a maximização da produção de mel e a polinização comercial de culturas agrícolas. Na primeira situação, os apicultores pagam pelo direito de estacionarem suas colmeias em locais potencialmente promissores durante o período de maior florada. As colmeias são instaladas em um período que antecede o pico de floração e removidas logo após seu término. A vantagem da apicultura migratória é a possibilidade de se obter alta produção de mel devido ao maior número de floradas que pode ser explorado (WHYNOTT, 1991).

O segundo objetivo da apicultura migratória consiste no deslocamento de colônias para a polinização de culturas agrícolas. As colônias são transportadas às lavouras ou pomares no início da florada e retirados após seu término. Nesse contexto, as colônias devem estar em uma condição de desenvolvimento adequada, composta por uma alta população e presença de crias em estágio larval, o que estimula as forrageadoras a buscarem pólen (FEWELL; WINSTON, 1992; WRIGHT; NICOLSON; SHAFIR, 2018). Também devem atender a uma

lotação por área adequada, de forma a garantir visitação suficiente às flores da cultura em questão, assegurando uma polinização eficiente (BARBOSA; SOUSA, 2011).

Para se realizar o transporte das colônias, recomendam-se as seguintes providências, que visam minimizar o estresse das colônias e aumentar a segurança dos apicultores e da população: (1) o transporte deve ser realizado durante a noite, permitindo que todas as abelhas se encontrem no interior da colmeia. Além disso, esse período costuma apresentar temperaturas mais amenas, reduzindo as chances de superaquecimento da colônia. Também, se reduz os riscos de possíveis acidentes envolvendo o transporte das colônias. (2) Uso de tampa de transporte telada própria para este tipo de manejo, permitindo a ventilação da colmeia; (3) e fechamento do alvado. Entretanto, a literatura não provém informações sobre os efeitos de diferentes protocolos de manejo de transporte de colônias nas abelhas individualmente ou na colônia com um todo.

1.4. Estresse no transporte de colônias

O transporte de colônias na apicultura migratória pode se constituir em uma das causas de estresse em abelhas, juntamente com outros fatores como doenças, parasitas, pesticidas e má alimentação. O estresse pode afetar diversos níveis de organização: molecular, celular, histológico, fisiológico e até mesmo ecológico ou social (EVEN; DEVAUD; BARRON, 2012).

A duração e intensidade do agente estressor afetam a resposta do organismo. Assim, o estresse pode ser caracterizado como agudo ou crônico. Para o estresse agudo, são definidos três estágios de resposta de um organismo: detecção do agente estressor pelos órgãos sensoriais; resposta ao agente estressor (defesa ou escape); e caso o organismo não consiga evitar o estresse e esse se mantém, ele entra em exaustão (SELYE, 1956).

Existem poucos estudos que evidenciam o impacto do transporte de colônias a nível individual ou mesmo da colônia, seja para a polinização de culturas ou busca de floradas para a produção de mel. Nos EUA, a apicultura migratória é praticada em grandes proporções para a polinização comercial de diversas culturas agrícolas, com destaque para a cultura da

amêndoa (*Prunus dulcis*), cuja demanda anual supera 1 milhão de colônias para sua polinização (SIMONE-FINSTROM et al., 2016). No entanto, pesquisas realizadas com colônias manejadas para a polinização comercial mostraram menor desenvolvimento de glândulas alimentares (hipofaringeana) (AHN et al., 2012), maior incidência de doenças e doenças (ZHU; ZHOU; HUANG, 2014; ALGER et al., 2018), redução no tempo de vida de abelhas operárias e elevação nos níveis de efeitos de estresse oxidativo (SIMONE-FINSTROM et al., 2016).

Esses efeitos podem refletir no desenvolvimento da colônia a longo prazo, de forma direta, com efeitos sobre os indivíduos, ou de forma indireta, prejudicando a capacidade de criar as próximas gerações de abelhas. O efeito de estresse nos estágios larvais, como deficiência nutricional, pode influenciar o comportamento fenotípico de abelhas adultas (SCOFIELD; MATTILA, 2015). Entretanto, como o transporte de colônias visa o deslocamento para áreas com grande disponibilidade de alimento, seja para a polinização comercial ou para a produção de mel, esse aumento na oferta de recursos alimentares pode mascarar os efeitos dos potenciais estressores (ZHU; ZHOU; HUANG, 2014).

1.5. Sistema imunológico da *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* possuem as estruturas básicas de imunidade inata, sendo esta o principal meio de defesa, e poucas estruturas da imunidade adquirida (KLOWDEN, 2013). Seu sistema imunológico possui diferentes mecanismos que atuam em seu organismo. O exoesqueleto quitinoso e as membranas peritróficas ao longo do trato digestório e em células do sistema reprodutivo atuam como barreiras físicas, sendo a primeira forma de defesa, dificultando a ação de patógenos. Em contato com as células epidérmicas, a resposta imune contra agentes patogênicos pode ser dividida em dois mecanismos que atuam conjuntamente: a celular e a humoral (NATION SR, 2015).

Enzimas relacionadas ao sistema imunológico são secretadas e atuam a nível celular, promovendo a fagocitose e o encapsulamento de microrganismos pelos hemócitos, além da coagulação da hemolinfa e da melanização da quitina. As principais enzimas envolvidas

nessas reações são: fenoloxidase, que cataliza a conversão de fenóis em quinonas; glicose desidrogenase, atuando no processo de encapsulamento; glicose oxigenase, que age catalizando a oxidação de β -D-glicose por oxigênio molecular; e lisozima, que promove a hidrólise de ligações β -(1,4)-glicosídicas na membrana celular de bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (ANTÚNEZ et al., 2009). Já a resposta humoral consiste na ação de uma bateria de peptídeos antimicrobianos, como a defensina-1 e a abaecina, que são sintetizados na presença de organismos patogênicos ou situações de estresse (YANG; COX-FOSTER, 2005).

A descrição do genoma da abelha *A. mellifera* (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006) possibilitou o reconhecimento de outros genes relacionados à imunidade, contribuindo para o entendimento dos mecanismos de resposta imunológica, e também de proteínas de estocagem. Esta espécie possui o grupo básico de moléculas de defesa presentes em outros insetos, contudo, a quantidade de genes relacionados ao sistema imunológico é menor em relação a outros insetos (EVEN; DEVAUD; BARRON, 2012)

Os peptídeos antimicrobianos presentes no organismo da *A. mellifera* são sintetizados nas células gordurosas e secretados na hemolinfa em função da resposta de defesa humoral (LOURENÇO et al., 2018). Alterações na expressão de peptídeos antimicrobianos são indicadores da regulação do sistema imune (BRUTSCHER; DAUGHENBAUGH; FLENNIKEN, 2015). Entre esses peptídeos, a abaecina é constituída por quase 30% de prolina em sua constituição. Possui amplo espectro de atuação, sendo ativa tanto contra bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. No entanto, sua atividade bactericida é mais lenta em comparação a outros peptídeos do sistema imune, como a apidaecina, que possui ação imediata (CASTEELS et al., 1990). Sua expressão é regulada por ambas as vias Toll e Imd, sendo ativada pelos fatores transcricionais NF- κ B Dorsal e Relish, respectivamente (Figura 1) (LOURENÇO et al., 2018).

