



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



**O ÁCARO *Varroa destructor* E AS ABELHAS AFRICANIZADAS: UMA ABORDAGEM
MORFOMÉTRICA DA RELAÇÃO ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO**

Paloma Quirino Rocha
Orientador: Edilson Divino de Araujo

São Cristóvão - SE
2023

Paloma Quirino Rocha

**O ÁCARO *Varroa destructor* E AS ABELHAS AFRICANIZADAS: UMA ABORDAGEM
MORFOMÉTRICA DA RELAÇÃO ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Edilson Divino de Araujo

São Cristóvão - SE

Setembro de 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

R672a Rocha, Paloma Quirino
O ácaro *Varroa destructor* e as abelhas africanizadas : uma abordagem morfométrica da relação entre parasito e hospedeiro / Paloma Quirino Rocha ; orientador Edilson Divino de Araujo. – São Cristóvão, SE, 2023.
54 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal de Sergipe, 2023.

1. Ecologia. 2. Ecologia animal. 3. Animais – Comportamento. 4. Relação hospedeiro-parasito. 5. Ácaros. 6. Abelhas africanizadas. I. Araujo, Edilson Divino de, orient. II. Título.

CDU 591.5


TERMO DE APROVAÇÃO

O ÁCARO *Varroa destructor* E AS ABELHAS AFRICANIZADAS: UMA ABORDAGEM MORFOMÉTRICA DA RELAÇÃO ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO por


Paloma Quirino Rocha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.


APROVADA pela banca examinadora composta por

Documento assinado digitalmente
 **SIDNEY FEITOSA GOUVEIA**
Data: 25/09/2023 11:59:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sidney Feitosa Gouveia
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da
Universidade Federal de Sergipe

Documento assinado digitalmente
 **KATIA PERES GRAMACHO**
Data: 26/09/2023 11:24:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Katia Peres Gramacho
UFERSA

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS ALFREDO LOPES DE CARVALHO**
Data: 26/09/2023 10:22:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
UFRB

São Cristóvão/SE, 25 de Setembro de 2023

Agradecimentos

Sou grata a Deus, por sua infinita bondade e amor, por me dar força, coragem e por colocar pessoas e oportunidades maravilhosas no meu caminho. As companhias da minha jornada têm me feito uma pessoa mais feliz, alegre e forte.

Agradeço à minha família, meu maior ponto de apoio, por todo amor, cuidado e incentivo: Aos meus avôs, pais, irmãos, tios e primos. Cresci cercada por pessoas que são exemplos de fé e persistência, com certeza tenho aprendido muito sobre a vida quando nos sentamos em roda para contar histórias e rir dos problemas passados. À minha mãe, meu maior exemplo de força e minha maior fonte de amor, obrigada por me ensinar tanto. Aos meus irmãos, Patrícia e Pitágoras, pelo companheirismo, incentivo e apoio.

A todos os meus amigos, pelo apoio emocional e técnico. Agradeço a Clemensou pelo apoio e incentivo na escrita do projeto de pesquisa e na seleção do mestrado. À Jamille, amiga que conheci no mestrado, mas que vou levar para a vida inteira, obrigada por me ouvir e aconselhar tantas vezes, você é capaz de saber como me sinto só de olhar pra mim, sou grata por todo o seu cuidado, companheirismo e apoio. À Jesiel por todas as conversas e aconselhamentos, por ser alguém com quem eu sei que posso contar, sua companhia fortalece minha fé. A todos os meus outros amigos, os antigos e os novos, eu não seria a pessoa que sou hoje sem vocês. Agradeço a Aline, minha terapeuta, pelas conversas e aconselhamentos que me ajudaram a enxergar as minhas potencialidades e a persistir diante das dificuldades.

Aos meus colegas da pós-graduação, pelas trocas de conhecimento, apoio e momentos de descontração. Aos colegas, amigos e professores pelo apoio na pesquisa, nas coletas, no processamento do material e nas análises, em especial Lucas, Edgar, Darlan, Miriellen, Jamille, Jefferson e Jesiel, é muito bom e confortador ter com quem contar, sem vocês nada disso seria possível. Aos meus irmãos em Cristo da PIBEC e da IEAD, pelas orações e momentos de comunhão e fortalecimento da fé.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa. Ao meu orientador, Edilson, por me receber no laboratório, pelo incentivo, orientação e por me acompanhar durante a toda a condução da minha pesquisa, muito obrigada por todo apoio, ensinamentos e por me apresentar ao mundo da Apicultura e da Morfometria Geométrica. Aos professores da UFS e de outras instituições, pelos conselhos e direcionamentos. Aos apicultores, que me receberam em seus apiários e me ajudaram na condução da pesquisa, à Thairon e Nicanor, pelo apoio, cuidado e paciência no meu primeiro campo, a primeira vez que entrei em um apiário. À Wando e José, pelo acolhimento e ajuda no meu último campo. À Lorena, por toda a ajuda e direcionamento nas análises da minha pesquisa.

Agradeço aos professores da banca examinadora de defesa, Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, Kátia Peres Gramacho e Leandro de Sousa Souto, pelas contribuições para melhoria da nossa dissertação e pelo incentivo para continuar nosso trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concepção e condução dessa pesquisa, com certeza essa dissertação foi construída por muitas mãos. Um autor desconhecido escreveu que “Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”, eu não poderia ter chegado mais rápido e nem tão longe sem vocês.

Sumário

Lista de figuras	7
Resumo geral.....	8
General Abstract	9
Introdução geral	10
Referências bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 1: <u>ESCUDOS METAPODAIS SÃO INDICADOS COMO ESTRUTURAS</u> PADRÃO PARA ANÁLISES DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E ASSIMETRIA FLUTUANTE DE <i>Varroa destructor</i>	16
Resumo	17
Abstract	18
Introdução.....	19
Material e métodos	20
Resultados	23
Morfometria de <i>Varroa destructor</i> em diferentes localizações geográficas	23
Morfometria de <i>Varroa destructor</i> em colônias de abelhas higiênicas e não higiênicas	25
Assimetria flutuante de <i>Varroa destructor</i> em diferentes localizações geográficas	25
Discussão	26
Referências bibliográficas.....	31
CAPÍTULO 2: <u>O COMPORTAMENTO HIGIÊNICO DAS ABELHAS HOSPEDEIRAS</u> PODE SER ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E DE SIMETRIA DO ÁCARO PARASITO <i>Varroa destructor</i>?	36
Resumo	37
Abstract	38
Introdução.....	39
Material e métodos	40
Amostragem	41
Avaliação do comportamento higiênico.....	41
Montagem do material e obtenção de imagens	42

Estabelecimento dos marcos anatômicos	42
Análises estatísticas das variações morfométricas	43
Análises estatísticas da assimetria flutuante	44
Resultados	44
Influência do comportamento higiênico da colônia na morfometria de <i>V. destructor</i>	44
Influência do comportamento higiênico na assimetria flutuante do parasito	46
Assimetria flutuante do hospedeiro: colônias higiênicas e não higiênicas	46
Discussão	47
Referências bibliográficas	50

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1. Vista ventral de *Varroa destructor* indicando os marcos (vermelho) e semimarcos anatômicos (amarelo) nos escudos genito-ventral (GN) e metapodal (MT).....22

Figura 2. Análise de componentes principais e tendência de deformação, a partir da análise discriminante, dos escudos metapodal e genito-ventral de ácaros *Varroa destructor* em colônias de abelhas na Caatinga (CA) e Mata Atlântica (MA). **A.** Análise de componentes principais da forma do escudo metapodal de ácaros na CA e MA, apresentando o primeiro e segundo componentes principais (PC1, PC2). **C.** Análise de componentes principais da forma do escudo genito-ventral de ácaros na CA e MA, apresentando PC1 e PC2. **B.** Tendência de deformação do escudo metapodal de ácaros na CA e MA. **D.** Tendência de deformação do escudo genito-ventral de ácaros na CA e MA. As Linhas claras correspondem à forma média e as linhas escuras à variação da forma.....24

Figura 3. Nível de assimetria flutuante do tamanho do escudo metapodal de ácaros em diferentes ambientes. CA. Ácaros na Caatinga. MA. Ácaros na Mata Atlântica.....26

Capítulo 2

Figura 1. Marcos anatômicos nos escudos ventrais do ácaro e na asa da abelha. **A.** Vista ventral de *Varroa destructor*, mostrando os marcos (vermelho) e semimarcos (amarelo) nos escudos genito-ventral (GN) e metapodal (MT). **B.** Asa anterior direita de abelha africanizada mostrando os marcos anatômicos.....43

Figura 2. Análise de componentes principais e tendência de deformação dos escudos metapodal e genito-ventral de ácaros *Varroa destructor* que infestam de colônias higiênicas (HIG) e não higiênicas (NH). **A.** Análise de componentes principais da forma do escudo metapodal de ácaros que infestam HIG e NH, apresentando o primeiro e segundo componentes principais (PC1, PC2). **C.** Análise de componentes principais da forma do escudo genito-ventral de ácaros que infestam HIG e NH, apresentando PC1 e PC2. **B.** Tendência de deformação do escudo metapodal de ácaros que infestam NH e HIG. **D.** Tendência de deformação do escudo genito-ventral de ácaros que infestam NH e HIG. As Linhas claras correspondem à forma média e as linhas escuras à variação da forma.....45

Figura 3. Variação do tamanho do escudo metapodal entre ácaros que infestam colônias não higiênicas (NH) e ácaros que infestam colônias higiênicas (HIG).....46

Figura 4. Assimetria flutuante do tamanho. **A.** Assimetria flutuante do tamanho do escudo metapodal de ácaros que infestam colônias não higiênicas (NH) e colônias higiênicas (HIG). **B.** Assimetria flutuante do tamanho das asas dianteiras de abelhas de colônias NH e HIG.....47

Resumo geral

O ácaro *Varroa destructor*, importante parasito das abelhas *Apis mellifera*, está exposto a uma variedade de pressões ambientais, desde as condições climáticas às defesas do hospedeiro, como o comportamento higiênico. A análise da morfologia permitiu mensurar as variações morfológicas dentro e entre populações e inferir sobre suas causas, e a da assimetria flutuante mede o nível de estresse enfrentado durante o desenvolvimento de um organismo. A avaliação desses dois parâmetros em ácaros pode ajudar a compreender suas estratégias adaptativas. Os objetivos do presente estudo foram (1) identificar estruturas corporais que refletem com maior precisão variações morfológicas e assimetria flutuante de *V. destructor*; (2) avaliar a relação entre o nível de comportamento higiênico das colônias de abelhas africanizadas (*A. mellifera*) e a morfologia de *V. destructor*, bem como a relação entre assimetria flutuante do hospedeiro e do parasito nos diferentes tipos de colônia. Ácaros e abelhas africanizadas foram coletados de colônias com níveis distintos de comportamento higiênico, em apiários localizados em áreas de Mata Atlântica e Caatinga, e analisados a partir de morfometria geométrica. As abelhas foram analisadas por meio das asas dianteiras e os ácaros a partir de escudos ventrais: escudos metapodais e escudo genito-ventral. No primeiro capítulo foram identificados os escudos de *V. destructor* que refletem com maior precisão as variações da forma (análise discriminante de validação cruzada) e tamanho (teste t) e a assimetria flutuante da forma e do tamanho (Procrustes ANOVA e teste t). O par de escudos metapodais dos ácaros apresentou os maiores índices de classificação de grupos, a partir da forma, pela validação cruzada, entre localizações (78%) e tipos de colônia hospedeira (70%). Entre tipos de colônia, foi o único que apresentou diferenças para o tamanho entre grupos ($p < 0,001$). Também foi o único escudo que possibilitou a análise de assimetria flutuante da forma e do tamanho. A placa parece mais adequada para refletir diferenciação morfológica e assimetria flutuante, sendo indicada como estrutura padrão para futuras pesquisas. No segundo capítulo, foi analisada a relação entre o nível de comportamento higiênico das colônias de abelhas e a morfologia do ácaro, bem como a relação entre assimetria flutuante do hospedeiro e do parasito nos diferentes tipos de colônia. A partir do escudo metapodal foram encontradas diferenças tanto para a forma ($p < 0,001$) quanto para o tamanho ($p < 0,001$) de ácaros que infestam os diferentes tipos de colônia. Ácaros de colônias higiênicas são menores. As variações encontradas podem indicar que os dois grupos de parasitos enfrentaram pressões distintas durante a ontogenia. Foram encontradas diferenças na assimetria flutuante do tamanho das estruturas de abelhas ($p < 0,01$) e ácaros ($p < 0,01$). Uma relação inversa entre a assimetria flutuante do tamanho das estruturas do hospedeiro e do parasito foi encontrada, abelhas de colônias higiênicas apresentaram índices maiores de assimetria flutuante e seus ácaros associados apresentaram níveis menores. É possível que outros fatores estejam mais associados à assimetria flutuante no âmbito da relação parasito-hospedeiro do que o próprio comportamento higiênico.

