

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR DE ENTRESSAFRA SOBRE A MORFOLOGIA DAS GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE OPERÁRIAS DE *Apis mellifera*.

Wellyngton Matheus Souza Santiago¹, Gustavo Nadeu Bijos, Rodrigo Pires Dallacqua^{1*}

1- Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

2- NB Consultoria Veterinária S/S Ltda

*Orientador

Resumo

A suplementação alimentar é uma importante ferramenta de manejo para colmeias de *Apis mellifera*. Para avaliar o impacto desta suplementação sobre as operárias adultas, realizamos a caracterização histológica de suas glândulas hipofaríngeas em três situações: 1) colmeias não alimentadas; 2) colmeias alimentadas com dieta energética e 3) colmeias alimentadas com dieta energético-proteica. A dieta foi ofertada semanalmente aos grupos teste (2 e 3) por 60 dias, sendo realizadas coletas com 0, 30 e 60 dias. As operárias nutrizas apresentaram glândulas ativas e com diversos vacúolos de secreção, ao contrário do observado nas campeiras. As nutrizas das colmeias suplementadas com dieta energético-proteica e coletadas com 60 dias apresentaram glândulas com ácinos maiores (área em μm^2), embora a quantidade de vacúolos não tenha diferido entre os grupos. Portanto, a suplementação com dieta energético-proteica gera operárias nutrizas com glândulas mais produtivas ao período de entressafra.

Palavras-chave: Apicultura, Manejo de alta produtividade, Ativação glandular

Apoio financeiro: FUNDECT/CNPq (T.O. 062/2015)

Introdução

Para aumentar a produtividade de mel em colmeias de abelhas *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) foram desenvolvidas técnicas de manejo utilizando a suplementação alimentar para os períodos de entressafra de recursos florais, utilizando dieta artificial (MICHENER, 1974; WOLFF, 2007). Além de auxiliar na manutenção das colmeias, este procedimento auxilia no crescimento populacional em um nível ótimo, para que a colmeia esteja forte e repleta de abelhas campeiras para coletar néctar no início da florada (MICHENER, 1974; WOLFF, 2007).

O xarope de açúcar (dieta energética) é o suplemento energético mais utilizado. Entretanto, a ausência de pólen ou outro suplemento proteico pode acarretar em uma queda na postura de ovos e/ou problemas na alimentação larval, podendo levar à redução da população da colmeia e, em casos mais severos, à extinção da colônia (HAYDAK, 1963; WOLFF, 2007). Dentre os diversos suplementos proteicos que vêm sendo testados nos apiários, o Promotor L[®] é um dos que tem ampla aceitação e vem sendo utilizado pelos apicultores (CASTAGNINO et al., 2006).

Isto porque as operárias nutrizas necessitam ingerir proteínas em sua dieta para produção de secreções, com vistas a alimentar a rainha e as larvas em desenvolvimento. Dentro deste contexto, as glândulas hipofaríngeas estão diretamente associadas à produção do alimento ofertado as larvas e da geleia real (CRUZ-LANDIM & MELLO, 1967; CRAILSHEIM, 1991; CRAILSHEIM, 1992). Estas glândulas fazem parte do sistema salivar e sofrem modificações no decorrer da vida das abelhas, tendo sua atividade regulada de acordo com o papel desempenhado pela abelha dentro da colmeia (SEELEY, 1982; CRUZ-LANDIM & COSTA-LEONARDO, 1998).

Para avaliar o efeito da suplementação alimentar sobre o desenvolvimento e ativação das glândulas hipofaríngeas em operárias adultas, o presente trabalho analisou a morfologia destas nas operárias nutrizas e campeiras mantidas em colmeias alimentadas com dieta energética e dieta energética-proteica no período de entressafra, entre junho e agosto de 2018. A hipótese testada é de que a suplementação alimentar com dieta energético-proteica produz operárias mais robustas e mais eficientes na produção de secreções utilizadas na alimentação das larvas e rainha.

Metodologia

Foram selecionadas 9 colmeias mantidas em um apiário comercial particular localizado nas imediações do Hospital São Julião (20°22'34,0" S e 54°32'58,8" O), em Campo Grande/MS.