A defensina-1 é um peptídeo responsável pela resposta imune especificamente contra bactérias Gram-positivas. Peptídeos análogos à defensina-1 são encontrados em diversos grupos de insetos e representam um importante mecanismo da resposta humoral deste grupo

de animais (CASTEELS-JOSSON et al., 1994). A defensina-1 é regulada pela via metabólica Toll, mediada pelo fator transcripcional NF-kB Dorsal (Figura 1) (LOURENÇO et al., 2018).

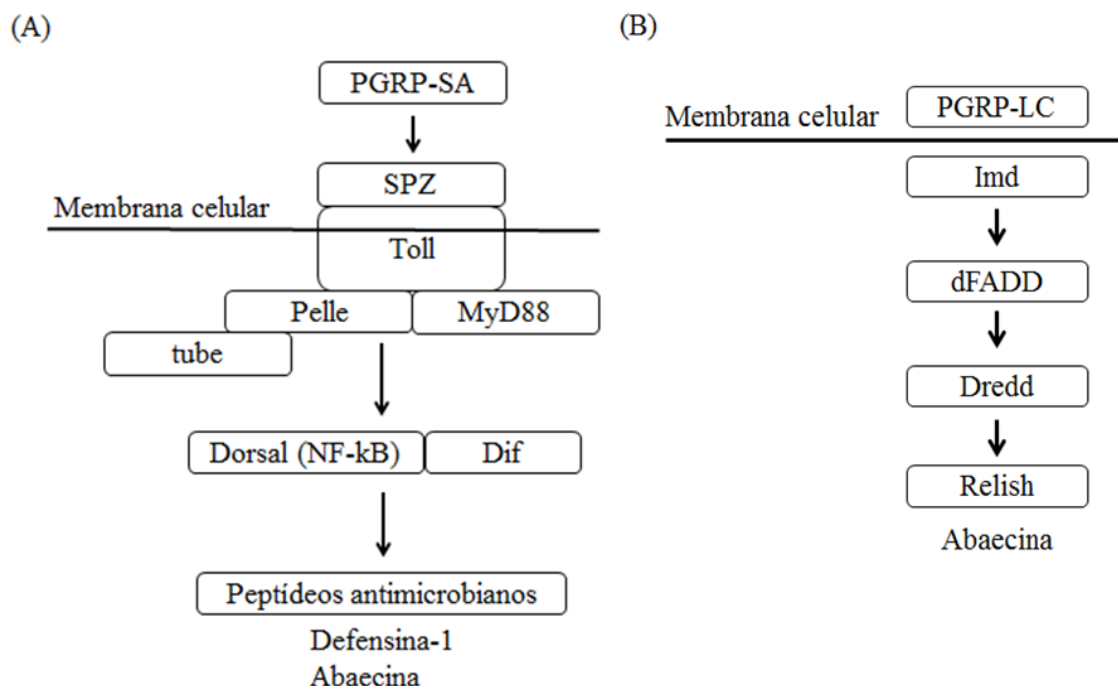


Figura 1. Diagramas simplificados das vias metabólicas (A) Toll e (B) Imd, que culminam na produção dos peptídeos antimicrobianos. Elaborado pelo autor com dados de EVANS et al., 2006 e SHEEHAN et al., 2018.

A primeira etapa da ativação das vias metabólicas do sistema imunológico ocorre pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos [pathogen associated molecular patterns (PAMPs)], que inclui peptidoglicanos de bactérias e β -glucanos de fungos. De maneira geral, via Toll está relacionada à defesa contra bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto a via Imd responde à presença de bactérias Gram-negativas (BRUTSCHER; DAUGHENBAUGH; FLENNIKEN, 2015).

A ativação da via Toll se dá por uma família de proteínas reconhecedoras de patógenos [pathogen recognition proteins (PRPs)], que incluem a proteína de reconhecimento de peptidoglicano [peptidoglycan recognition protein SA (PGRP-SA)] e proteínas de ligação Gram-negativas (BRUTSCHER; DAUGHENBAUGH; FLENNIKEN, 2015). Essas proteínas identificam componentes da parede celular de organismos patogênicos, como o

peptidoglicano, fazendo a citocina Spätzle (SPZ) se ligar ao domínio extracelular do receptor Toll, que é ativado. Com isso, é formado o complexo heterotrimérico pelas proteínas Pelle e MyD88 e pela quinase tube. A ativação de Pelle promove a fosforilação e degradação da proteína Cactus, que, inativada, se liga aos fatores transcricionais Dorsal (NF- κ B) ou Dif, translocando-os ao núcleo, o que resulta na síntese de peptídeos antimicrobianos, entre eles, a defensina-1 e a abaecina (EVANS et al., 2006; SHEEHAN et al., 2018).

Na via Imd também há o reconhecimento de estruturas da parede celular de bactérias (particularmente de Gram-negativas), como o peptidoglicano, pela proteína de reconhecimento de peptidoglicano [peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC)]. A PGRP-LC ativa a proteína Immune deficiency (Imd) e consequentemente as proteínas de adaptação dFADD e DREDD para formar um complexo. Este acarreta na fosforilação e ativação do fator transcricional Relish, sendo translocado então ao núcleo, regulando a produção de peptídeos antimicrobianos, como a abaecina (BRUTSCHER; DAUGHENBAUGH; FLENNIKEN, 2015; SHEEHAN et al., 2018).

Já as hexamerinas compõem um grupo de proteínas denominadas de HSPs (heat shock proteins). As HSPs são moléculas altamente conservadas encontradas num amplo espectro taxonômico, que vai dos protozoários aos vertebrados superiores. Funcionam como chaperonas moleculares, sendo ativadas em situações de estresse biótico e abiótico, onde se ligam a proteínas desnaturadas e ajudam em sua recomposição, evitando seu rearranjo incorreto (RAJAK; ROY, 2018). Existem ao menos 36 genes relativos às HSPs no genoma da *A. mellifera* (ELSIK et al., 2014). Elas são classificadas de acordo com seu peso molecular em kilo daltons (kDa). A hexamerina 70a (HSP70) é responsável pelas reações de combate aos efeitos de estresses oxidativos, como desafios ao sistema imune e ao calor (LOURENÇO et al., 2009).

Posto isso, os objetivos deste trabalho consistiram em avaliar os efeitos do transporte de colônias de abelhas *Apis mellifera* L. por diferentes tempos na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, bem como na mortalidade e desenvolvimento populacional das colônias.

Este estudo resultou no Capítulo II, artigo intitulado “Efeitos do transporte de colônias de abelhas *Apis mellifera* L. na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico” a ser submetido para publicação na revista “Journal of Apicultural Research”, conforme as normas de publicação.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, K. et al. Effects of long distance transportation on honey bee physiology. **Psyche: A Journal of Entomology**, v.2012, p.1-9, 2012.

ALGER, S.A. et al. Home sick: impacts of migratory beekeeping on honey bee (*Apis mellifera*) pests, pathogens, and colony size. **PeerJ**, v. 6, p. e5812, 2018.

AMIRI, E. et al. Queen quality and the impact of honey bee diseases on queen health: potential for interactions between two major threats to colony health. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 48, 2017.

ANTÚNEZ, K. et al. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Environmental Microbiology**, v.11, p.2284–2290. 2009.

ARIAS, M.C.; SHEPPARD, W.S. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 37, n. 1, p. 25-35, 2005.

BARBOSA, W.F.; SOUSA, E.P. Nível tecnológico e seus determinantes na apicultura cearense. **Revista de Política Agrícola**, v.22, n.3, p.32-37, 2013.