Palavras-chave: Comportamento higiênico; Morfometria geométrica; Parasitismo; Plasticidade morfológica.

General Abstract

The *Varroa destructor* mite, a significant parasite of *Apis mellifera* bees, is subjected to a range of environmental pressures, encompassing climatic conditions and host defenses, such as hygienic behavior. Morphological analysis enables the quantification of morphological variations within and among populations, facilitating the inference of their underlying causes. Additionally, assessing fluctuating asymmetry measures the degree of stress encountered during organism development. The evaluation of these two parameters in mites can contribute to a comprehensive understanding of their adaptive strategies. The objectives of the present study were (1) to identify anatomical structures that more precisely capture morphological variations and fluctuating asymmetry in *V. destructor*; (2) to assess the relationship between the level of hygienic behavior in Africanized bee colonies (*A. mellifera*) and the morphology of *V. destructor*, as well as the correlation between fluctuating asymmetry in the host and parasite across different colony types. Mites and Africanized bees were collected from colonies exhibiting varying degrees of hygienic behavior in apiaries located in the Atlantic Forest and Caatinga regions. The analysis of bees involved the examination of their front wings, while mites were scrutinized based on their ventral shields, specifically the metapodal shields and genito-ventral shield. In the first chapter, *V. destructor* shields were identified that most accurately reflect variations in shape (cross-validation discriminant analysis) and size (t-test) and the fluctuating asymmetry of shape and size (Procrustes ANOVA and t-test). The pair of mite metapodal shields presented the highest group classification rates, based on shape, by cross-validation, between locations (78%) and types of host colony (70%). Among colony types, it was the only one that showed differences in size between groups ($p < 0.001$). It was also the only shield that allowed the analysis of fluctuating asymmetry of shape and size. The plate seems more suitable to reflect morphological differentiation and fluctuating asymmetry, and is recommended as a standard structure for future research. In the second chapter, we investigated the relationship between the level of hygienic behavior in bee colonies and the morphology of *V. destructor* mites, as well as the connection between fluctuating asymmetry in the host and parasite across different colony types. Notably, significant differences were observed in both the shape ($p < 0.001$) and size ($p < 0.001$) of mites infesting different colony types, particularly in the metapodal shield. Mites from hygienic colonies exhibited smaller sizes, suggesting distinct developmental pressures experienced by the two parasite groups. Moreover, variations were identified in the fluctuating asymmetry of both bee ($p < 0.01$) and mite ($p < 0.01$) structures. An inverse correlation was observed in the fluctuating asymmetry of size between host and parasite structures; bees from hygienic colonies exhibited higher rates of fluctuating asymmetry, while their associated mites demonstrated lower levels. These findings indicate that factors beyond hygienic behavior may exert a more significant influence on fluctuating asymmetry within the host-parasite relationship.

Keywords: Geometric morphometry; Hygienic behavior; Morphological plasticity; Parasitism.

Introdução geral

Para sobreviver e se reproduzir os indivíduos devem superar uma variedade de pressões que lhes são impostas, diante de mudanças ambientais podem ajustar suas estratégias em curtos períodos de tempo a partir da plasticidade fenotípica (Clifton et al., 2020). Essa propriedade pode ser definida como a capacidade de um único genótipo expressar fenótipos alternativos a depender das condições bióticas ou abióticas as quais o organismo é exposto durante sua ontogenia, podendo se apresentar em diferentes dimensões, dentre elas, a morfológica (Agrawal, 2001; Forsman, 2015). De fato, as pressões ambientais frequentemente modulam a morfologia dentro e entre populações pois podem interferir nos processos de crescimento e morfogênese (Zelditch et al., 2004; Clifton et al., 2020).

Enquanto a análise da morfologia pode dar pistas sobre as causas da variação morfológica em resposta às pressões ambientais que estão sendo medidas (Zelditch et al., 2004), a avaliação da assimetria flutuante, um tipo de desvio de simetria, pode refletir o nível de estresse enfrentado durante o desenvolvimento de um indivíduo (Klingenberg; Nijhout, 1999; Klingenberg, 2003; Klingenberg, 2015). Isso é possível por que a assimetria de estruturas bilateralmente simétricas é, em geral, atribuída a ruídos aleatórios que se acumulam durante a ontogenia (Klingenberg; Nijhout, 1999).

O ácaro *Varroa destructor* Anderson e Treuman, 2000 é ectoparasito de abelhas melíferas e se desenvolve dentro de células de cria das abelhas, não apresenta estágio de vida livre e seu ciclo de vida é composto por uma fase reprodutiva e outra de dispersão (Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020). Na fase reprodutiva, o ácaro fêmea entra em uma célula de cria de operária ou zangão pouco antes de ser selada, ali coloca ovos que darão origem à um macho e algumas fêmeas, à medida que atingem a maturidade, as fêmeas acasalam com o ácaro macho (Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020). Quando a abelha recém-formada emerge da célula, apenas o ácaro mãe e suas descendentes fêmeas maduras sairão da célula aderidas ao corpo da abelha e iniciarão a fase de dispersão, período em que circulam pela colônia até entrarem em contato com uma nova célula de cria (Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020).

Durante o desenvolvimento das fêmeas a forma do corpo muda de oblongo para um corpo elíptico, com largura maior que o comprimento (Rosenkranz et al., 2010). O corpo do ácaro é dividido em duas regiões, o idiossoma e gnatossoma. O gnatossoma é formado pelas peças bucais (dois pedipalpos e duas quelíceras), o idiossoma é achatado e coberto por escudos esclerotizados articulados, um grande escudo dorsal e sete placas ventrais menores, que protegem seus órgãos internos e são unidos por membranas finas e flexíveis (Rosenkranz et al., 2010; Piou et al., 2021). A ontogênese dos ácaros fêmeas dura entre cinco e seis dias, depois da eclosão do ovo, elas passam pelos estágios de protoninfa e deutoninfa, com uma muda em cada um deles (Donzé; Guerin, 1994; Martin, 1994; 1995). Cada estágio é subdividido por uma fase móvel inicial e, antes de cada muda, as ninfas tornam-se imóveis, nessa fase elas são chamadas de protocrisálida e deutocrisálida (Donzé; Guerin, 1994; Rosenkranz et al., 2010). Após a última muda, as fêmeas atingem a maturidade (Ziegelmann et al., 2013).

Dada a disseminação mundial do parasito a partir do comércio internacional de colônias, os ácaros podem ser expostos a uma variedade de pressões durante sua ontogenia, que resultam da interação de múltiplos fatores, dentre eles a localização geográfica, sazonalidade, subespécie hospedeira, manejo da colônia, resistência do hospedeiro, características genéticas e ecológicas da colônia e fatores do próprio parasito (Wilson-Rich et al., 2009; Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020; Mondet et al., 2020). Dessa maneira, é indispensável avaliar a plasticidade morfológica de *V. destructor* para ampliar o conhecimento sobre a sua capacidade de lidar com diferentes pressões e a viabilidade de longo prazo de suas populações frente a ambientes tão variáveis (Pigliucci, 2005; Clifton et al., 2020).

No entanto, o conhecimento sobre a variabilidade morfológica de *V. destructor* se baseia, em grande parte, em estudos que utilizam morfometria tradicional, técnica que usa medidas lineares (Rahmani et al., 2006; Maggi et al., 2009; Borsuk et al., 2012; Abou-Shaara; Tabikha, 2016; Aude et al., 2016; Loeza-Concha et al., 2018; Yevstafieva et al., 2020; Düttmann et al., 2021; Domínguez-Rebolledo et al., 2022). Essa abordagem pode apresentar limitações para o estudo da forma das estruturas biológicas, principalmente por levar a perda de informações sobre a forma e diminuir a robustez das análises (Rohlf; Marcos, 1993; Adams et al., 2004). Enquanto a morfometria geométrica usa técnicas que sanam essas limitações (Zelditch et al., 2004; Fornel; Cordeiro-Estrela, 2012), podendo se apresentar como uma ferramenta mais adequada para estudos morfológicos de *V. destructor*. Apesar disso, os estudos da morfologia desse ácaro a partir da morfometria geométrica são escassos e não há padronização das estruturas analisadas (Giménez et al., 2017).

Além disso, a plasticidade morfológica em *V. destructor* têm sido demonstrada entre populações (Maggi et al., 2009; Aude et al., 2016; Farjamfar et al., 2018) entre estações (Yevstafieva et al., 2020), pela exposição a acaricidas (Maggi et al., 2012; Loeza-Concha et al., 2018), e entre morfotipos de abelhas *A. mellifera* (Giménez et al., 2017), mas o efeito da resistência do hospedeiro sobre a morfologia e a assimetria flutuante de *V. destructor* permanece desconhecido. Adicionalmente, estudos que avaliam a assimetria flutuante de estruturas corporais de *V. destructor* são escassos.

As estratégias de resistência das abelhas podem ser importantes mecanismos de controle da infestação por *V. destructor*, ao eliminar ácaros da colônia e interromper sua reprodução (Wilson-Rich et al., 2009; Cheruiyot et al., 2018). O comportamento higiênico é uma estratégia de resistência coletiva realizado por abelhas adultas, que consiste na detecção e remoção de cria morta ou doente da colônia, para controlar a disseminação de doenças da cria (Wilson-Rich et al., 2009). A abelha africanizada (*Apis mellifera* L.) é um híbrido resultante do cruzamento entre uma subespécie africana (*Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836) e subespécies de abelhas melíferas europeias e do Médio Oriente (Guzmán-Novoa et al., 2020; Zárate et al., 2022). Quando comparada às abelhas europeias, são mais resistentes a *V. destructor*, o que inclui maior eficiência no comportamento higiênico (Guzmán-Novoa et al., 1999; Martin; Kryger, 2002). Mas mesmo nas abelhas africanizadas, as taxas de comportamento higiênico podem variar de acordo com as características genéticas e ecológicas da colônia, resultando em diferentes níveis de resistência (Wilson-Rich et al., 2009; Pereira et al., 2013). Desse modo, é possível

que colônias com diferentes resistências possam se configurar como ambientes de desenvolvimento distintos para os ácaros que as infestam.

A relevância de se estudar e monitorar as populações de *V. destructor*, bem como dos fatores que modulam sua morfologia e interferem em seu desenvolvimento, é reforçada quando levamos em consideração sua importância ecológica e econômica. O ácaro tem provocado grande impacto sobre populações selvagens e manejadas do novo hospedeiro (Rosenkranz et al., 2010), ao afetar abelhas adultas e imaturas com danos físicos, comportamentais e imunológicos (Kralj; Fuch, 2006; Koleoglu et al., 2017; 2018; Ramsey et al., 2019). Adicionalmente, o ácaro pode transmitir vírus às abelhas, como o vírus da asa deformada (DWV) e o vírus da paralisia aguda das abelhas (ABPV) e interage com outros, como o vírus da cria ensacada (SBV), comprometendo a saúde das abelhas (Miranda et al., 2010; Di Prisco et al., 2016; Thaduri et al., 2018). Em especial, apresenta uma relação mutualística com o DWV, que leva ao comprometimento da imunidade do hospedeiro, o efeito sinérgico dessa associação está entre as principais causas da perda de colônias de abelhas europeias na América do Norte e na Europa (Rosenkranz et al., 2010; Guzman-Novoa et al., 2010; Nazzi et al., 2012).

Diante disso, torna-se evidente a necessidade de pesquisas que utilizem ferramentas mais eficazes para identificar as variações morfológicas de *V. destructor*, selecionar estruturas morfológicas que refletem com maior precisão as variações morfológicas e identificar estruturas que indicam com maior precisão a instabilidade no desenvolvimento do parasito. Ademais é de fundamental importância avaliar se o nível de comportamento higiênico afeta a morfologia e o desenvolvimento do ácaro.

Com o objetivo de realizar essas avaliações, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo foram identificadas, por meio da morfometria geométrica, estruturas corporais que refletem com maior precisão as variações morfológicas de morfotipos e a assimetria flutuante do parasito, de modo que possam ser utilizadas em futuras pesquisas de campo, experimentos e monitoramento. Já no segundo capítulo, a relação entre o nível de comportamento higiênico das colônias de abelhas e a morfologia do ácaro, bem como a relação entre assimetria flutuante do hospedeiro e do parasito nos diferentes tipos de colônia foram avaliadas.