Estas colmeias foram divididas em três grupos que diferiram quanto à suplementação alimentar ofertada entre junho e agosto de 2018. Cada grupo era constituído por três colmeias manejadas semanalmente por 60 dias, de acordo com o seu tamanho populacional e a quantidade de reservas alimentares: 1) Grupo controle – eram as colmeias mais populosas – contendo mais de seis quadros de cria e com ao menos 2 sobreninhos no início do experimento. Estas colmeias foram mantidas sem suplementação alimentar; 2) Grupo teste 1 – eram colmeias com tamanho populacional intermediário, contendo entre quatro e seis quadros de cria e com, no máximo, um sobreninho. Estas colmeias foram suplementadas com dieta energética (xarope de açúcar); 3) Grupo teste 2 – eram colmeias com população pequena, contendo até dois quadros de cria e sem sobreninho. Estas colmeias foram suplementadas com dieta energético-proteica (xarope de açúcar e Promotor L[®]).

Foram realizadas três coletas (com 0, 30 e 60 dias após o início da alimentação), sendo em cada uma delas capturadas de 05 nutrízes por colmeia, diretamente sobre o quadro de cria. Além disso, a mesma quantidade de campeiras foi coletada diretamente no alvado de cada colmeia, quando retornavam do campo.

No laboratório, foi realizada a dissecação das glândulas hipofaríngeas, para processamento e confecção de lâminas histológicas coradas com Eosina e Hematoxilina. Os cortes histológicos (com 4µm de espessura) foram observados e fotografados em Microscópio Óptico Axiomager D2 (Zeiss). Através do software Zen Pro® (Zeiss), foi determinada a área de 3 ácinos por lâmina (em µm²), bem como contada a quantidade de vacúolos contendo secreção por célula secretora destes mesmos ácinos.

Resultados e Discussão

A divisão de tarefas entre operárias de diferentes idades é fundamental para a manutenção da colmeia, tanto nos períodos de alta como nos de baixa disponibilidade de recursos. A função desempenhada acarreta alterações morfofisiológicas nestas abelhas, além das condições gerais da colmeia. Sendo assim as abelhas nutrízes, comprometidas com a alimentação das larvas, necessitam que haja na colmeia nutrientes na forma de aminoácidos e proteínas essenciais (HAYDAK, 1970), para a ativação das glândulas hipofaríngeas. Estas glândulas são originadas da diferenciação do epitélio da faringe durante a pupação, formando uma estrutura par constituída por 05 células glandulares da classe III em cada ácino (CRUZ-LANDIM & MELLO, 1967; CRUZ-LANDIM, 2009). Nas operárias nutrízes, estas glândulas têm por função produzir parte do alimento ofertado às larvas (CRAILSHEIM, 1991; 1992). Quando comparadas as glândulas de operárias nutrízes (mais jovens) com as de operária campeiras (mais velhas), notamos uma diminuição no tamanho dos ácinos nas últimas, em função da ausência de vacúolos de secreção no citoplasma (Figura 1A). Uma vez que estas abelhas não mais necessitam produzir alimento larval, este resultado é condizente com sua função/status fisiológico.

No interior das células secretoras de cada ácino, é possível notar vacúolos ou vesículas nos quais a secreção é estocada antes da liberação através do ducto excretor (Figuras 1B e 2). A secreção apresenta coloração rosa claro pela eosina.

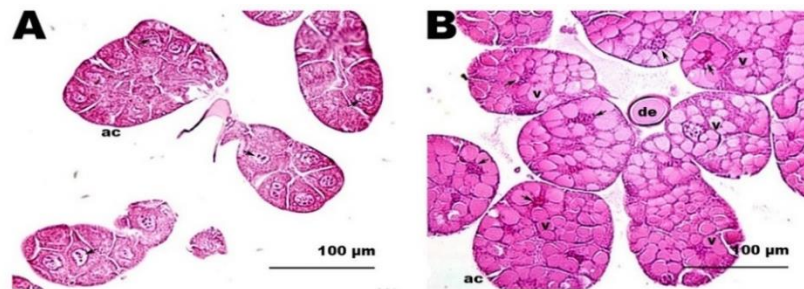


Figura 1. Fotomicrografia das glândulas hipofaríngeas de operárias campeiras (A) e nutrízes (B) de *A. mellifera*. Notar a quantidade de células secretoras em função da presença dos núcleos (setas) no interior dos ácinos (ac). Nas campeiras, ao contrário das nutrízes, não há vacúolos secretores (v). (de) Ducto excretor.