BARBOSA, W.F.; SOUSA, E.P. Desempenho competitivo dos apicultores fixos e migratórios da microrregião do Cariri, Ceará. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 49., 2011. Anais... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2011. 1 CD-ROM.

BRUTSCHER, L.M.; DAUGHENBAUGH, K.F.; FLENNIKEN, M.L. Antiviral defense mechanisms in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 71-82, 2015.

CASTEELS, P. et al. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). **European Journal of Biochemistry**, v.187, p.381-386, 1990.

CASTEELS-JOSSON, K., et al. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.46, p.28569-28575, 1994.

CRANE, E. **World history of honey hunting and beekeeping**. New York: Routledge, 1999. 682p.

CRIDLAND, J.M.; TSUTSUI, N.D.; RAMÍREZ, S.R. The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Genome biology and evolution**, v. 9, n. 2, p. 457-472, 2017.

CURRIE, R.W. The biology and behaviour of drones. **Bee world**, v. 68, n. 3, p. 129-143, 1987.

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

ELSIK, C.G. et al. Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 86, 2014.

ENGEL, M.S. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 8, p.165-196, 1999.

EVANS, J.D. et al. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees, *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, v.15, n.5, p.645-56, 2006.

EVEN, N.; DEVAUD, J.M.; BARRON, A.B. General Stress Responses in the Honey Bee. **Insects**, v.3, n.4, p.1271-1298, 2012.

FEWELL, J.H.; WINSTON, M.L. Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 30, n. 6, p. 387-393, 1992.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. London: Academic Press. 2 ed. 1993.

GARIBALDI, L.A. et al. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. **Front Ecology Environmental**, v.12, p.439–447, 2014.

GERULA, D. et al. Productivity and longevity of honey bee queens inseminated with freshly collected and diluted semen. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 2, p. 130-136, 2016.

GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255957, 2015.

Honey Bee Genome Sequencing Consortium. The genome of a highly social insect, the honey bee. **Nature**.v.443, n.1, p.931-949, 2006.

KLEIN, A.M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings Royal Society B**, v.274, p.303-313, 2007.

KLOWDEN, M.J. **Physiological systems in insects**. Cambridge: Academic Press, 3 ed., 2013.

LOURENÇO, A.P. et al. Trade-off between immune stimulation and expression of storage protein genes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 71, n. 2, p. 70-87, 2009.

LOURENÇO, A.P. et al. Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide defensin-1. **Insect molecular biology**, v. 27, n. 5, p. 577-589, 2018.

MAZAR, A. et al. Iron age beehives at Tel Rehov in the Jordan valley. **Antiquity**, v. 82, n. 317, p. 629-639, 2008.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2 ed. 2007.

NATION SR, J.L. **Insect Physiology and Biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

NATSOPOULOU, M.E.; MCMAHON, D.P.; PAXTON, R.J. Parasites modulate within-colony activity and accelerate the temporal polyethism schedule of a social insect, the honey bee. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 70, n. 7, p. 1019-1031, 2016.

NOGUEIRA-NETO, P. The spread of a fierce African bee in Brazil. **Bee World**, v. 45, n. 3, p. 119-121, 1964.

PINTO, M.A. et al. Africanization in the United States: replacement of feral European honeybees (*Apis mellifera* L.) by an African hybrid swarm. **Genetics**, vol. 170 n. 4 p.1653-1665, 2005.

RAJAK, P.; ROY, S..Heat Shock Proteins and Pesticide Stress. In: **Regulation of Heat Shock Protein Responses**. Springer, Cham, 2018. p. 27-40.

RECH, A.R.; AVILA-JUNIOR, R.S.; SCHLINDWEIN, C. **Síndromes de polinização: especialização e generalização**. In: Rech, A.R. et al., *Biologia da Polinização*. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. 527 p.

ROFFET-SALQUE, M. et al. Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. **Nature**, v. 534, n. 7607, p.226–227, 2016.

SCOFIELD, H.N.; MATTILA, H.R. Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. **Plos one**, v. 10, n. 4, p. e0121731, 2015.

SELYE, H. **The stress of life**. New York: McGraw-Hill, 1956.

SHEERAN, G. et al. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences?. **Virulence**, v.9, n.1, p. 1625-1639, 2018.

SIMONE-FINSTROM, M. et al. Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. **Scientific Reports**, v.6, n.1, p.1-10, 2016.

TARPY, D.R.; NIELSEN, D.I. Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honeybee colonies (Hymenoptera: Apidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, p.513–528, 2002.

WESTERKAMP, C. Honey bees are poor pollinators - why? **Plant systematics and evolution**, v. 177, n. 1-2, p.71-75, 1991.

WRIGHT, G.A.; NICOLSON, S.W.; SHAFIR, S. Nutritional physiology and ecology of honey bees. **Annual review of entomology**, v. 63, 2018.

WHYNOTT, D. et al. **Following the bloom: across America with the migratory beekeepers**. Stackpole Books, 1991.

WILSON, E.O. **The Insect Societies**. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press. 1971.

WINSTON, M.L. The biology and management of africanized honey bees. **Annual Reviews in Entomology**, v. 37, p.173-93, 1992.

WINSTON, M.L. **The biology of the honey bee**. Cambridge: Harvard University Press, 1987. 294 p.

YANG, X.; COX-FOSTER, D.L., Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. **PNAS**, v. 102, n. 21, p.7470-7475, 2005.

ZHU, X., ZHOU, Z.; HUANG, Z. Transportation and pollination service increase abundance and prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 4, p.469-471, 2014.

CAPÍTULO II

Efeitos do transporte de colônias de abelhas *Apis mellifera* L. na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico

RESUMO

A apicultura migratória visa maximizar a produção de mel ou atender a polinização de culturas agrícolas; entretanto, este manejo pode ser prejudicial à colônia se não executado de forma correta. Assim, os objetivos do trabalho foram avaliar os efeitos do transporte de colônias de abelhas *Apis mellifera* L. por diferentes durações de tempo na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, bem como na mortalidade e desenvolvimento populacional. Vinte e uma colônias foram submetidas a três tratamentos: Tratamento 1: controle, onde as colônias não foram transportadas; Tratamento 2: colônias transportadas por 1 hora; Tratamento 3: colônias transportadas por 2 horas. As colônias foram transportadas seguindo manejo técnico adequado. Para a análise da expressão de genes foram coletadas abelhas na fase de forrageadora em três momentos: 0, 24 e 72 horas após o transporte. Os genes investigados foram defensina-1, abaecina e HSP70. Para a avaliação da mortalidade de abelhas foram instalados coletores de abelhas mortas do tipo “underbasket” imediatamente após o transporte, sendo a mortalidade avaliada diariamente por 7 dias. Para a avaliação do desenvolvimento populacional foi mensurada as áreas de cria aberta, fechada e alimento estocado no quadro central de cada colônia antes e após o transporte. O transporte promoveu a expressão dos genes defensina-1, abaecina e HSP70, causando modulação do sistema imunológico, porém não afetou a mortalidade e desenvolvimento populacional das colônias nos dois tempos considerados. Pode-se concluir que o transporte das colônias por até 2 horas promove a modulação da expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, embora não haja alterações significativas na mortalidade de abelhas e desenvolvimento populacional das colônias.

Palavras chave: Apicultura, Bem estar, Estresse, Manejo de transporte.

Effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) colony transportation on immune system genes expression

ABSTRACT

Migratory beekeeping aims to maximize honey production or pollination of agricultural crops; however, this management can be harmful to the colony if not executed in a proper manner. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies transportation by different time lengths in immune system genes expression, as well as in bee mortality, and populational growth. Twenty one colonies were submitted to three treatments: Treatment 1: control, colonies were not transported; Treatment 2: colonies transported for 1 hour; Treatment 3: colonies transported for 2 hours. Colonies were transported following proper technical standard. To analyze gene expression, forager bees were collected in three moments: immediately, 24 and 72 hours after transportation. Investigated genes were defensin-1, abaecin, and HSP70. To evaluate bee mortality underbasket dead bee boxes type were placed immediately after transportation, and mortality was evaluated daily for 7 days. To evaluate populational growth, open brood, capped brood, and food areas of the central frame of each experimental colony was measured, before and after transportation. Colony transportation affected the expression of defensin-1, abaecin, and HSP70 genes, causing immune modulation, but did not affect bee mortality and populational growth of the colonies. Our study concludes that transporting honey bee colonies for 2 hours promotes immune system gene expression modulation, although there are no significant changes in bee mortality and populational growth of the colonies.

Key-words: Beekeeping, Welfare, Stress, Transportation management

1. INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) possuem grande importância para a manutenção de ecossistemas (POTTS et al., 2016), podendo ser direcionada para a produção de diversos produtos apícolas e para o serviço de polinização dirigida de muitas culturas agrícolas (MADERSON; WYNNE-JONES, 2016). Esta atividade pode ser dividida em duas principais modalidades: fixa ou estacionária e migratória. A primeira consiste em manter permanentemente o apiário no mesmo local. Deste modo, a produção das colônias é limitada pela oferta de recursos (néctar, pólen, resina e água) determinada pelo potencial florístico local (CRANE, 1999). A segunda modalidade fundamenta-se no deslocamento de colônias para locais específicos que possuam floradas distribuídas ao longo do ano, com objetivos de maximização da produção de mel e a polinização de culturas agrícolas (WHYNOTT, 1991).

Entretanto, o transporte das colônias na apicultura pode ser um agente estressor nas colônias, juntamente com fatores como pragas, doenças, má alimentação e exposição a agrotóxicos (EVEN; DEVAUD; BARRON, 2012; GOULSON et al., 2015). Colônias submetidas à apicultura migratória para polinização comercial no verão apresentaram menor capacidade de realizar a termorregulação da colônia durante o inverno (GLENNY et al. 2017). O transporte de colônias pode afetar também o desenvolvimento da glândula hipofaríngea, prejudicando a capacidade das abelhas nutrizas de alimentar as futuras gerações (AHN et al., 2012). Além disso, pode reduzir o tempo de vida de abelhas operárias, além de acarretar aumento dos níveis de estresse oxidativo (SIMONE-FINSTROM et al., 2016) e implicar em aumento do predomínio e abundância de pragas e doenças (ZHU; ZHOU; HUANG, 2014; ALGER et al., 2018). Porém, há manejos que visam minimizar o efeito estressante do transporte sobre a colônia, como a utilização de tampa telada para promover a ventilação; o fechamento do alvado ao anoitecer, quando toda a população estiver no interior da colmeia, impedindo sua saída; e o deslocamento realizado durante o período noturno, com temperaturas mais amenas, evitando o superaquecimento da colônia.

No entanto, estudos que evidenciam o impacto do transporte de colônias individualmente nas abelhas ou mesmo a nível de colônia ainda são escassos. Um possível efeito desse manejo pode ocorrer no sistema imunológico das abelhas, afetando sua capacidade de combater a ação de agentes patogênicos e pragas (MASON et al., 2013). O sistema imunológico das abelhas é composto majoritariamente pelos sistemas inatos, geneticamente intrínsecos. A resposta imune contra organismos patogênicos pode ser dividida em dois mecanismos que atuam conjuntamente: a celular e a humoral (NATION SR, 2015;

IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). A resposta humoral consiste na ação de uma bateria de peptídeos antimicrobianos que são sintetizados na presença de organismos patogênicos ou em situações de estresse (YANG; COX-FOSTER, 2005; ANTÚNEZ et al., 2009).

As abelhas *A. mellifera* possuem seis peptídeos antimicrobianos, entre eles a defensina-1 e a abaecina. A defensina-1 é um peptídeo catiônico rico em cisteína, sendo o sistema de defesa primário de muitos organismos. Age principalmente contra bactérias Gram-positivas permeabilizando sua membrana citoplasmática. Por sua vez, a abaecina é um peptídeo rico em prolina e possui um amplo espectro de ação contra bactérias (CASTEELS et al., 1990; LOURENÇO et al., 2018).

Além dos peptídeos antimicrobianos, outras proteínas atuam em situações de estresse. As hexamerinas são moléculas altamente conservadas que atuam como chaperonas moleculares em situações de estresses bióticos ou abióticos, como o aumento de temperatura, presença de compostos tóxicos e de patógenos (SAHEBZADEH; LAU, 2017). Constituídas por proteínas de diferentes massas moleculares, entre elas, a HSP70, exercem funções na diferenciação e regulação celular e no desenvolvimento embrionário (ELSIK et al., 2014).

Assim, o estresse decorrente do transporte de colônias pode acarretar efeitos sobre proteínas e peptídeos antimicrobianos que compõem o sistema imunológico das abelhas e também na mortalidade de indivíduos e, conseqüentemente, no desenvolvimento populacional da colônia. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do transporte de colônias de abelhas *Apis mellifera* L. por diferentes durações de tempo na expressão de genes relacionados ao sistema imunológico e na mortalidade de abelhas e desenvolvimento populacional das colônias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo e transporte das colônias

Foram utilizadas vinte e uma colônias de abelhas *Apis mellifera* mantidas em núcleos de produção padrão “Langstroth”, padronizados em relação ao número de quadros contendo cria e alimento. As colônias foram submetidas a três tratamentos compostos por 7 colônias cada, sendo: Tratamento 1 (T0), controle, onde as colônias não foram transportadas; Tratamento 2 (T1), onde as colônias foram transportadas por 1 hora, o que correspondeu a cerca de 50 km de distância; Tratamento 3 (T2), onde as colônias foram transportadas por 2 horas, correspondendo a aproximadamente 100 km de distância. O transporte das colônias foi realizado durante o período noturno, uma única vez, em 25 de maio de 2018. No preparo das

colônias para o transporte, foi colocada uma tampa de transporte telada, permitindo a ventilação da colmeia. O alvado foi fechado com espuma no momento do transporte e as colônias posicionadas lado a lado na carroceria aberta de uma caminhonete. As colônias transportadas saíram de apiário localizado nas coordenadas geográficas 22°49'14.9" S e 48°23'23.8" O e altitude média de 502 m; circularam por vias na região durante os tempos determinados e chegaram no local de instalação de coordenadas geográficas 22°50'28" S e 48°25'42" O e altitude média de 730 m, onde as colônias controle já se encontravam. As colônias foram alojadas em cavaletes individuais, os alvados abertos e as tampas de transporte substituídas por tampas convencionais. O clima da região é caracterizado como Cfa pela classificação de Köppen (DA CUNHA; MARTINS, 2009).