Referências bibliográficas

- Abou-Shaara HF, Tabikha RM (2016) Morphological characterization and a morphometry map for *Varroa* mites from northwest of egypt. *Cercetari Agronomice in Moldova* 49(4):75–84. <https://doi.org/10.1515/cerce-2016-0038>
- Agrawal AA (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294:321-326. <https://doi.org/10.1126/science.106070>
- Aude KE, Armand P, Francois A, Charlemagne G, Georg G, Manuelle T, Lamine BM (2016) Morphometric characterization of parasite *Varroa* sp. of bee *Apis mellifera* l. in Benin. *European Scientific Journal* 12(33): 221. <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n33p221>

- Borsuk G, Olszewski K, Strachecka A, Paleolog J, Kasperek K (2012) Genetic and morphometric variation of the *Varroa destructor* developing in standard and small comb cells. *Med. Weter* 68(10): 599-602
- Cheruiyot SK, Lattorff HMG, Kahuthia-Gathu R, Mbugi JP, Muli E (2018) *Varroa*-specific hygienic behavior of *Apis mellifera scutellata* in Kenya. *Apidologie* 49:439-449. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0570-6>
- Clifton IT, Chamberlain JD, Gifford ME (2020) Role of phenotypic plasticity in morphological differentiation between watersnake populations. *Integrative Zoology* 15(4):329–337. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12431>
- Di Prisco G, Annoscia D, Margiotta M, Ferrara R, Varricchio P, Zanni V, Pennacchio F (2016) A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(12): 3203-3208. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523515113>
- Domínguez-Rebolledo Á, Quej-Chi V, Chi-Maas D, Lemus-Flores C, Dzib-Cauich D, Loeza-Concha H (2022) Identificación morfométrica de la especie predominante de *Varroa* (Parasitiformes: Varroidae) en colonias de abejas en Hopelchén, Campeche. *Abanico Veterinario* 12:1-13. <https://doi.org/10.21929/abavet2022.2>
- Donzé G, Guerin PM (1994) Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34:305-319. <https://doi.org/10.1007/BF00197001>
- Düttmann C, Flores B, Sheleby-Elías J, Castillo G, Osejo H, Bermudez S, Demedio J (2021) Morphotype and haplotype identification of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), and its importance for apiculture in Nicaragua. *Experimental and Applied Acarology* 83(4): 527–544. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00603-9>
- Farjamfar M, Saboori A, Nozari J (2018) Morphometric analysis in different geographical populations of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) associated with *Apis mellifera* colonies in Iran. *Systematic and Applied Acarology* 23(10): 1915-1930. <https://doi.org/10.11158/saa.23.10.4>
- Fornel R, Cordeiro-Estrela P (2012) Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: Marinho JR, Hepp LU, Fornel R (org) *Temas em Biologia: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim*, 1ª ed. Erechim, EDIFAPES, pp 101-120.
- Forsman A (2015) Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity*, 115: 276–284. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.92>
- Giménez PM, Mendoza Y, Invenizzi C, Fuselli S, Alonso SR., Fernández IP, Maggi M (2017) Morphometric correlation between *Apis mellifera* morphotypes (Hymenoptera) and *Varroa destructor* (Acari) from Uruguay. *Journal of Apicultural Research* 56(2): 122–129. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1287998>
- Guzmán-Novoa E, Vandame R, Arechavaleta ME (1999) Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apidologie* 30:173-182.
- Guzman-Novoa E, Morfin N, De la Mora A, Macías-Macías JO, Tapia-González JM, Contreras-Escareño F, Medina-Flores CA, Correa-Benítez A, Quezada-Euán JJG (2020) The process and outcome of the africanization of honey bees in Mexico: lessons and future directions. *Frontiers in Ecology and Evolution* 8:608091. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2020.608091>
- Klingenberg CP, Nijhout HF (1999) Genetics of fluctuating asymmetry: a developmental model of developmental instability. *Evolution* 53(2):358–375. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb03772.x>

- Klingenberg CP (2003) A developmental perspective on developmental instability: theory, models and mechanisms. In: Polak M (ed) Developmental instability: causes and consequences. Oxford University Press, New York, pp 427–442
- Klingenberg CP (2015) Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry* 7(2):843–934. <https://doi.org/10.3390/sym7020843>
- Loeza-Concha H, Domínguez-Rebolledo A, Escalera-Valente F, Ávila-Ramos F, Carmona-Gasca C (2018) Morphometric identification of *Varroa destructor* and its plasticity by the exposure to thymol. *Abanico Veterinario* 8(2): 98–107. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.82.9>
- Maggi MD, Sardella NH, Ruffinengo SR, Eguaras MJ (2009) Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitology Research* 105(6): 1629–1636. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1605-8>
- Martin SJ (1994) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and applied acarology* 18(2):87–100
- Martin SJ (1995) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and applied acarology* 19(4):199–210
- Martin SJ, Kryger P (2002) Reproduction of *Varroa destructor* in South African honey bees: does cell space influence *Varroa* male survivorship?. *Apidologie* 33(1):51–61. <https://doi.org/10.1051/apido:2001007>
- Miranda JR, Cordoní G, Budge G (2010) The acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of invertebrate pathology* 103:30–47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014>
- Mondet F, Beaurepaire A, McAfee A, Locke B, Alaux C, Blanchard S, Danka B, Le Conte Y (2020) Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: A systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal for Parasitology* 50(6):433–447. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>
- Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Pennacchio F (2012) Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS pathogens* 8(6):e1002735. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002735>
- Pereira RA, Morais MM, Franco TM, Gonçalves LS (2013) Hygienic behavior of Africanized honey bees *Apis mellifera* directed towards brood in old and new combs during diurnal and nocturnal periods. *Insects* 4(4):521–532. <https://doi.org/10.3390/insects4040521>
- Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?. *Trends in ecology and evolution* 20(9):481–486. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.001>
- Rahmani H, Kamali K, Saboori A, Nowzari J (2006) Report and survey of morphometric characteristics of *Varroa destructor* (Acari:Varroidae) collected from honey bees in Tehran Province, Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 8(4): 351–355.
- Rath W (1999) Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30(2-3):97–110. <https://doi.org/10.1051/apido:19990202>
- Rohlf FJ, Marcus LF (1993) A revolution morphometrics. *Trends in ecology and evolution* 8(4):129–132. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J)
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103:96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

- Thaduri S, Locke B, Granberg F, de Miranda JR (2018) Temporal changes in the viromes of Swedish *Varroa*-resistant and *Varroa*-susceptible honeybee populations. PLoS One 13(12):e0206938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206938>
- Traynor KS, Mondet F, De Miranda JR, Techer M, Kowalik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A (2020) *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. Trends in Parasitology 36(7):592–606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. Annual review of entomology 54:405–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>
- Yevstafieva VO, Zaliznaya LM, Nazarenko OS, Melnychuk VV, Sobol'ta AG (2020) Morphological variation of *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidae) in different seasons. Biosystems Diversity 28(1):18–23. <https://doi.org/10.15421/012003>
- Zárate D, Lima TG, Poole JD, Calfee E, Burton RS, Kohn JR (2022) Admixture in africanized honey bees (*Apis mellifera*) from Panama to San Diego, California (USA). Ecology and evolution 12(2):e8580. <https://doi.org/10.1002/ece3.8580>
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL (2004) Geometric morphometrics for biologists: A primer. Elsevier Academic Press.
- Ziegelmann B, Lindenmayer A, Steidle J, Rosenkranz P (2013) The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. Apidologie 44(3):314–323. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0182-5>

CAPÍTULO 1

**ESCUDOS METAPODAIS SÃO INDICADOS COMO ESTRUTURAS PADRÃO PARA
ANÁLISES DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E ASSIMETRIA FLUTUANTE DE *Varroa*
*destructor***

Resumo

O ácaro *Varroa destructor*, ectoparasito de abelhas *Apis mellifera*, possui ampla distribuição geográfica e tem causado impacto econômico e ecológico sobre colônias manejadas e selvagens de seus hospedeiros. Diante das pressões ambientais, os parasitos podem se adaptar rapidamente a partir da plasticidade morfológica, e o estudo da morfologia e da assimetria de estruturas corporais pode oferecer importantes pistas sobre pressões enfrentadas durante os processos de crescimento e morfogênese. Sendo importantes para compreender a capacidade adaptativa de uma espécie e a viabilidade de longo prazo de suas populações. Dentre as variações ambientais que os ácaros podem enfrentar está a associação com morfotipos hospedeiros distintos e as defesas das abelhas, como o comportamento higiênico das colônias. O objetivo da presente pesquisa foi identificar, por meio da morfometria geométrica, estruturas corporais que refletem com maior precisão as variações morfológicas e a assimetria flutuante do parasito em diferentes contextos ambientais. Ácaros em fase de dispersão foram coletados em colônias de abelhas africanizadas (*A. mellifera*) considerando (1) níveis distintos de comportamento higiênico de colmeias do mesmo apiário; (2) colônias em áreas de Caatinga e de Mata Atlântica. O material foi submetido a análises morfométricas para quantificar as variações de forma e tamanho, bem como, de assimetria flutuante do par de escudos metapodais e genito-ventral de *V. destructor*. As variações da forma de ácaros dos contextos 1 e 2 foram avaliadas a partir de análise discriminante de validação cruzada e as de tamanho com teste t. As assimetrias flutuantes da forma e do tamanho foram analisadas apenas em ácaros do contexto 1, a partir de Procrustes ANOVA e teste t. Pela validação cruzada o escudo metapodal apresentou maiores índices de classificação de grupos, entre tipos de colônia hospedeira (70%) e localizações (78%), quando comparado ao escudo genito-ventral (64% e 65%, respectivamente). Não houve diferenças significativa no tamanho dos dois escudos no contexto 2. No contexto 1, o escudo metapodal foi o único que apresentou diferenças para o tamanho entre grupos ($p < 0,001$). A variabilidade da forma e tamanho é um indicativo de que os grupos de parasitos enfrentaram pressões distintas durante o crescimento e a morfogênese. Em relação a assimetria flutuante, os ácaros do contexto 1 apresentaram níveis significativos de assimetria flutuante para a forma e tamanho ($p < 0,001$) do par de escudos metapodais, e para a forma do escudo genito-ventral ($p < 0,001$). O escudo metapodal foi o único que possibilitou a análise de assimetria flutuante do tamanho, apresentando diferença entre os grupos ($p < 0,05$). De modo geral, o par de escudos metapodais parece mais adequado para refletir variações de forma, tamanho e assimetria flutuante do parasito em diferentes contextos ambientais, sendo indicado como estrutura padrão a ser utilizada em futuras pesquisas de campo, experimentos e monitoramento envolvendo *V. destructor*.

Palavras-chave: Ácaros; Instabilidade do desenvolvimento; Morfometria geométrica; Variação morfológica.

Abstract

The *Varroa destructor* mite, an ectoparasite of *Apis mellifera* bees, exhibits a broad geographic distribution and has inflicted economic and ecological impacts on both managed and wild colonies of its hosts. In response to environmental pressures, parasites can rapidly adapt through morphological plasticity. The study of morphology and asymmetry in body structures provides valuable insights into the challenges encountered during the processes of growth and morphogenesis. These insights are crucial for understanding the adaptive capacity of a species and the long-term viability of its populations. Among the environmental variations that mites may encounter is their association with different host morphotypes and bee defenses, such as the hygienic behavior of colonies. The objective of this research was to identify, through geometric morphometrics, body structures that more accurately reflect the morphological variations and fluctuating asymmetry of the parasite in different environmental contexts. Mites in the dispersion phase were collected in colonies of Africanized bees (*A. mellifera*) considering (1) different levels of hygienic behavior of hives in the same apiary; (2) colonies in Caatinga and Atlantic Forest areas. The material was subjected to morphometric analyzes to quantify variations in shape and size, as well as fluctuating asymmetry of the pair of metapodal and genito-ventral shields of *V. destructor*. Variations in the shape of mites in contexts 1 and 2 were evaluated using cross-validation discriminant analysis and size variations using the t test. Fluctuating asymmetries in shape and size were analyzed only in mites from context 1, using Procrustes ANOVA and t-test. Through cross-validation, the metapodal shield exhibited higher group classification rates between types of host colonies (70%) and locations (78%), surpassing the performance of the genito-ventral shield (64% and 65%, respectively). No significant differences in the size of the two shields were observed in context 2. However, in context 1, the metapodal shield was the only one that demonstrated significant size differences between groups ($p < 0.001$). The observed variability in shape and size suggests that distinct groups of parasites experienced varying pressures during growth and morphogenesis. Regarding fluctuating asymmetry, mites from context 1 exhibited significant levels of fluctuating asymmetry for both the shape and size ($p < 0.001$) of the pair of metapodal shields, as well as for the shape of the genito-ventral shield ($p < 0.001$). The metapodal shield was the only one that allowed for the analysis of fluctuating size asymmetry, revealing a difference between groups ($p < 0.05$). In general, the pair of metapodal shields appears to be more suitable for reflecting variations in shape, size, and fluctuating asymmetry of the parasite in different environmental contexts. It is recommended as a standard structure for use in future field research, experiments, and monitoring involving *V. destructor*.