A comparação dos cortes histológicos das glândulas das nutrízes dos diferentes grupos, não apresentou diferenças estruturais (Figura 2), exceção feita às nutrízes do grupo teste 2 (colmeias alimentadas com suplemento energético-protéico) coletadas 60 dias após o início da alimentação, que eram aparentemente maiores (Figura 2C), podendo caracterizar uma maior atividade na produção e armazenamento de secreção.

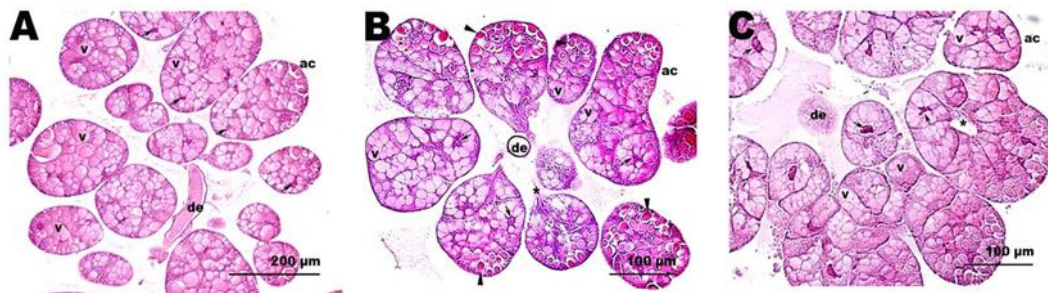


Figura 2. Fotomicrografias das glândulas hipofaríngeas de operárias nutrízes de *A. mellifera*, coletadas em colmeias mantidas sem alimentação - grupo controle (A), alimentadas com dieta energética – Grupo teste 1 (B) e alimentadas com dieta energético-proteica - Grupo teste 2 (C). Os ácinos (ac) são formados por células secretoras (setas) repletas de vacúolos (v) contendo secreção granular fracamente corada, embora alguns estejam fortemente marcados por eosina (cabeça de seta). O ducto excretor (de) é um canal que interconecta os ácinos para coleta de secreção, via canalículos secretores (*).

Em função desta observação, optamos por quantificar a produção de secreção utilizando duas variáveis: área dos ácinos e a quantidade de vacúolos secretores por ácino. Na primeira coleta (0 dias), realizada quando a alimentação ainda não tinha sido administrada para as colmeias, esperava-se encontrar glândulas

hipofaríngeas de tamanho equivalente entre as nutrízes de todos os grupos. Entretanto, notou-se que as nutrízes do grupo controle, cujas colmeias eram mais fortes, possuíam ácidos significativamente menores ($P < 0,001$) e apresentavam menos vacúolos secretores, quando comparados com os grupos que receberam tratamento (Figura 3). Apesar de os parâmetros aqui observados não nos permitir explicar com clareza este motivo, acreditamos que as colmeias controle (enxames maiores e mais fortes) poderiam já estar em processo de percepção da redução na entrada de alimento, reduzindo o ritmo de expansão para manutenção dos estoques de mel e pólen.