2.2. Análise da expressão de genes

Para a análise da expressão de genes, anterior ao transporte, um quadro contendo cria operculada foi retirado das colônias de cada tratamento, envolto em tecido filó, devolvido à colônia de origem e mantido dentro da colmeia por 24 horas. Após esse período, aproximadamente 100 abelhas recém-emergidas foram marcadas na parte dorsal do tórax (pronoto) com caneta atóxica. Estas abelhas foram então reintroduzidas em suas colônias de origem. Após 22 dias, foi realizado o transporte das colônias nos dois tempos de duração. Nos períodos 0, 24 e 72 horas após o transporte, foram coletadas 10 abelhas marcadas de cada colônia para avaliar o efeito do transporte na fase de forrageadoras. Para as colônias do tratamento controle, utilizou-se o mesmo protocolo, e as coletas foram realizadas nos períodos equivalentes aos dos tratamentos onde houve transporte.

As abelhas coletadas foram imediatamente anestesiadas em gelo e posteriormente congeladas a -80 °C. O RNA foi extraído de um “pool” das cabeças de abelhas (SCHLÜNS; CROZIER, 2007) seguindo a metodologia proposta por Scharlaken e colaboradores (2008) utilizando 500 µl de TRIzol® Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com instruções do fabricante.

Os genes investigados foram defensina-1, abaecina e HSP70. As sequências dos genes estão depositadas no GenBank ou o número de acesso utilizado a partir da anotação do genoma (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). As sequências e informações dos oligonucleotídeos utilizados são descritas na Tabela 1.

O produto de extração foi visualizado em gel de agarose 1% e quantificado em aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Em seguida, a síntese de cDNA foi preparada com o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), de

acordo com o protocolo do fabricante. Esta preparação foi incubada a 50 °C por uma hora e depois a 70 °C por 15 minutos.

A determinação da expressão dos genes foi realizada por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), em triplicatas, utilizando o gene actina como controle endógeno (SCHARLAKEN et al., 2008). Para cada reação foi utilizado um controle negativo, constituído da mistura de reagentes e água. Elas foram realizadas no aparelho ABI 7500 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: um ciclo a 50 °C por 2 minutos; um ciclo a 94 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A curva de dissociação foi obtida da seguinte maneira: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 95 °C por 15 segundos.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores de genes do sistema imunológico (defensina-1, abaecina e HSP70) e constitutivo (actina) de abelhas *Apis mellifera* submetidas a diferentes durações de tempo de transporte.

Gene	Nº de acesso no Gene Bank	Sequência dos primers 5'-3'	Amplificação (pb)	Temperatura ^a (°C)	Eficiência dos oligonucleotídeos ^b (%)
Actina	AB023025	TGCCAACACTGTCCTTTCTG AGAATTGACCCACCAATCCA	156	61	91,2
Defensina-1	U15955	CTGCACCTGTTGAGGATGAA GCGCAAGCACTGTCATTAAC	200	61	87,1
Abaecina	AF442147	CAGCATTCGCATACGTACCA GACCAGGAAACGTTGGAAA	123	61	82,55
HSP70	Martins et al., 2008	CAAAGTTGTAAGCGACGGCGGAA TGTCTCCGGCTGTGGAGCGCA	119	61	116

^aTemperatura de anelamento de cada primer

^bCálculo da eficiência da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) por meio de curva padrão

A eficiência dos oligonucleotídeos (E) foi calculada utilizando curva padrão a partir de quatro diluições das amostras de cDNA: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625, utilizando a fórmula $E=10^{(-1/\text{inclinação})}$. A quantificação relativa dos genes (R) foi determinada pela relação da expressão do gene alvo pelo gene endógeno, na qual o CP (crossing point) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está apreciavelmente acima da fluorescência de fundo, conforme a equação abaixo (PFAFFL, 2001):

$$R = \frac{E_{alvo}^{\Delta CP_{alvo}}}{E_{ref}^{\Delta CP_{ref}}}$$

Sendo E_{alvo} a eficiência do gene alvo; E_{ref} a eficiência do gene de referência; ΔCP_{alvo} é o CP do gene alvo do tratamento controle - CP do gene alvo dos tratamentos transportados; ΔCP_{ref} é o CP do tratamento controle - CP do gene de referência dos tratamentos transportados.

2.3. Avaliação da mortalidade de abelhas

Para avaliação da mortalidade de abelhas após o transporte, foram instalados coletores de abelhas mortas do tipo “underbasket” (ACCORTI; LUTI; TARДУCCI, 1991) em todas as colônias experimentais. Os coletores foram posicionados logo após o transporte e mantidos por 7 dias, sendo a mortalidade avaliada diariamente e expressa em número de abelhas mortas por coletor.

2.4. Avaliação do desenvolvimento populacional

Para avaliação do desenvolvimento populacional, foi selecionado o quadro central de cada colônia experimental e avaliada a área de cria aberta, cria fechada e alimento estocado. A avaliação foi realizada uma semana antes do transporte, um dia antes do transporte e quatro semanas após o transporte, segundo metodologia adaptada de Al-Tikrity e colaboradores (1971). Os quadros foram posicionados em uma estrutura cujas laterais são compostas por uma malha quadriculada de 2 x 2 cm. Dessa forma, foram fotografados os dois lados do quadro selecionado e as áreas (cm²) mensuradas utilizando-se o programa CorelDRAW® X8 (Corel, Ottawa, ON). Para a avaliação proposta, esses resultados foram agrupados em dois períodos: antes e depois do transporte.

2.5. Análise estatística

Os resultados da análise da expressão de genes foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, com teste *post hoc* de Dunn, sem ajuste do valor p. Já os resultados das avaliações de mortalidade e desenvolvimento populacional foram comparados por análise de variância, seguida do teste de Tukey para verificar eventuais diferenças entre as médias ao nível de 95% de probabilidade (ZAR, 1996).