Keywords: Developmental instability; Geometric morphometry; Mites; Morphological variation.

Introdução

A plasticidade fenotípica permite que os organismos se ajustem às mudanças ambientais em curtos períodos de tempo, pois pode ocorrer dentro de uma única geração. Além disso, se apresenta em diferentes níveis, dentre eles, o morfológico (Clifton et al., 2020). De fato, os processos biológicos podem levar a mudanças no formato entre indivíduos ou suas partes e o estudo da morfologia permite identificar variações na forma e tamanho, que podem estar associadas a diferenças nas pressões enfrentadas durante os processos de crescimento e morfogênese dos organismos (Zelditch, 2004).

A relação entre o ácaro ectoparasito *Varroa destructor* Anderson e Treuman, 2000 e subespécies da abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, levou à sua disseminação mundial, facilitada pelo comércio internacional de colônias (Rosenkranz et al., 2010). Em seu hospedeiro original, a abelha asiática *Apis cerana* Fabricius, 1793, a coevolução parece ter levado a baixos níveis de infestação e dano (Rath, 1999; Locke, 2016). Entretanto, o ácaro tem causado grande impacto sobre populações selvagens e manejadas nos novos hospedeiros (Rosenkranz et al., 2010), com níveis de infestação e dano que variam entre subespécies da abelha, localização geográfica e estação (Martin et al., 1997; Vandame et al., 2000; Martin, 2001; Medina et al., 2002). Portanto, é fundamental estudar as populações de *V. destructor* e sua capacidade de adaptação às pressões seletivas em diferentes contextos ambientais.

O ácaro não possui estágio de vida livre, estando estritamente relacionado ao seu hospedeiro e seu único ambiente é a colônia (Rosenkranz et al., 2010). As abelhas melíferas apresentam uma alta plasticidade fenotípica que contribui para a sua adaptação à diferentes regiões e climas, e que resulta na diferenciação de suas populações, incluindo caracteres morfológicos (Le Conte; Navajas, 2008; Sousa et al., 2016). É possíveis a variação encontrada entre as populações hospedeiras afete os parasitos. De fato, a associação do ácaro *V. destructor* com diferentes ecótipos de uma mesma espécie de abelha mostrou que as populações do parasito podem apresentar correlação morfométrica com seus hospedeiros (Giménez et al., 2017). Além disso, mecanismos de resistência das abelhas podem afetar os parasitos (Wilson-Rich et al., 2009). O comportamento higiênico, por exemplo, é uma estratégia de resistência coletiva realizado por abelhas adultas, que consiste na detecção e remoção de cria morta ou doente da colônia, para controlar a disseminação de doenças da cria (Wilson-Rich et al., 2009). Contra *V. destructor* esse mecanismo pode atuar eliminando os ácaros da colônia e interrompendo sua reprodução (Cheruiyot et al., 2018). Mas as taxas de comportamento higiênico, ou seja, a velocidade com que as abelhas o realizam, varia de acordo com as características genéticas e ecológicas de cada colônia (Wilson-Rich et al., 2009). Portanto, é possível que as diferentes condições ambientais resultantes da interação entre esses fatores levem às mais diversas pressões durante a morfogênese do ácaro.

O corpo de *V. destructor* é achatado e coberto por placas esclerotizadas articuladas, um grande escudo dorsal e sete placas ventrais menores, que protegem seus órgãos internos (Piou et al., 2021), e que têm sido utilizadas em estudos populacionais a partir da morfologia de estruturas corporais do ácaro,

tais como os escudos ventrais. Apesar disso, a maioria delas se baseia na morfometria tradicional, que utiliza medidas lineares (Rahmani et al., 2006; Maggi et al., 2009; Borsuk et al., 2012; Aude et al., 2016; Abou-Shaara; Tabikha, 2016; Loeza-Concha et al., 2018; Farjamfar et al., 2018; Yevstafieva et al., 2020; Düttmann et al., 2021; Domínguez-Rebolledo et al., 2022). Essa abordagem pode apresentar limitações para o estudo de estruturas biológicas, sobretudo da forma, principalmente por levar a perdas de informações sobre essa característica e diminuir a robustez das análises (Adams et al., 2004). Como a morfometria geométrica usa técnicas que sanam essas limitações (Zelditch et al., 2004; Fornel; Cordeiro-Estrela, 2012), pode se apresentar como uma ferramenta mais adequada para estudos que se baseiam na morfologia de *V. destructor*.

Enquanto a análise da forma pode indicar diferenças nos processos de morfogênese e seus fatores causais (Zelditch, 2004), o nível de estresse enfrentado durante o desenvolvimento de um indivíduo, pode ser medido a partir da assimetria flutuante, um tipo de desvio de simetria que denota pequenas diferenças entre os lados direito e esquerdo do corpo (Klingenberg; Nijhout, 1999; Palmer, 1994; Klingenberg, 2015). Dessa forma, pode indicar o nível de estresse enfrentado por *V. destructor* por meio da avaliação da assimetria flutuante dos indivíduos sob diferentes condições ambientais. Tanto as variações morfológicas quanto a assimetria flutuante podem ser analisadas a partir das técnicas de morfometria geométrica (Fornel; Cordeiro-Estrela, 2012; Klingenberg, 2015).

Diante da necessidade de estudos mais precisos para identificar, quantificar e visualizar as variações de forma das estruturas e dos desvios de simetria corporal de *V. destructor*, o objetivo da presente pesquisa foi identificar, por meio da morfometria geométrica, estruturas corporais que refletem com maior precisão as variações morfológicas e a assimetria flutuante do ácaro, de modo que possam ser utilizadas em futuras pesquisas de campo, experimentos, monitoramento do parasito.

Material e métodos

Para obter fêmeas adultas de *V. destructor* na fase de dispersão, período em que se fixam ao corpo do hospedeiro para circular pela colônia, amostras de abelhas adultas foram obtidas do interior de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). Aproximadamente 100 abelhas por colmeia foram coletadas aleatoriamente e acondicionadas em álcool a 70%. As 20 colônias amostradas estavam inseridas em dois apiários no estado de Sergipe, sendo 10 no município de Itabi (10°05'13.71"S 37°11'09.26" W), cercado por vegetação de Caatinga, e 10 em Itaporanga d'Ajuda (11°02'07.77"S 37°18'53.41"W), circundado por vegetação de Mata Atlântica.

As duas regiões apresentam uma estação seca e uma chuvosa (Aragão et al., 2013; Santos et al., 2014), as coletas foram realizadas no período de estiagem nas duas áreas. O clima difere entre as regiões onde as áreas de estudo estão inseridas, na porção da Mata Atlântica é tropical úmido, enquanto na Caatinga é semiárido (Aragão et al., 2013; Santos et al., 2014). No domínio das Caatingas o clima é fortemente sazonal, as temperaturas são elevadas e relativamente constantes, a umidade relativa do ar é

baixa e o regime de chuvas é marcado pela escassez e irregularidade (Velloso et al., 2002; Ab'Sáber, 2003; Moura et al., 2007). No bioma Mata Atlântica o clima também apresenta temperaturas altas, mas a umidade relativa do ar é elevada e as precipitações abundantes (Pereira, 2009).

Para as análises morfométricas, consideramos: 1) ácaros dos dois ambientes, obtidos em 10 colônias de cada área e 2) ácaros provenientes de 5 colônias de abelhas higiênicas e 5 de colônias não higiênicas, localizadas no apiário da Caatinga. A taxa de comportamento higiênico das colônias foi determinado pelo método de perfuração de cria com alfinete (pin-killed), que consiste em sacrificar a cria perfurando-a com alfinete entomológico, e a partir disso, avaliar as taxas de detecção e remoção da cria morta pelas abelhas adultas em 24 horas após o tratamento (Moretto; Gonçalves, 1993; Gramacho et al., 1999; Büchler et al., 2013; Khan; Ghramh, 2021). Colônias com índice $\geq 90\%$ de remoção de cria morta artificialmente foram consideradas higiênicas e as com $< 90\%$ foram classificadas como não higiênicas (Palacio et al., 2010).

Quando necessário, os ácaros tiveram seus últimos pares de pernas removidos, para evitar sobreposição e facilitar o registro fotográfico das placas ventrais a serem medidas. Em seguida os ácaros foram montados com a face ventral voltada para cima, entre lâminas e lamínulas de microscopia, utilizando esmalte incolor. Os materiais foram fotografados com auxílio de um estereomicroscópio digital com câmera acoplada. As imagens foram espelhadas para obter posição idêntica para os lados direito e esquerdo, afim de facilitar a medição das regiões anatômicas, e transformadas em arquivo tps no programa tpsUtil32 versão 1.82 (Rohlf, 2015).

Foram avaliados o escudo genito-ventral e o par de escudos metapodais de cada ácaro. Cada escudo metapodal possui a forma de um triângulo alongado e é delimitado pelas margens superior (marcos 2 a 3), mediana (marcos 1 a 2) e lateral (marcos 1 a 3), conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 1). O escudo genito-ventral possui um ápice arredondado (marcos 7, 8 e 9), uma base achatada (marcos 1, 11 e 4) e em cada margem, há uma projeção angulosa (Figura 1). Levando em consideração a morfologia dos escudos a serem medidos, o programa tpsdig264 versão 2.32 (Rohlf, 2015) foi usado para registrar três marcos (1-3) nos vértices e cinco semimarcos (4-8) nas margens dos escudos metapodais, direito e esquerdo. No escudo genito-ventral foram registrados quatro marcos (1-4) e oito semimarcos (5-12). Para cada escudo, as medições foram duplicadas para ter em conta os erros de medição (Palmer, 1994).

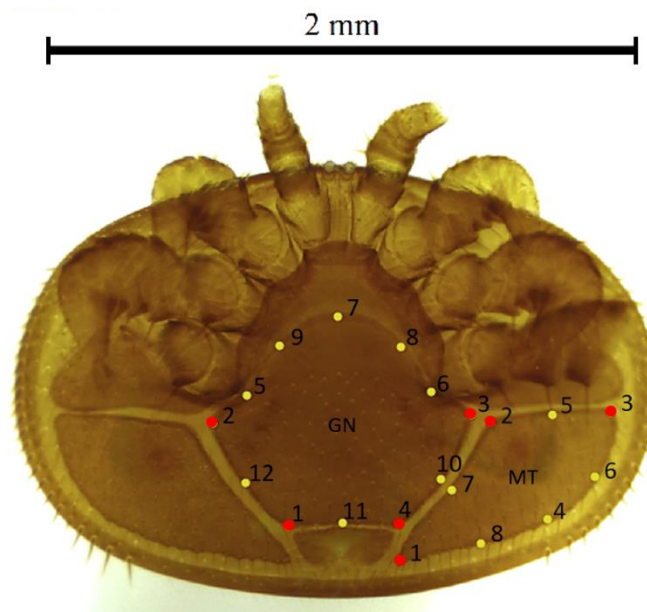


Figura 1. Vista ventral de *Varroa destructor* indicando os marcos (vermelho) e semimarcos anatômicos (amarelo) nos escudos genito-ventral (GN) e metapodal (MT).

As análises morfométricas foram realizadas no software MorphoJ (Klingenberg, 2011), iniciando com a sobreposição de Procrustes, que ajusta a posição dos objetos, por meio de translação, proporcionalização e rotação, e gera as variáveis a serem analisadas (forma e tamanho) (Bookstein, 1982). Em seguida, para a análise da variação de forma das estruturas, levando em consideração ambientes e tipos de colônia, uma matriz de covariância foi criada e, a partir dela, realizada uma Análise de Componentes principais (PCA) (Zelditch et al., 2004). Posteriormente, uma análise discriminante de validação cruzada considerando 1.000 permutações foi aplicada (Zelditch et al., 2004). Para visualizar a tendência de deformação das estruturas, analisamos grades de deformação e Wireframes. As análises de tamanho das estruturas foram realizadas no software PAST, utilizando o tamanho do centroide, ou seja, a raiz quadrada da soma dos desvios quadrados dos marcos em torno de seu centro de massa (Bookstein, 1991), após teste de normalidade (Shapiro-Wilk) um teste t foi aplicado.