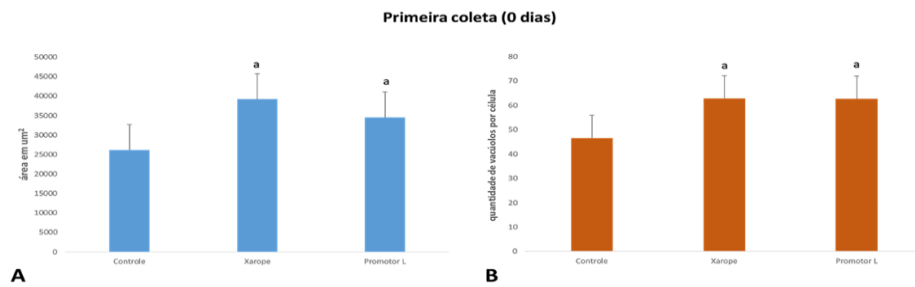


Figura 3. Comparação de tamanho das glândulas hipofaríngeas de operárias nutrízes antes de início da alimentação nos grupos teste (abelhas alimentadas somente com Xarope ou com Xarope + Promotor L) e controle. A). As barras em azul indicam o valor médio da área dos ácidos das glândulas hipofaríngeas (em μm^2). B). As barras em laranja indicam a quantidade média de vacúolos nas células secretoras observadas por ácido. ($P < 0,001$ – ANOVA, seguido de post test Tukey).

Após 30 dias de manejo, os ácidos das colmeias alimentadas com dieta energético-protéica foram significativamente menores em relação ao grupo alimentado com dieta energética ($P < 0,05$), apesar de não serem distintos dos controles (Figura 4A). Não foi notada diferença na quantidade de vacúolos secretores nos ácidos em nenhum grupo (Figura 4B). Neste estágio, a alimentação parece fomentar uma equalização dos enxames com relação ao controle, embora ainda possuam populações menores.

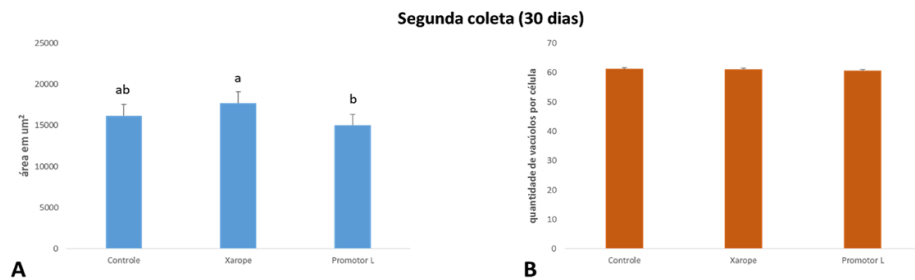


Figura 4. Comparação de tamanho das glândulas hipofaríngeas de operárias nutrízes com 30 dias após o início da alimentação nos grupos teste (abelhas alimentadas somente com Xarope ou com Xarope + Promotor L). A) Valor médio da área dos ácidos das glândulas hipofaríngeas (em μm^2). B) Quantidade média vacúolos nas células secretoras observadas por ácido. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$ – ANOVA, seguido de post test. Tukey)

Em oposição ao observado nas duas coletas iniciais, as nutrízes das colmeias alimentadas por 60 dias com alimento energético-protéico, já próximo do término da entressafra, apresentaram glândulas hipofaríngeas com aproximadamente o dobro do tamanho das glândulas dos demais grupos, apesar de a diferença ser significativa somente em relação ao grupo controle (Figura 5A). Da mesma forma, a quantidade de vacúolos por ácido foi maior nos grupos em que as colmeias receberam alimento (Figura 5B), embora estes apresentassem valores aproximados.

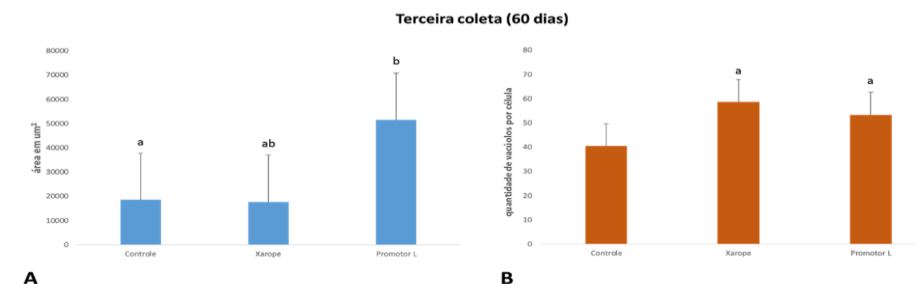


Figura 5. Comparação de tamanho das glândulas hipofaríngeas de operárias nutrízes com 60 dias após o início da alimentação nos grupos teste (abelhas alimentadas somente com Xarope ou com Xarope + Promotor L). A) Valor médio da área dos ácidos das glândulas hipofaríngeas (em μm^2). B) Quantidade média de vacúolos nas células secretoras observadas por ácido. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$ – ANOVA, seguido de post test. Tukey).