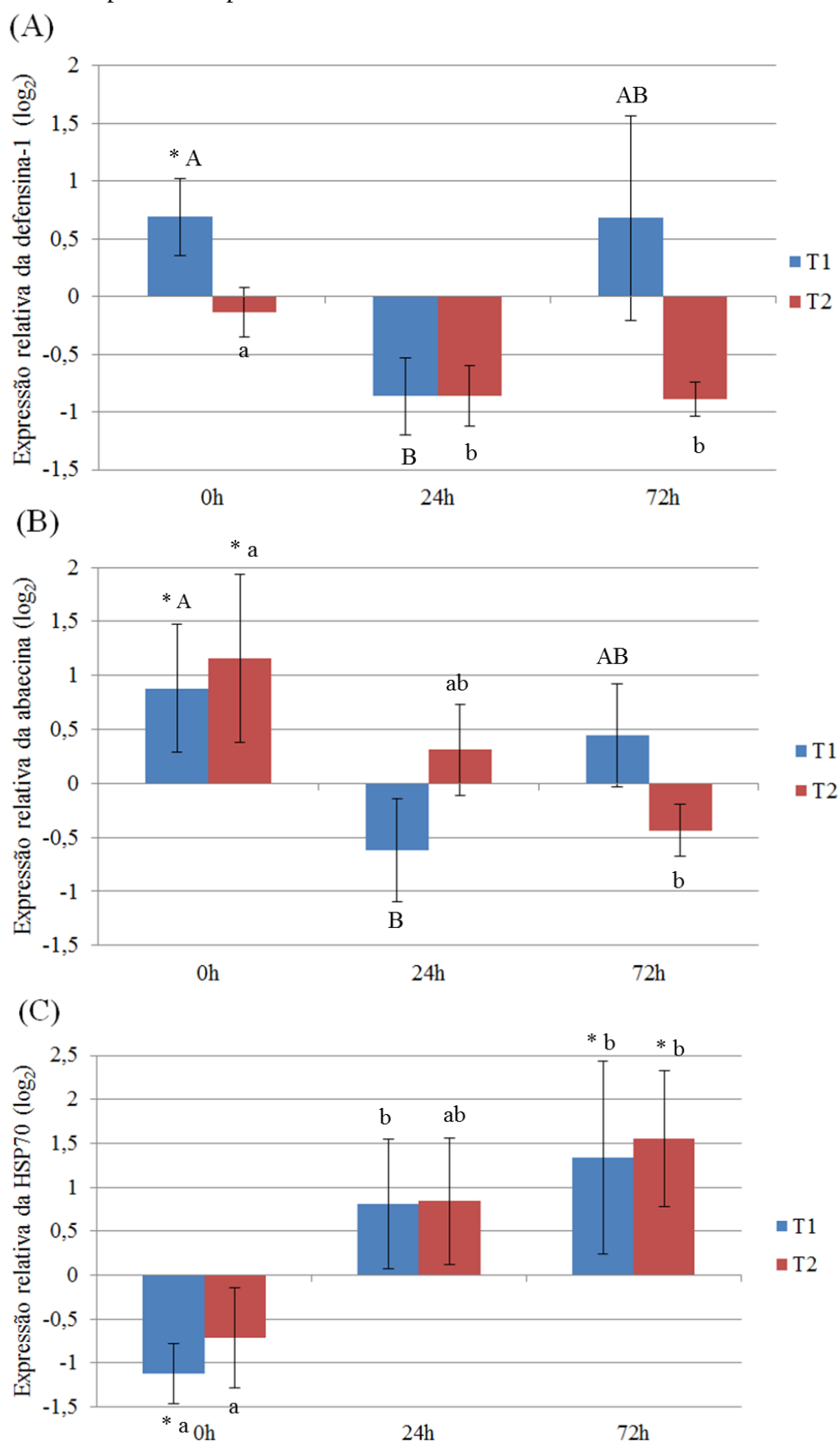
3. RESULTADOS

Os resultados da análise da expressão relativa dos genes defensina-1, abaecina e HSP70 se encontram no Gráfico 1A, 1B e 1C respectivamente. Para o gene defensina-1, observou-se regulação positiva no tratamento T1 logo após o transporte, com diferença significativa em relação ao controle e ao tratamento T2. Em seguida, T1 apresentou regulação negativa 24 horas após o transporte, retornando aos valores de expressão similares ao início 72 horas após. Para o tratamento T2, observou-se regulação negativa 0, 24 e 72 horas após, com diferença significativa em relação ao período logo após o transporte. A regulação negativa observada 72 horas após o transporte em T2 também apresentou diferença significativa em relação ao tratamento T1 no mesmo período (Gráfico 1A).

Em relação ao gene abaecina, o tratamento T1 apresenta regulação positiva logo após o transporte, com diferença significativa em relação ao controle. Em seguida, há regulação negativa 24 horas após o transporte, com diferença significativa em relação ao período 0 hora. Por fim, 72 horas após o transporte, há nova regulação positiva com diferença entre o tratamento T2 para o mesmo período. No tratamento T2, também se observa regulação positiva logo após o transporte com diferença significativa em relação ao controle e ao período 72 horas após, que apresenta regulação negativa (Gráfico 1B).

Já para o gene HSP70, o tratamento T1 apresenta regulação negativa logo após o transporte, com diferença significativa em relação ao controle e aos períodos 24 e 72 horas após, que apresentam regulação positiva. No tratamento T2, também se observa regulação negativa logo após o transporte, porém com diferença significativa somente 72 horas após. Em ambos os tratamentos onde há transporte, a regulação positiva observada 72 horas após apresenta diferença significativa em relação ao controle (Gráfico 1C)

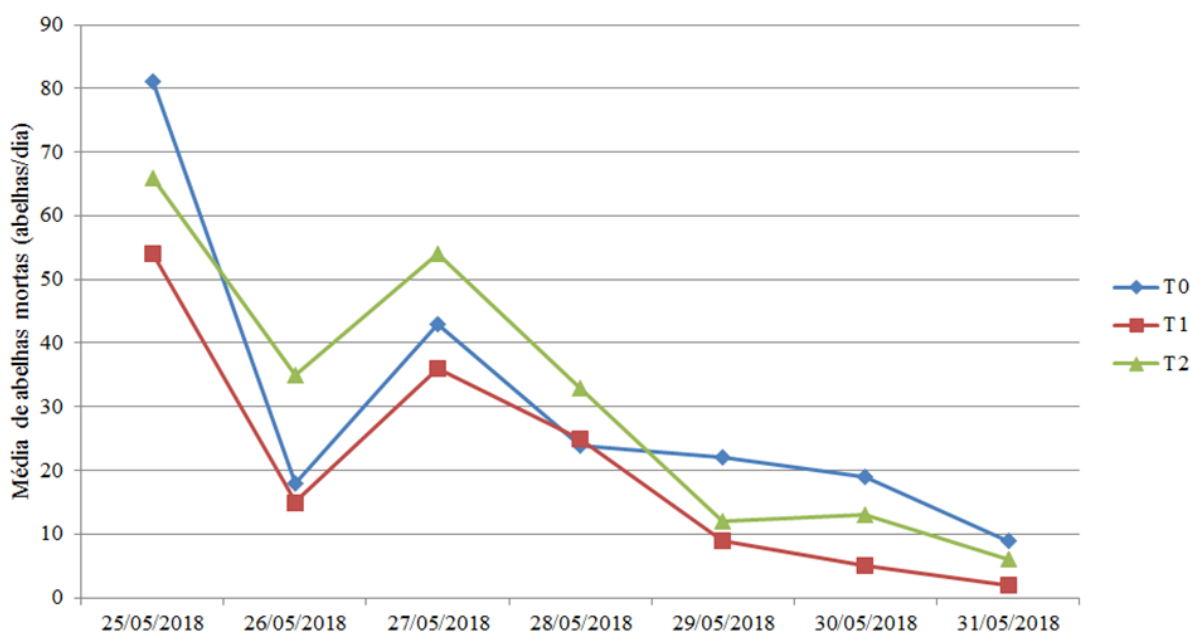
Gráfico 1. Expressão relativa dos genes defensina-1 (A), abaecina (B) e HSP70 (C) em abelhas *Apis mellifera* submetidas ao transporte por 1 hora (T1) e 2 horas (T2) e coletadas 0, 24 e 72 horas após o transporte.



Legenda: * representa diferença em relação ao controle; letras distintas representam diferenças entre as médias: maiúsculas entre o tratamento T1; minúsculas entre o tratamento T2.

Os resultados da mortalidade de abelhas estão apresentados no Gráfico 2. Com relação a esse parâmetro, não houve diferença significativa entre os tratamentos T1 e T2 em relação ao controle ($p=0,6149$). A mortalidade média foi obtida durante 7 dias de avaliação, observando-se um padrão semelhante entre os tratamentos.

Gráfico 2. Mortalidade diária média de abelhas *Apis mellifera* não transportadas (T0) e submetidas ao transporte por 1 hora (T1) e 2 horas (T2).



Legenda: T0: controle; T1: 1 hora; T2: 2 horas.