Para avaliar o índice de assimetria flutuante do tamanho e da forma das estruturas analisadas, foi realizada uma Procrustes ANOVA (Klingenberg; McIntyre, 1998; Palmer; Strobeck, 2003) no software MorphoJ, onde o tamanho do centroide e a forma foram utilizados como variáveis independentes, o lado do corpo como efeito fixo, o indivíduo como efeito aleatório (Klingenberg; McIntyre, 1998). Dessa forma, o efeito do indivíduo representa a variação individual, e o efeito do lado do corpo representa a assimetria da estrutura. O valor para o efeito do lado do corpo e dos indivíduos foi obtido pelo denominador da interação indivíduo x lado obtido pelo denominador do erro de medição (Klingenberg; McIntyre, 1998). Após teste de normalidade (Shapiro-Wilk), um teste t foi aplicado para avaliar diferenças de forma e tamanho entre os grupos, utilizando o programa PAST.

Resultados

Morfometria de *Varroa destructor* em diferentes localizações geográficas

Quando os ácaros da Caatinga e os da Mata Atlântica foram analisados com base no escudo metapodal, a PCA mostrou que os dois primeiros componentes principais explicaram 61% da variação total da forma, o primeiro 38,5% da variação e o segundo 22,5% (Figura 2. A). A partir da análise de função discriminante foi encontrada diferença significativa para a forma do escudo entre os grupos, tanto para a distância de Procrustes ($p < 0,001$) quanto para a de Mahalanobis ($p < 0,001$). A partir da validação cruzada o índice de classificação dos indivíduos em seus respectivos grupos com base na forma da placa foi de 78%. No escudo metapodal, tanto de ácaros da Mata Atlântica quanto nos da Caatinga, as deformações mais evidentes ocorreram ao longo da margem mediana (marcos 1 a 2) e da lateral (marcos 1 a 3) (Figura 2. B). Em ácaros da Mata Atlântica, o escudo metapodal é mais estreito, a margem medial (1-2) apresenta uma reentrância mediana, a margem lateral é menos arredondada e sua porção apical (6-3) é mais expandida em comparação aos ácaros da Caatinga. Em relação ao tamanho dessa placa não houve diferença estatisticamente significativa entre os ácaros dos dois ambientes ($p > 0,05$).

Quando os grupos foram analisados utilizando o escudo genito-ventral, a PCA mostrou que foram necessários os três primeiros componentes principais para refletir 76% da variação total da forma, o primeiro explicou 32,2% da variação, o segundo 26,3 % e o terceiro 17,5% (Figura 2. C). A análise de função discriminante mostrou que houve diferença significativa na forma do escudo genito-ventral entre populações de ácaros pela distância de Procrustes ($p < 0,01$) e a de Mahalanobis ($p < 0,05$). Pela validação cruzada, a partir do escudo genito-ventral, o índice de classificação dos indivíduos em seus respectivos grupos foi de 65%. Em relação à tendência de variação da forma do escudo genito-ventral, as distorções mais evidentes ocorreram no ápice (7-9), na porção superior das margens (2-9 e 3-8) e nos vértices da base (1 e 4) (Figura 2. D). Em ácaros da Mata Atlântica o ápice do escudo é mais expandido, a parte superior das projeções marginais apresenta uma concavidade acentuada (2-5 e 3-6) e há um leve estreitamento da base, quando comparado ao escudo de ácaros da Caatinga. Quanto ao tamanho do escudo não houve diferença estatisticamente significativa entre populações de ácaros da Mata Atlântica e da Caatinga ($p > 0,05$).

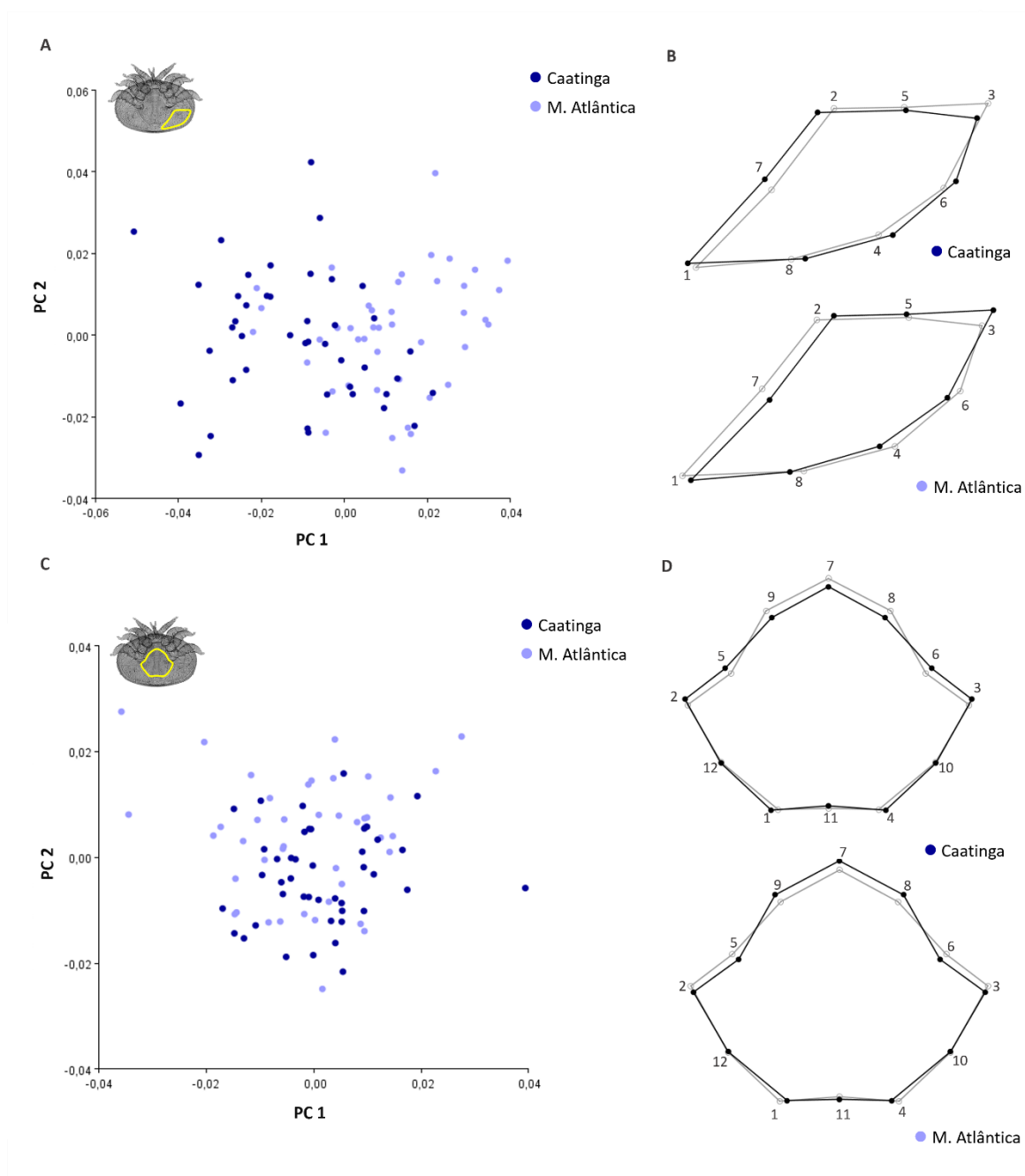


Figura 2. Análise de componentes principais e tendência de deformação, a partir da análise discriminante, dos escudos metapodal e genito-ventral de ácaros *Varroa destructor* em colônias de abelhas na Caatinga (CA) e Mata Atlântica (MA). **A.** Análise de componentes principais da forma do escudo metapodal de ácaros na CA e MA, apresentando o primeiro e segundo componentes principais (PC1, PC2). **C.** Análise de componentes principais da forma do escudo genito-ventral de ácaros na CA e MA, apresentando PC1 e PC2. **B.** Tendência de deformação do escudo metapodal de ácaros na CA e MA. **D.** Tendência de deformação do escudo genito-ventral de ácaros na CA e MA. As Linhas claras correspondem à forma média e as linhas escuras à variação da forma.

Morfometria de *Varroa destructor* em colônias de abelhas higiênicas e não higiênicas

Quando os ácaros que infestam colônias de abelhas higiênicas e os de colônias não higiênicas foram analisados com base no escudo metapodal, a PCA revelou que os três primeiros componentes principais explicam 75% da variação, o primeiro componente 32,6%, o segundo 22,4% e o terceiro 20%. A partir da análise de função discriminante, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, tanto para a distância de Procrustes ($p < 0,001$), quanto para a de Mahalanobis ($p < 0,001$), e o índice de classificação dos indivíduos em seus respectivos grupos, com base no escudo metapodal, foi de 70%. Quanto ao tamanho, houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). O escudo metapodal dos ácaros que infestam colônias higiênicas é menor em relação ao escudo dos parasitos de colônias não higiênicas.

Quando os grupos de ácaros foram analisados utilizando o escudo genito-ventral, a PCA revelou que os três primeiros componentes principais explicaram 75% da variação da forma do escudo, o primeiro 31%, o segundo 25% e o terceiro 19%. Pela função discriminante, não houve diferença significativa entre os grupos para distância de Procrustes ($p > 0,05$), apenas para a de Mahalanobis ($p = 0,001$). Pela validação cruzada, o índice de classificação dos indivíduos em seus respectivos grupos foi de 64%. O tamanho do escudo genito-ventral, não diferiu significativamente entre grupos ($p > 0,05$).

Assimetria flutuante de *Varroa destructor* em diferentes localizações geográficas

Quando os escudos metapodais direito e esquerdo de ácaros da Caatinga e da Mata Atlântica foram analisados, a interação estatisticamente significativa de indivíduo x lado, confirmou a presença de assimetria flutuante tanto para a forma quanto para o tamanho dos escudos nos dois grupos ($p < 0,001$). Apesar disso, apenas a assimetria flutuante do tamanho apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas populações estudadas, não havendo variação significativa para a assimetria da forma ($p > 0,05$). Os ácaros da Caatinga apresentam níveis mais elevados de assimetria flutuante do tamanho dos escudos metapodais (figura 3).

A presença de assimetria flutuante significativa para a forma do escudo genito-ventral foi confirmada em ácaros da Caatinga e da Mata Atlântica ($p < 0,001$). No entanto, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos para a assimetria da forma do escudo ($p > 0,05$).

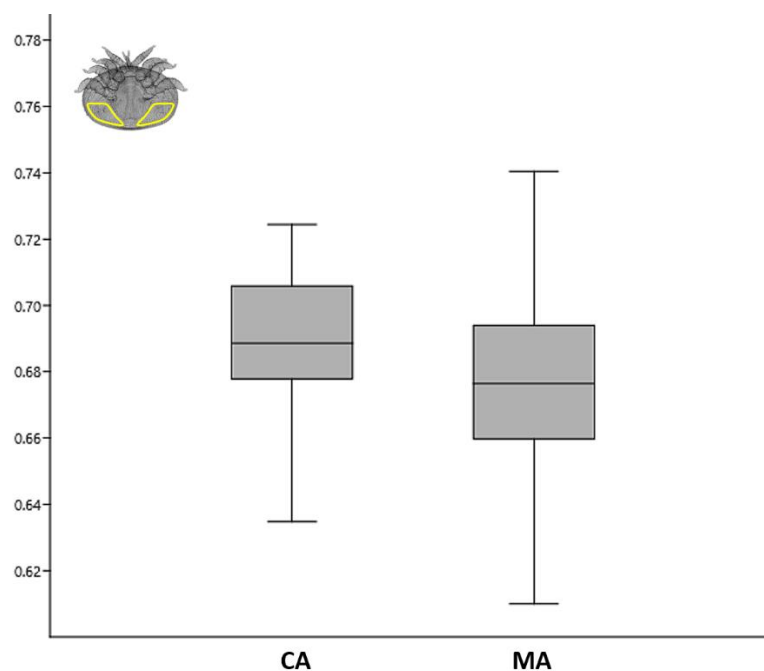


Figura 3. Nível de assimetria flutuante do tamanho do escudo metapodal de ácaros em diferentes ambientes. CA. Ácaros na Caatinga. MA. Ácaros na Mata Atlântica.

Discussão

As pressões ambientais frequentemente modulam a morfologia dentro e entre populações pois podem interferir nos processos de crescimento e morfogênese (Zelditch et al., 2004; Clifton et al., 2020). Analisar a influência de diferentes processos na morfologia de uma espécie é fundamental para compreender suas estratégias adaptativas e a viabilidade de longo prazo de suas populações diante de pressões ambientais (Clifton et al., 2020). O ácaro *V. destructor* se disseminou mundialmente e suas populações estão sujeitas a uma variedade de pressões (Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020). Os ácaros infestam colônias manejadas e selvagens, diferentes subespécies da abelha ocidental *Apis mellifera*, está presente em distintas regiões climáticas (Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020) e em colônias manejadas é afetado pelas práticas de manejo, dentre elas a exposição acaricidas (Maggi et al., 2009; Maggi et al., 2012; Loeza-Concha et al., 2018). Além disso, a dispersão de ácaros pode ocorrer por meio do comércio de colônias e da enxameação, entre colônias, os ácaros se dispersam a partir de abelhas forrageiras que entram em outras colônias para roubar recursos ou que estão à deriva (DeGrandi-Hoffman et al., 2016, 2017; Traynor et al., 2020), o último caso também pode ocorrer por meio de zangões (Mortensen et al., 2018).