Os resultados encontrados a partir das análises histológicas das glândulas hipofaríngeas corroboram com os achados de CORBY-HARRIS e SNYDER (2018), que observaram ácidos maiores nas glândulas hipofaríngeas em abelhas nutrizas que receberam como suplementação alimentar uma mistura de pólen e mel. Sabendo então que o pólen é a principal fonte de aminoácidos presente na natureza, e que estes são essenciais para a nutrição dos imaturos e da rainha, o substituinte testado neste experimento, o Promotor L[®], possibilitou achados similares.

A utilização de suplementação alimentar na entressafra, seja ela energética ou energética-protéica, associada ao manejo adequado das colmeias, possibilita uma melhor manutenção e controle populacional. Isto ajuda a prevenir perdas por mortalidade e enxameação, bem como fortalece as populações para otimização do forrageio por néctar ao término da entressafra.

Conclusões

A despeito da semelhança entre os grupos teste e controle no que diz respeito ao peso fresco e morfologia das glândulas hipofaríngeas, ao final do experimento (término do período de entressafra) a suplementação alimentar com dieta energético-protéica produziu operárias nutrizas com ácidos das glândulas hipofaríngeas significativamente maiores. Isto ocorreu pela maior produção e acúmulo de secreção no interior das células, tornando estas operárias mais eficientes em alimentar a rainha e os imaturos. Embora ainda sejam necessárias observações de outros parâmetros, acreditamos que esta capacidade das operárias torna a colmeia mais preparada para crescer e iniciar a coleta de néctar durante as floradas, fomentando os resultados observados na prática pelos apicultores; maior produtividade de mel por colmeia suplementada.

Referências bibliográficas

- AMARAL, E. Ensaio sobre a influência de *Apis mellifera* L. na polinização do cafeeiro (Nota prévia). **Bol. Esc. Agric. Luiz de Queiroz**, 1952.
- AMARAL, E. Ação dos insetos na polinização do cafeeiro Caturram. **Rev. Agric.**, 35: 139-147, 1960.
- CASTAGNINO, G.L. et al. Desenvolvimento de núcleos de *Apis mellifera* alimentados com suplemento aminoácido vitamínico, Promotor L[®]. **Cienc. Rural**, 36(2): 685-688, 2006.
- CLARKE, K.E. et al. The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. **Sydney: Evolution**, 56:1462-1474, 2002.
- CORBY-HARRIS, V. et al. Honey bee (*Apis mellifera*) nurses do not consume pollens based on their nutritional quality. **PLoS one**, 13(1): e0191050, 2018.
- CRAILSHEIM, K. Inter adult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **J. Comp. Physiol.** 161(1): 55-60, 1991.
- CRAILSHEIM, K. et al. Pollen consumption and utilization in worker honeybee (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. **J. Insect Physiol.** 38:409-419, 1992
- CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, M. L. S. The post-embryonic changes in *Melipona quadrfasciata anthidioides* Lep. (Hym., Apoidea). II. Development of the salivary glands system. **J. Morphol.**, 123(4): 481-502, 1967.
- CRUZ-LANDIM, C.; COSTA-LEONARDO, A. M. Relationships between bacteria and the gut wall of some Neotropical Termites (Isoptera). **Acta Microsc.** 7: 1-5, 1998.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 408p, 2009.
- HAYDAK, M. H. 1963. Influence of storage on the nutritive value of pollen for brood rearing by honeybees. **J. Apic. Res.** 2: 105-107, 1963.
- HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Ann. Rev. Entom.** 15(1): 143-156, 1970.
- MALERBO-SOUZA, D.T. et al. Atrativo para as abelhas *Apis mellifera* e polinização em café (*Coffea arabica* L.). **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.** 40:272-278, 2003.
- MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Harvard University Press, 1974.
- SEELEY, T.D. How honey bees find a home. **Sci. Am.**, 247(4):158-168, 1982
- WOLFF, L. F. **Alimentação de enxames em apicultura sustentável**. Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2007.