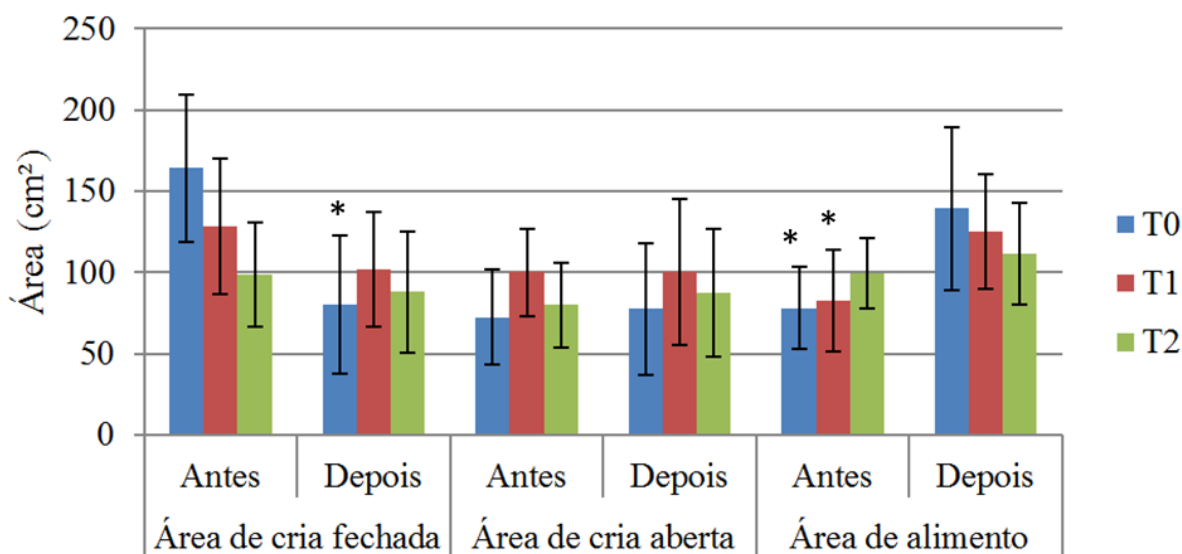
Os resultados do desenvolvimento populacional se encontram no Gráfico 3. Para a área de cria fechada, observa-se uma redução em todos os tratamentos, sendo significativa apenas no controle ($p=0,0809$ e $p=0,3938$, para T1 e T2, respectivamente). Avaliando os tratamentos entre si em cada um dos períodos de coleta, as colônias do controle apresentaram uma área de cria fechada maior que o tratamento T2 antes do transporte. Após o transporte, as áreas não se revelaram estatisticamente diferentes em nenhum dos tratamentos ($p=0,4325$).

As áreas de cria aberta não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tratamentos antes e depois do transporte ($p=0,7634$; $p=0,8999$; $p=0,6009$, para T0, T1 e T2, respectivamente). Também não houve diferença significativa entre essas áreas antes ($p=0,1088$) e depois do transporte ($p=0,3181$).

Já para as áreas de alimento (néctar, mel e pólen), houve aumento após o transporte em todos os tratamentos, porém, não foi observada diferença significativa entre os

tratamentos ($p=0,3195$, $p=0,0733$ para antes e depois do transporte, respectivamente). Entretanto, houve diferença significativa na avaliação dos tratamentos entre si para T0 e T1 ($p=0,1671$ para T2).

Gráfico 3. Área de cria fechada, área de cria aberta e área de alimento (cm^2) antes e depois do transporte.



Legenda: T0: controle; T1: 1 hora; T2: 2 horas. * indica diferença entre as médias para o mesmo tratamento.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho mostram que o transporte das colônias promove a modulação dos genes defensina-1, abaecina e HSP70. A análise da expressão relativa dos peptídeos antimicrobianos considerados, defensina-1 e abaecina, são indicadores válidos de efeitos sobre o sistema imunológico das abelhas (SIEDE; MEICHLER; BÜCHLER, 2012). As colônias transportadas por 1 hora apresentaram padrões semelhantes na expressão desses dois genes, com regulação positiva logo após o transporte, seguida de regulação negativa após 24 horas e novamente expressão positiva 72 horas depois, em nível próximo ao observado na coleta feita logo após o transporte. Para as colônias deslocadas por 2 horas, o gene defensina-1 apresenta regulação negativa em todos os períodos avaliados e o gene abaecina 72 horas após o transporte.

Esses resultados sugerem que há efeito supressor do sistema imunológico das abelhas nos tempos considerados para o transporte, sendo o período 24 horas após o mais vulnerável

para as colônias deslocadas por 1 hora, onde há efeito imunossupressor para os dois genes (CASTEELS et al., 1990; LOURENÇO et al., 2018). Para as colônias transportadas por 2 horas, isso ocorre mais intensamente 72 horas após, quando há modulação negativa para os dois peptídeos antimicrobianos, embora também se observe regulação negativa da defensina-1 24 horas após o transporte. Embora o transporte das colônias possa ser considerado como estresse agudo, com duração menor que 4 horas (EVEN; DEVOUD; BARRON, 2012), seus efeitos se prolongaram por ao menos 72 horas.

Dessa forma, o estresse promovido pelo transporte nos dois tratamentos causou tanto modulação positiva na expressão dos genes dos peptídeos antimicrobianos defensina-1 e abaecina, como modulação negativa, indicando efeito imunossupressor. A supressão do sistema imunológico pode ocorrer por diversos fatores, como pesticidas (MASON et al., 2013; SÁNCHEZ-BAYO et al., 2016), pragas (NAVAJAS et al., 2008; CHAIMANEE et al., 2012) e injúrias mecânicas (KOLEOGLU et al., 2017). Por sua vez, a imunossupressão do organismo pode promover diversos efeitos, como maior susceptibilidade a doenças e pragas (NAZZI; PENNACCHIO, 2014); modulação negativa da expressão dos genes vitelogenina e hormônio juvenil, ambos relacionados à diferenciação laboral de abelhas operárias (BORDIER et al., 2017); e também comprometimento da atividade de forrageamento, afetando a coleta de pólen e consequentemente o balanço nutricional da colônia (BORDIER et al., 2018).

Para o gene HSP70, observou-se regulação positiva 24 e 72 horas após o transporte, quando realizados por 1 e 2 horas, respectivamente. As hexamerinas são consideradas importantes proteínas de estocagem, atuando como chaperonas moleculares em situações de estresse térmico, auxiliando no redobramento de proteínas que se desnaturam com aumentos de temperatura, impedindo sua ligação errônea a outros compostos (SAHEBZADEH; LAU, 2017). Assim, o transporte pode ter causado a expressão deste gene relacionado à regulação fisiológica de variações de temperatura corporal. Também, o período considerado no experimento não foi suficiente para verificar o tempo necessário para o restabelecimento dos níveis normais da HSP70 para os tratamentos transportados.

As análises de mortalidade e desenvolvimento populacional não se alteraram nos enxames transportados em relação ao controle. Para a mortalidade, este resultado pode ser um indicador de que o método de preparo das colônias para o transporte utilizado realmente minimize um efeito estressor, que é morte de abelhas e consequente redução da população. Por fim, no desenvolvimento populacional, apesar de ser constatada redução nas áreas de cria

fechada do controle e dos enxames deslocados por 1 hora, não houve alteração nas colônias do tratamento T2. Isso também pode indicar efeito positivo do método de preparo das colônias. Porém, como a apicultura migratória visa deslocar colônias para áreas com alta abundância de recursos florais, o efeito estressor desse manejo pode ser mascarado pelo aumento na disponibilidade de alimento (ZHU; ZHOU; HUANG, 2014). Isso pode ser constatado pelo aumento na área de alimento estocado para os tratamentos controle e T1, uma vez que as colônias foram transportadas para o mesmo apiário onde as colônias do controle estavam alocadas.