Quando levamos em consideração seu impacto sobre populações selvagens e manejadas de abelhas melíferas (Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020), e a variação em seus níveis de infestação e dano entre subespécies hospedeiras, localizações geográfica e estações (Martin et al., 1997;

Vandame et al., 2000; Martin, 2001; Medina et al., 2002), a relevância de identificar estruturas que gerem informações capazes de refletir variações morfológicas e desvios de simetria torna-se evidente, principalmente porque o controle eficaz desse parasito depende da compreensão de sua biologia e suas estratégias adaptativas (Mortensen et al., 2018).

A forma é toda a informação geométrica que resta quando os efeitos do tamanho, posição e rotação são removidos de um objeto (Mitteroecker et al., 2013). O tamanho indica a dimensão ou escala geral do objeto (Klingenberg, 2016), na morfometria geométrica, a medida de tamanho é o *centroid size*, uma métrica composta baseada em todos os pontos de referência estabelecidos no objeto e que possui propriedades estatísticas desejáveis, como a independência das variáveis de forma (Fornel; Cordeiro-Estrela, 2012; Mitteroecker et al., 2013).

Os dados da presente pesquisa indicam que os escudos metapodais e genito-ventral refletem variações morfológicas de *V. destructor* em diferentes contextos ambientais. No entanto, as placas respondem de maneiras distintas em termos de variação. Quando a forma dos escudos de ácaros de duas regiões geográficas foi analisada levando em consideração a função discriminante, com os valores das distâncias de Procrustes e Mahalanobis, e o índice de classificação dos indivíduos em seus respectivos grupos, a separação entre grupos foi mais evidente quando o escudo metapodal foi analisado. Um resultado similar foi encontrado quando ácaros que infestam colônias higiênicas e não higiênicas foram analisados. O trabalho de Sobrinho et al. (*in press*) que utilizou morfometria geométrica, também demonstrou diferenças nas formas dos escudos metapodais e genito-ventral de ácaros de localizações distintas. Além disso, o escudo metapodal também foi o melhor indicador de variação morfológica, corroborando com a presente pesquisa.

A morfologia de estruturas corporais, como os escudos ventrais, tem sido usada em estudos populacionais de *V. destructor*, sobretudo para discriminar entre ácaros com base na localização (Maggi et al., 2009; Aude et al., 2016; Farjamfar et al., 2018), morfotipo hospedeiro (Giménez et al., 2017), estações (Yevstafieva et al., 2020) e exposição a acaricidas (Maggi et al., 2012; Loeza-Concha et al., 2018). No entanto, a maioria desses estudos utiliza morfometria tradicional e não há padronização das estruturas ou medidas utilizadas, mesmo em pesquisas onde os escudos metapodais (MT) e genito-ventral (GN) foram analisados utilizando morfometria tradicional, os resultados são variáveis. Quando Farjamfar et al. (2018), avaliaram o comprimento e largura dos dois escudos e Düttmann et al. (2021) mensuraram o comprimento e largura do GN, não encontraram diferenças significativas. Em contrapartida, o trabalho de Aude et al. (2016), avaliou a largura do GN, e essa medida foi capaz de discriminar entre populações de ácaros. Em Yevstafieva et al. (2020), os autores mediram o comprimento e largura dos dois escudos, mas apenas o comprimento do GN diferiu entre ácaros. Em Abou-Shaara; Tabikha (2016), os autores avaliaram a largura do escudo MT e o comprimento e largura do escudo GN, mas apenas a largura do último escudo mostrou diferença significativa.

É provável que tais discrepâncias possam estar parcialmente associadas ao método da morfometria tradicional, visto que o uso de distâncias lineares, como comprimento, largura e ângulos,

pode apresentar limitações, em especial no estudo da forma de estruturas corporais (Rohlf; Marcos, 1993; Adams et al., 2004). Primeiro, os pontos de referência entre estruturas podem não ser homólogos, o que diminui a robustez das análises (Adams et al., 2004). Em segundo lugar, o conjunto de distâncias lineares é insuficiente para capturar a geometria do objeto, o que leva a perda de informações sobre a forma (Rohlf; Marcos, 1993; Adams et al., 2004). Por outro lado, na morfometria geométrica, as variáveis de forma são obtidas a partir de marcos anatômicos homólogos, que são coordenadas cartesianas que preservam toda a informação geométrica do conjunto de pontos (Fornel; Cordeiro-Estrela, 2012). A partir do conjunto de dados é possível obter variáveis de forma e uma de tamanho, que podem ser analisadas separadamente (Zelditch et al., 2004; Fornel; Cordeiro-Estrela, 2012). Esse método permite a visualização gráfica das variações de forma inferidas estatisticamente, de modo que se possa visualizar a localização, direção e magnitude da variação, apresentando maior poder estatístico e interpretativo (Fornel; Cordeiro-Estrela, 2012). Dessa forma, parece ser mais adequado para estudos sobre variabilidade morfológica e para identificar estruturas que refletem com maior precisão tais alterações. Além disso, é um método econômico, rápido e preciso (Miguel et al., 2011).

Quando os escudos metapodais e genito-ventral dos ácaros que infestam colônias higiênicas e não higiênicas foram avaliados, a placa metapodal foi a única que apresentou diferença significativa da forma pela distância de Procrustes. A distância entre grupos em relação à forma, é inferida a partir da variação dentro de cada um deles, que pode ser avaliada por métricas distintas, a depender do tipo de espaço de forma (Klingenberg; Monteiro, 2005), ou seja, o espaço no qual as formas de diferentes objetos são relacionadas (Mitteroecker et al., 2013). No espaço tangente, a variação dentro do grupo é não isotrópica, ou seja, as diferenças na magnitude e na direcionalidade da variação de cada ponto de referência, e a associação entre pontos são representadas (Klingenberg; Monteiro, 2005). Nesse espaço a análise utiliza a métrica de Procrustes que está associada à magnitude da variação (Klingenberg; Monteiro, 2005). Outra alternativa é utilizar uma análise simplificada a partir da transformação do espaço tangente (Klingenberg; Monteiro, 2005). A transformação garante que cada ponto assuma uma variação isotrópica, ou seja, os marcos passam a ter uma variação idêntica e independente uns dos outros, mudando sua configuração original (Klingenberg; Monteiro, 2005; Mitteroecker et al., 2013). A partir disso, a análise usa outra métrica, a distância de Mahalanobis, para discriminar entre grupos (Klingenberg; Monteiro, 2005). De modo geral, no espaço tangente a análise é mais refinada, pois não mostra apenas se há diferença entre os grupos, como no espaço transformado, também avalia a variação da forma real, informando a presença, quantidade e direção da variação, considerando variações mínimas na forma dos objetos (Klingenberg; Monteiro, 2005; Mitteroecker et al., 2013). Dessa maneira, as placas metapodais de *V. destructor* podem ser mais adequadas como indicadores de variação morfológica, pois foram as únicas que apresentaram significância para as duas métricas de variação de forma, nos dois contextos em que foram avaliadas, ou seja, entre localizações e entre colônias na mesma área.

Os escudos metapodais e genito-ventral responderam de maneiras distintas em termos de variação, tanto entre localidades quanto entre tipos de colônia de abelhas. As características fenotípicas podem apresentar níveis distintos de plasticidade frente às mesmas condições ambientais (Forsman, 2015; Clifton et al., 2020). Além disso, a forma do corpo dos ácaros fêmeas muda durante seu desenvolvimento, de oblongo para um corpo elíptico, com largura maior que o comprimento (Rosenkranz et al., 2010). Assim, é possível que as placas metapodais, que parecem estar mais relacionadas à largura do corpo, estejam sujeitas a maior pressão durante o processo de ontogenia. O que poderia explicar, pelo menos em parte, os maiores índices de variação morfológica que esses escudos apresentam quando comparados ao escudo genito-ventral. Além disso os escudos ventrais estão relacionados à proteção dos órgãos internos, mas recobrem órgãos diferentes, o escudo genito-ventral, por exemplo, recobre a região da genitália das fêmeas de *V. destructor* e a abertura genital está localizada no ápice desse escudo (Piou et al., 2021).

Ao contrário da adaptação genética, a plasticidade fenotípica é mais rápida em produzir fenótipos em resposta às mudanças ambientais, visto que pode ocorrer dentro de uma única geração, assim, essa capacidade pode ser uma solução temporária em populações de ácaros frente às pressões ambientais enfrentadas (Clifton et al., 2020). A plasticidade passiva, em geral, não é considerada antecipatória, mas é consequência da influência direta do ambiente em processos químicos, fisiológicos e de desenvolvimento (Forsman, 2015). Dessa forma, as condições de diferentes localidades ou tipos de colônia podem representar pressões distintas durante a ontogenia do ácaro, o que explicaria as variações morfológicas encontradas no presente estudo.

Em relação aos ácaros de diferentes localidades, as variações morfológicas podem sugerir que as duas populações estão sujeitas a pressões diferentes durante a morfogênese. Os ambientes estudados, Caatinga e Mata Atlântica, apresentam diferentes climas e condições ambientais, enquanto a Caatinga apresenta baixa umidade e precipitações irregulares, na Mata Atlântica há alta umidade e a precipitação é mais abundante (Velloso et al., 2002; Ab'Sáber, 2003; Moura et al., 2007; Pereira, 2009; Aragão et al., 2013; Santos et al., 2014). Como os ácaros vivem dentro da colônia, é provável que os fatores ambientais externos, como as condições geográficas e climáticas, atuem indiretamente sobre o parasito por meio do hospedeiro (Rosenkranz et al., 2010; Di Pasquale et al., 2013; Chemurot et al., 2016; Leza et al., 2016). Nesse contexto, a ocorrência de chuvas e seu efeito sobre a disponibilidade de recursos florais para as abelhas, é um importante fator que modula a quantidade de cria do hospedeiro, as condições da colmeia e a aptidão individual das abelhas (Pinto et al., 2011; Correia-oliveira et al., 2018). Adicionalmente, a quantidade de recursos energéticos da abelha que serão utilizados por seus parasitos depende do estado nutricional, tamanho corporal e taxa metabólica do hospedeiro (Poulin; George-Nascimento, 2007). Já foi demonstrado que os padrões morfoclimáticos distintos das regiões em que o presente estudo foi realizado influenciam a forma e o tamanho das asas das abelhas *A. mellifera* (Sousa et al., 2016). Como pode existir correlação morfológica entre ecótipos de abelhas e seus ácaros *V.*

destructor associados (Giménez et al., 2017), é possível que morfotipos distintos de abelhas levem a diversificação do morfotipo de seus parasitos (Maggi et al., 2009).

Quanto aos ácaros que infestam colônias com diferentes níveis de comportamento higiênico, as variações morfológicas encontradas nos dois grupos de parasitos podem indicar que as pressões enfrentadas diferem entre os tipos de colônia hospedeira. Como o nível de comportamento higiênico pode variar entre colônias, de acordo com suas características genéticas e ecológicas (Wilson-Rich et al., 2009), é possível que os ácaros que as infestam estejam sujeitos a condições distintas dentro do ambiente hospedeiro.

O estudo morfológico de *V. destructor* pode ser uma ferramenta para estudos populacionais e oferecer importantes pistas sobre as causas da variação morfológica (Zelditch et al., 2004). Adicionalmente, a análise da assimetria flutuante, um tipo de desvio de simetria, pode ser aplicada em estudos que buscam mensurar o estresse enfrentado pelo ácaro durante sua ontogenia quando exposto a diferentes pressões (Klingenberg; Nijhout, 1999; Klingenberg, 2003; Klingenberg, 2015). Ao analisar o par de escudos metapodais e o escudo genito-ventral foi possível confirmar a presença de assimetria flutuante da forma dos ácaros, mas apenas a análise dos escudos metapodais permitiu avaliar e encontrar diferenças significativas para a assimetria flutuante do tamanho.

A análise de assimetria leva em consideração o tipo de simetria da estrutura, uma estrutura com simetria correspondente, como os escudos metapodais, aparece como réplicas separadas, uma em cada lado do corpo, enquanto a simetria de objeto ocorre em estruturas únicas, como o escudo genito-ventral (Klingenberg, 2015). No último caso, os lados direito e esquerdo não possuem medidas de tamanho separadas, assim, as diferenças de tamanho entre os lados são um aspecto da própria forma e as análises de assimetria desse tipo de estrutura são limitadas ao estudo desse último aspecto (Klingenberg, 2015). Diante disso, a análise do par de escudos metapodais pode gerar mais informações sobre os desvios de simetria de *V. destructor*, o que se torna ainda mais importante dada a escassez de estudos que analisam esse aspecto.