O transporte de colônias tanto para serviços de polinização quanto para a produção constitui uma prática comum na apicultura mundial. Porém, diversos procedimentos de transporte são praticados pelos apicultores no sentido de se buscar rapidez e praticidade, nem sempre priorizando o bem estar das abelhas, podendo promover estresse nas colônias. Por exemplo, a realização do transporte das colônias durante o dia, quando as temperaturas são mais elevadas, pode promover aumento na temperatura interna da colônia, além da perda de abelhas operárias na fase de forrageadoras. Da mesma forma, a prática do transporte de colônias com o alvado aberto contribui para a redução da população da colônia e, conseqüentemente, de seu desenvolvimento populacional. Neste trabalho, o transporte das colônias foi realizado visando minimizar possíveis efeitos do estresse às colônias, com o uso de tela de transporte para ventilação da colmeia, alvado fechado e transporte no período noturno. Desta forma, pode-se inferir que, quando o transporte de colônias é realizado procurando-se manter as mínimas condições de bem estar para as abelhas, os prejuízos deste manejo podem ser reduzidos, embora algumas alterações fisiológicas possam ser observadas.

5. CONCLUSÃO

O transporte das colônias por até 2 horas promove a modulação da expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, embora não haja alterações significativas na mortalidade de abelhas e desenvolvimento populacional das colônias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORTI, M.; LUTI, F.; TARDUCCI, F. Methods for collecting data on natural mortality in bee. **Ethology, Ecology & Evolution**, v.3, n.1, p.123-126, 1991.

AHN, K. et al. Effects of long distance transportation on honey bee physiology. **Psyche: A Journal of Entomology**, v.2012, p.1-9, 2012.

ALGER, S.A. et al. Home sick: impacts of migratory beekeeping on honey bee (*Apis mellifera*) pests, pathogens, and colony size. **PeerJ**, v. 6, p. e5812, 2018.

AL-TIKRITY W.S. et al. A new instrument for brood measurement in a honey bee colony. **American Bee Journal**, v.111, p.20-6, 1971.

ANTÚNEZ, K. et al. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Environmental Microbiology**, v.11, p.2284–2290. 2009.

BORDIER, C. et al. Stress response in honeybees is associated with changes in task-related physiology and energetic metabolism. **Journal of Insect Physiology**, v.98, p.47-54, 2017.

BORDIER, C. et al. Stress decreases pollen foraging performance in honeybees. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb171470, 2018.

CASTEELS, P. et al. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 381-386, 1990.

CHAIMANEE, V. et al. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 8, p. 1090-1095, 2012.

CRANE, Eva. **The world history of beekeeping and honey hunting**. Routledge, 1999.

DA CUNHA, A.R.; MARTINS, D. Classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel, SP. **Irriga**, p. 1-11, 2009.

ELSIK, C.G. et al. Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 86, 2014.

EVEN, N.; DEVAUD, J.M.; BARRON, A.B. General Stress Responses in the Honey Bee **Insects**, v.3, n.4, p.1271-1298, 2012.

GLENNY, W. et al. Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0182814, 2017.

GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255957, 2015.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature immunology**, v. 16, n. 4, p. 343, 2015.

KOLEOGLU, G. et al. Effect of *Varroa destructor*, wounding and Varroa homogenate on gene expression in brood and adult honey bees. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0169669, 2017.

LOURENÇO, A.P. et al. Silencing of *Apis mellifera* dorsal genes reveals their role in expression of the antimicrobial peptide defensin-1. **Insect molecular biology**, v. 27, n. 5, p. 577-589, 2018.

MADERSON, S.; WYNNE-JONES, S. Beekeepers' knowledges and participation in pollinator conservation policy. **Journal of rural studies**, v. 45, p. 88-98, 2016.

MARTINS, J.R. et al. A honeybee storage protein gene, hex 70a, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body. **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 5, p.867-877, 2008.

MASON, R. et al. Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. **J Environ Immunol Toxicol**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2013.

NATION SR, J.L. **Insect Physiology and Biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

NAVAJAS, M. et al. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 301, 2008.

NAZZI, F; PENNACCHIO, F. Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 12, p. 556-561, 2014.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v.29, n.9, p.45-e45, 2001.

POTTS, S. G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220, 2016.

SAHEBZADEH, N.; LAU, W.H. Expression of heat-shock protein genes in *Apis mellifera* meda (Hymenoptera: Apidae) after exposure to monoterpenoids and infestation by Varroa destructor mites (Acari: Varroidae). **European Journal of Entomology**, v. 114, p. 195, 2017.

SÁNCHEZ-BAYO, F. et al. Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. **Environment international**, v. 89, p. 7-11, 2016.

SCHARLAKEN, B. et al. Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. **Developmental and Comparative Immunology**, v.32, n.8, p.883-889, 2008.

SCHLÜNS, H.; CROZIER, R.H. Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. **Insect molecular biology**, v. 16, n. 6, p. 753-759, 2007.

SIEDE, R. MEIXNER, M.D.; BÜCHLER, R. Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v. 51, n. 4, p. 320-328, 2012.

SIMONE-FINSTROM, M. et al. Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. **Scientific Reports**, v.6, n.1, p.1-10, 2016.

WHYNOTT, D. et al. **Following the bloom: across America with the migratory beekeepers**. Stackpole Books, 1991.

YANG, X.; COX-FOSTER, D.L., Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. **PNAS**, v.102, n.21, p.7470-7475, 2005.

ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. New Jersey: Pretince Hall, 718p. 1996.

ZHU, X., ZHOU, Z.; HUANG, Z. Transportation and pollination service increase abundance and prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v.53, n.4, p.469-471, 2014.

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES

O tema deste trabalho, provavelmente pioneiro no Brasil, pode ser relacionado como um dos poucos estudos sobre os efeitos do transporte de colônias, tanto a nível individual, quanto a nível de colônia. A apicultura migratória é praticada mundialmente, portanto, os resultados contribuem para um melhor entendimento de um dos fatores que têm afetado negativamente a população de abelhas *Apis mellifera* no mundo todo.

O protocolo de manejo adotado para o transporte das colônias visou minimizar os efeitos estressantes, trazendo bem estar às abelhas. Entretanto, outros protocolos têm sido utilizados por apicultores, possivelmente mais estressantes. Assim, avaliar diferenças entre outros tipos de manejo pode contribuir para ressaltar a recomendação de transportes menos perturbadores.

Como a apicultura visa a produção de diversos produtos, sendo o mel o mais importante comercialmente, futuros estudos poderiam avaliar o efeito do transporte na produção de mel, desde que as dificuldades experimentais possam ser superadas.

Por fim, outros genes relacionados ao sistema imunológico das abelhas, como os peptídeos antimicrobianos hymenoptaecina e apidaecina, poderiam ter suas expressões avaliadas em estudos posteriores sobre o tema, aferindo, assim, o efeito do transporte sobre outras moléculas que compõem o sistema imunológico das abelhas.