Os escudos metapodais dos ácaros das diferentes regiões geográficas analisados no presente estudo, apresentaram níveis distintos de assimetria flutuante de tamanho. De modo geral, as duas cópias de uma estrutura de simetria correspondente se desenvolvem separadamente, portanto, é possível que flutuações aleatórias afetem cada cópia de forma separada, a menos que mecanismos compensatórios estejam presentes (Klingenberg, 2003). Isso pode levar a diferenças fenotípicas, entre as cópias, que se apresentam como assimetrias mensuráveis (Klingenberg, 2015), como no presente estudo. O modo como as diferenças entre os lados do corpo se manifestarão como assimetrias, depende da tendência em produzir variações morfológicas em respostas ao ruído no desenvolvimento, pois tanto a quantidade de perturbação, quanto a instabilidade do desenvolvimento do organismo em questão podem influenciar a assimetria flutuante (Klingenberg, 2003). Assim, os sistemas de desenvolvimento podem apresentar diferentes sensibilidades ao ruído e a assimetria flutuante observável de uma estrutura morfológica é resultado do efeito das perturbações em um sistema particular (Klingenberg, 2003).

É notável que diante da diversidade de condições ambientais as quais os ácaros *V. destructor* são expostos, a análise morfológica pode ser utilizada para mensurar suas variações e transformações morfológicas e discutir sobre os fatores causais. Adicionalmente, a análise da assimetria flutuante parece promissora e pode ser aplicada em estudos sobre a influência do ambiente no processo de desenvolvimento do ácaro. Bem como a relação entre assimetria flutuante e fatores relacionados à aptidão do parasito, como a fertilidade, fecundidade, taxas de infestação, associação ácaro-vírus, entre outros (Wilfert et al., 2016; Di Prisco et al., 2016; Mondet et al., 2020). Portanto, a análise morfológica e de assimetria flutuante a partir da morfometria geométrica, se apresentam como ferramentas promissoras que podem ser aplicadas em pesquisas experimentais e de campo, contribuindo assim, para o avanço do conhecimento científico e tecnológico, e consequentemente para o estabelecimento de estratégias de monitoramento das populações do parasito e mitigação de efeitos sobre colônias selvagens e manejadas de abelhas melíferas.

Nesse contexto, a padronização de estruturas corporais e de técnicas mais adequadas e precisas permite economizar e otimizar tempo e recursos em futuras pesquisas. As análises morfométricas dos escudos genito-ventral e metapodal mostraram que são estruturas adequadas, especialmente o metapodal, para estudos que visam avaliar variações morfológicas e a instabilidade no desenvolvimento do ácaro. Portanto, os escudos metapodais de *V. destructor* podem ser indicadores mais adequados para estudos de variação morfológica e de assimetria flutuante.

Referências bibliográficas

- Abou-Shaara HF, Tabikha RM (2016) Morphological characterization and a morphometry map for *Varroa* mites from northwest of egypt. *Cercetari Agronomice in Moldova* 49(4):75–84. <https://doi.org/10.1515/cerce-2016-0038>
- Ab'sáber AN (2003) Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas. Ateliê editorial
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian journal of zoology* 71(1):5-16. <https://doi.org/10.1080/11250000409356545>
- Aragão RD, Santana GRD, Da Costa CE, Cruz MA, Figueiredo EED, Srinivasan VS (2013) Chuvas intensas para o estado de Sergipe com base em dados desagregados de chuva diária. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 17:243-252. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013000300001>
- Aude KE, Armand P, Francois A, Charlemagne G, Georg G, Manuelle T, Lamine BM (2016) Morphometric characterization of parasite *Varroa* sp. of bee *Apis mellifera* l. in Benin. *European Scientific Journal* 12(33): 221. <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n33p221>
- Bookstein FL (1982) Foundations of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13(1):451–470. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.13.110182.002315>
- Bookstein FL (1991) Morphometric tools for landmark data. *Geometry and Biology*. Cambridge University Press, New York

- Borsuk G, Olszewski K, Strachecka A, Paleolog J, Kasperek K (2012) Genetic and morphometric variation of the *Varroa destructor* developing in standard and small comb cells. *Med. Weter* 68(10): 599-602
- Chemurot M, Akol AM, Masembe C, De Smet L, Descamps T, De Graaf DC (2016). Factors influencing the prevalence and infestation levels of *Varroa destructor* in honeybee colonies in two highland agro-ecological zones of Uganda. *Experimental and Applied Acarology* 68:497-508.
- Clifton IT, Chamberlain JD, Gifford ME (2020) Role of phenotypic plasticity in morphological differentiation between watersnake populations. *Integrative Zoology* 15(4):329–337. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12431>
- Correia-Oliveira ME, Mercês CC, Mendes RB, Neves VS, Silva FL, Carvalho CA (2018) Can the Environment Influence Varroosis Infestation in Africanized Honey Bees in a Neotropical Region? *Florida Entomologist* 101(3):464-469. <https://doi.org/10.1653/024.101.0304>
- DeGrandi-Hoffman G, Ahumada F, Zazueta V, Chambers M, Hidalgo G, DeJong EW (2016) Population growth of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee colonies is affected by the number of foragers with mites. *Experimental and Applied Acarology* 69(1):21–34. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0022-9>
- DeGrandi-Hoffman G, Ahumada F, Graham H (2017) Are dispersal mechanisms changing the host–parasite relationship and increasing the virulence of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in managed honey bee (hymenoptera: Apidae) colonies?. *Environmental Entomology* 46(4): 737–746. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx077>
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet J, Alaux C (2013) Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PloS one* 8(8):1-13
- Di Prisco G, Annoscia D, Margiotta M, Ferrara R, Varricchio P, Zanni V, Pennacchio F (2016) A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(12): 3203-3208. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523515113>
- Donzé G, Guerin PM (1994) Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34:305-319. <https://doi.org/10.1007/BF00197001>
- Düttmann C, Flores B, Sheleby-Elías J, Castillo G, Osejo H, Bermudez S, Demedio J (2021) Morphotype and haplotype identification of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), and its importance for apiculture in Nicaragua. *Experimental and Applied Acarology* 83(4): 527–544. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00603-9>
- Fang Y, Wubie AJ, Feng M, Ma C, Baer B, Li J (2022) Larval exposure to parasitic *Varroa destructor* mites triggers specific immune responses in different honey bee castes and species. *Molecular and Cellular Proteomics* 21(8):100257. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100257>
- Farjamfar M, Saboori A, Nozari J (2018) Morphometric analysis in different geographical populations of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) associated with *Apis mellifera* colonies in Iran. *Systematic and Applied Acarology* 23(10): 1915-1930. <https://doi.org/10.11158/saa.23.10.4>
- Fornel R, Cordeiro-Estrela P (2012) Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: Marinho JR, Hepp LU, Fornel R (org) *Temas em Biologia: Edição comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim*, 1ª ed. Erechim, EDIFAPES, pp 101-120.
- Forsman A (2015) Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity*, 115: 276–284. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.92>

- Giménez PM, Mendoza Y, Invenizzi C, Fuselli S, Alonso SR., Fernández IP, Maggi M (2017) Morphometric correlation between *Apis mellifera* morphotypes (Hymenoptera) and *Varroa destructor* (Acari) from Uruguay. *Journal of Apicultural Research* 56(2): 122–129. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1287998>
- Klingenberg CP, Nijhout HF (1999) Genetics of fluctuating asymmetry: a developmental model of developmental instability. *Evolution* 53(2):358–375. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb03772.x>
- Klingenberg CP, McIntyre GS (1998) Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52(5):1363–1375. <http://dx.doi.org/10.2307/2411306>
- Klingenberg CP (2003) A developmental perspective on developmental instability: theory, models and mechanisms. In: Polak M (ed) *Developmental instability: causes and consequences*. Oxford University Press, New York, pp 427–442
- Klingenberg CP, Monteiro LR (2005) Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Systematic Biology* 54(4):678–688. <https://doi.org/10.1080/10635150590947258>
- Klingenberg CP (2011) MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11(2):353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Klingenberg CP (2015) Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry* 7(2):843–934. <https://doi.org/10.3390/sym7020843>
- Klingenberg CP (2016) Size, shape, and form: Concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution* 226(3): 113–137. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0539-2>
- Le Conte Y, Navajas M (2008) Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 27(2): 499–510
- Leza MM, Miranda-Chueca MA, Purse BV (2016) Patterns in *Varroa destructor* depend on bee host abundance, availability of natural resources, and climate in mediterranean apiaries. *Ecological Entomology* 41(5):542–553
- Locke B (2016) Natural *Varroa* mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. *Apidologie* 47: 467–482. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0412-8>
- Loeza-Concha H, Domínguez-Rebolledo A, Escalera-Valente F, Ávila-Ramos F, Carmona-Gasca C (2018) Morphometric identification of *Varroa destructor* and its plasticity by the exposure to thymol. *Abanico Veterinario* 8(2): 98–107. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.82.9>
- Maggi MD, Sardella NH, Ruffinengo SR, Eguaras MJ (2009) Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitology Research* 105(6): 1629–1636. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1605-8>
- Maggi MD, Peralta L, Ruffinengo S, Fuselli S, Eguaras MJ (2012) Body size variability of *Varroa destructor* and its role in acaricide tolerance. *Parasitology Research*, 110(6):2333–2340. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2768-7>
- Martin SJ (1994) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and applied acarology* 18(2):87–100
- Martin SJ, Holland K, Murray M (1997) Non-reproduction in the honeybee mite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and applied acarology* 21:539–549.

- Martin SJ (2001) The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: A modelling approach: Collapse of *Varroa* -infested honeybee colonies. *Journal of Applied Ecology* 38(5):1082–1093. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x>
- Medina LM, Martin SJ, Espinosa-Montañón L, Ratnieks FL (2002) Reproduction of *Varroa destructor* in worker brood of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental and applied acarology* 27:79–88. <https://doi.org/10.1023/A:1021579113907>
- Miguel I, Baylac M, Iriondo M, Manzano C, Garnery L, Estonba A (2011) Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie* 42(2):150–161. <https://doi.org/10.1051/apido/2010048>
- Mitteroecker P, Gunz P, Windhager S, Schaefer K (2013) A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 24(1):59–66. <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-6369>
- Mondet F, Beaurepaire A, McAfee A, Locke B, Alaux C, Blanchard S, Danka B, Le Conte Y (2020) Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: A systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *International Journal for Parasitology* 50(6):433–447. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>
- Mortensen AN, Jack CJ, Ellis JD (2018) The discovery of *Varroa destructor* on drone honey bees, *Apis mellifera*, at drone congregation areas. *Parasitology Research* 117(10):3337–3339. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6035-z>
- Moura MSB, Galvêncio JD, Brito LDL, Souza LD, Sá IDS, Silva TGF (2007) Clima e água de chuva no Semi-Árido. In: Brito LDL, Moura MSB, Gama GFB (ed) *Potencialidades da água de chuva no Semi-árido brasileiro*. Embrapa Semi-Árido, Petrolina, pp 37–59
- Palacio MA, Rodriguez E, Goncalves L, Bedascarrasbure E, Spivak M (2010) Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. *Apidologie* 41(6):602–612. <https://doi.org/10.1051/apido/2010022>
- Palmer AR (1994) Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow TA (ed) *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 335–364
- Palmer AR, Strobeck C (2003) Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: Polak M (ed) *Developmental instability (DI): causes and consequences*. University Press, Oxford, pp 279–319
- Pereira AB (2009) Mata Atlântica: uma abordagem geográfica. *Nucleus* 6(1):1–27. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.152>
- Pinto FA, Puker A, Message D, Barreto LMRC (2011) *Varroa destructor* in Juititaba, Vale do Ribeira, southeastern Brazil: seasonal effects on the infestation rate of ectoparasitic mites in honeybees. *Sociobiology* 57(3):511–518.
- Piou V, Vilarem C, Rein C, Sprau L, Vétillard A (2021) Standard Methods for Dissection of *Varroa destructor* Females. *Insects* 13(1):37. <https://doi.org/10.3390/insects13010037>
- Poulin R, George-Nascimento M (2007) The scaling of total parasite biomass with host body mass. *International Journal for Parasitology* 37(3–4):359–364. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.009>
- Rahmani H, Kamali K, Saboori A, Nowzari J (2006) Report and survey of morphometric characteristics of *Varroa destructor* (Acari:Varroidae) collected from honey bees in Tehran Province, Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 8(4): 351–355.
- Rath W (1999) Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30(2-3):97–110. <https://doi.org/10.1051/apido:19990202>

- Rebolledo AED, Chi VHQ, Maas DC, Flores CL, Cauich DD, Loeza-Concha H (2022) Identificación morfológica de la especie predominante de *Varroa* (Parasitiformes: Varroidae) en colonias de abejas en Hopelchén, Campeche. *Abanico veterinario* 12(1):12. <https://doi.org/10.21929/abavet2022.21>
- Rohlf FJ, Marcus LF (1993) A revolution morphometrics. *Trends in ecology and evolution* 8(4):129-132. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J)
- Rohlf FJ (2015) The tps series of software. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 26(1): 9-12. <https://doi.org/10.4404/hystrix-26.1-11264>
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103:96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Santos GDB, Sousa IFD, Brito CO, Santos VDS, Barbosa RDJ, Soares C (2014) Estudo bioclimático das regiões litorânea, agreste e semiárida do estado de Sergipe para a avicultura de corte e postura. *Ciência Rural* 44(1):123-128. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000148>
- Sousa ARS, Araújo ED, Gramacho KP, Nunes LA (2016) Bee's morphometrics and behavior in response to seasonal effects from ecoregions. *Genetics and molecular research* 15(2):1-14. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027597>
- Traynor KS, Mondet F, De Miranda JR, Techer M, Kowallik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A (2020) *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology* 36(7):592–606.
- Valladares F, Gianoli E, Gómez JM (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176(4):749–763. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02275.x>
- Vandame R, Colin ME, Morand S, Otero-Colina G (2000) Levels of compatibility in a new host-parasite association: *Apis mellifera*/*Varroa jacobsoni*. *Canadian journal of zoology* 78(11):2037-2044. <https://doi.org/10.1139/z00-10>
- Velloso AL, Sampaio EVSB, Pareyn FGC (2002) Ecorregiões propostas para o bioma caatinga. *Associação Plantas do Nordeste. The Nature Conservancy do Brasil, Recife.*
- Wagoner KM, Spivak M, Rueppell O (2018) Brood Affects Hygienic Behavior in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 111(6):2520–2530. <https://doi.org/10.1093/jee/toy266>
- Wilfert L, Long G, Leggett HC, Schmid-Hempel P, Butlin R, Martin SJM, Boots M (2016) Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science* 351:594-597. <https://doi.org/10.1126/science.aac9976>
- Yevstafieva VO, Zaloznaya LM, Nazarenko OS, Melnychuk VV, Sobolta AG (2020) Morphological variation of *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidae) in different seasons. *Biosystems Diversity* 28(1):18–23. <https://doi.org/10.15421/012003>
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL (2004) *Geometric morphometrics for biologists: A primer.* Elsevier Academic Press.

CAPÍTULO 2

**O COMPORTAMENTO HIGIÊNICO DAS ABELHAS HOSPEDEIRAS PODE SER
ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E DE SIMETRIA DO ÁCARO
PARASITO *Varroa destructor*?**

Resumo

O comportamento higiênico das abelhas *Apis mellifera* é uma estratégia coletiva de resistência contra doenças da cria que consiste na detecção e remoção de cria morta e doente por abelhas adultas. A velocidade com que as abelhas realizam essa atividade depende de uma interação multifatorial que envolve desde a base genética até o contexto ecológico da colônia. Nesse cenário, os parasitos de cria, como o ácaro *Varroa destructor*, podem estar sujeitos a ambientes hospedeiros variáveis durante sua ontogenia. Por outro lado, as abelhas em desenvolvimento também sofrem impacto da infestação pelo ácaro. Variações no tamanho e forma de estruturas corporais podem refletir diferenças nos processos de crescimento e morfogênese. A assimetria flutuante, um tipo de desvio de simetria corporal, pode indicar o nível de estresse enfrentando durante o desenvolvimento de um indivíduo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre a taxa de comportamento higiênico de colônias de abelhas africanizadas (*A. mellifera*) e a morfometria de *V. destructor*, bem como a relação entre assimetria flutuante do hospedeiro e do parasito nos diferentes tipos de colônia. Amostras de abelhas adultas e ácaros em fase de dispersão foram coletadas em colônias de abelhas africanizadas e as taxas de comportamento higiênico foram avaliadas a partir de testes de perfuração de células de cria com alfinete (pin-killed). O material foi processado e submetido a análises de morfometria geométrica. Para mensurar a assimetria flutuante foram utilizados os escudos ventrais (par de escudo metapodais e escudo genito-ventral) de *V. destructor* e o par de asas dianteiras das abelhas. Para mensurar variações na forma e tamanho dos escudos dos ácaros, foram analisados o escudo metapodal esquerdo e a placa genito-ventral. Foram encontradas diferenças na forma dos escudos metapodal e genito-ventral (distância de Mahalanobis: $p \leq 0,001$). O tamanho do escudo metapodal diferiu entre grupos ($p < 0,001$), sendo menor em ácaros de colônias higiênicas. As variações na forma e tamanho podem indicar que os dois grupos de parasitos enfrentaram pressões distintas nas diferentes colônias hospedeiras. Em relação a assimetria flutuante, foram encontradas diferenças para o tamanho dos escudos metapodais dos ácaros ($p < 0,01$), bem como para o tamanho das asas das abelhas ($p < 0,01$), com uma relação inversa entre assimetria flutuante do parasito e do hospedeiro. Ao contrário do que era esperado, em colônias higiênicas as abelhas apresentaram índices mais altos de assimetria flutuante, ou estresse no desenvolvimento, enquanto os ácaros que as infestam mostraram níveis mais baixos de assimetria. Levando em consideração que a relação hospedeiro-parasito é modulada pela interação multifatorial das características dos antagonistas, é possível que outros fatores estejam mais associados as variações morfológicas e de assimetria flutuante encontradas do que o comportamento higiênico, pelo menos no contexto da presente pesquisa.

Palavras-chave: Assimetria flutuante; Imunidade social; Morfometria geométrica; Parasitismo; Variação morfológica.

Abstract

The hygienic behavior of *Apis mellifera* bees is a collective resistance strategy against brood diseases that consists of the detection and removal of dead and sick brood by adult bees. The speed with which bees carry out this activity depends on a multifactorial interaction that ranges from the genetic basis to the ecological context of the colony. In this scenario, brood parasites, such as the *Varroa destructor* mite, may be subject to variable host environments during their ontogeny. On the other hand, developing bees are also impacted by mite infestation. Variations in the size and shape of body structures may reflect differences in growth and morphogenesis processes. Fluctuating asymmetry, a type of deviation from body symmetry, can indicate the level of stress facing during an individual's development. The objective of the current study was to assess the correlation between the hygienic behavior rate of Africanized bee colonies (*A. mellifera*) and the morphometry of *V. destructor*. Additionally, the relationship between the fluctuating asymmetry of the host and parasite in different colony types was investigated. Samples of adult bees and mites in the dispersing phase were collected from Africanized bee colonies, and the rates of hygienic behavior were evaluated using pin-killed brood cell perforation tests. The collected material underwent processing and was subjected to geometric morphometric analysis. To quantify fluctuating asymmetry, the ventral shields (pair of metapodal shield and genito-ventral shield) of *V. destructor* and the pair of front wings of bees were utilized. To measure variations in the shape and size of the mite shields, the left metapodal shield and the genito-ventral plate were analyzed. Significant differences were observed in the shape of the metapodal and genito-ventral shields (Mahalanobis distance: $p \leq 0.001$). The size of the metapodal shield exhibited variations between groups ($p < 0.001$), being smaller in mites from hygienic colonies. These variations in shape and size suggest that the two groups of parasites encountered different pressures in distinct host colonies. Regarding fluctuating asymmetry, differences were noted in the size of the mites' metapodal shields ($p < 0.01$) and the size of the bees' wings ($p < 0.01$), indicating an inverse relationship between the fluctuating asymmetry of the parasite and the host. Contrary to what was expected, in hygienic colonies bees showed higher rates of fluctuating asymmetry, or developmental stress, while the mites that infest them showed lower levels of asymmetry. Taking into account that the host-parasite relationship is modulated by the multifactorial interaction of the characteristics of the antagonists, it is possible that other factors are more associated with the morphological variations and fluctuating asymmetry found than with hygienic behavior, at least in the context of the present research.

Keywords: Fluctuating asymmetry; Geometric morphometry; Morphological variation; Parasitism; Social immunity.

Introdução

A imunidade social é um conjunto de mecanismos relacionados à evitação, redução, ou eliminação de parasitos e patógenos, realizados coletivamente por insetos sociais, como as abelhas da espécie *Apis mellifera* L., conferindo resistência contra doenças (Wagoner et al., 2018). Uma dessas estratégias é o comportamento higiênico, realizado por abelhas adultas, que consiste na detecção e remoção de crias mortas e doentes da colônia, para evitar a propagação de doenças da cria (Wilson-Rich et al., 2009; Leclercq et al., 2017). A expressão do comportamento higiênico de uma colônia depende da interação entre os níveis de organização biológicas, e envolvem as bases genética, o contexto ecológico, a neuromodulação, a sinalização larval, a detecção de cria doente por abelha individuais, a montagem de resposta imune individual e, finalmente, a imunidade social (Wilson-Rich et al., 2009; Mondet et al., 2015; Wagoner et al., 2018). A diferença genética entre colônias não está na capacidade de remoção de cria doente, mas na velocidade com que as abelhas detectam e iniciam a remoção (Wilson-Rich et al., 2009), portanto, as combinações entre esses fatores resultam em colônias com taxas mais rápidas ou mais lentas de comportamento higiênico, conferindo diferentes níveis de resistência contra doenças.

A relação de *Varroa destructor* Anderson e Treuman, 2000 com a abelha *A. mellifera* levou à sua disseminação mundial por meio do comercio internacional de colônias, com grande impacto sobre populações selvagens e manejadas dessa abelha (Rosenkranz et al., 2010; Traynor et al., 2020). O ácaro causa a doença conhecida como Varroose, afetando abelhas imaturas e adultas, a partir de impactos físicos, comportamentais e imunológicos (Kralj; Fuch, 2006; Koleoglu et al., 2017; 2018; Ramsey et al., 2019). Tais danos podem ser ampliados por sinergismo com outros fatores de estresse, tais como pesticidas, condições ambientais adversas, mudanças climáticas e outros parasitos ou patógenos (Blanken et al., 2015; Le Conte et al., 2010). Além disso, o ácaro pode transmitir vírus às abelhas, como o vírus da asa deformada (DWV) e o vírus da paralisia aguda das abelhas (ABPV), e interagir com outros, como o vírus da cria ensacada (SBV), comprometendo a saúde das abelhas (Miranda et al., 2010; Di Prisco et al., 2016; Thaduri et al., 2018).

A reprodução e desenvolvimento do ácaro em colônias de *A. mellifera* ocorrem dentro de células de zangões e operárias, um ácaro fêmea invade uma célula de quinto instar pouco antes de ser selada (Rosenkranz et al., 2010) e põe ovos, a prole se desenvolve junto com a abelha imatura (Steiner et al., 1994; Martin, 1994; 1995). Durante esse período, a fundadora e a prole se alimentam principalmente do corpo gorduroso da abelha (Ramsey et al., 2019), pelo uso prolongado de um ou mais orifícios alimentares abertos pela fundadora no tegumento da pupa (Donzé; Guerin, 1994; Egekwu et al., 2018). Essa fase termina quando a abelha emerge com o ácaro fundador e sua prole feminina, que atingiu a maturidade, aderidas ao seu corpo (Steiner et al., 1994; Martin, 1994; 1995). Como o desenvolvimento do parasito depende da sua permanência dentro da célula de cria por tempo suficiente e de uma nutrição adequada durante esse período (Steiner et al., 1994; Donzé; Guerin, 1994). É possível que fatores que

interfiram na utilização do orifício alimentar ou na absorção do alimento, reduzam sua aptidão (Di Prisco et al., 2016), e a nutrição inadequada é apontada como principal condição de mortalidade da prole do ácaro (Donzé; Guerin, 1994; Martin, 1994).

Diferenças nos processos de crescimento e morfogênese podem resultar em variações no tamanho e na forma entre indivíduos ou as suas partes, assim, a análise do formato permite compreender as causas de tais variações (Zelditch, 2004). Além disso, a instabilidade do desenvolvimento de um organismo pode ser mensurada a partir da avaliação de desvios da simetria corporal, pois a assimetria de estruturas bilateralmente simétricas é, em geral, atribuída a ruídos aleatórios que se acumulam durante esse processo (Klingenberg; Nijhout, 1999). A assimetria flutuante denota as pequenas diferenças entre os lados direito e esquerdo e pode ser usada para mensurar a instabilidade do desenvolvimento (Palmer, 1994; Klingenberg; Nijhout, 1999; Klingenberg, 2015). Tanto o formato quanto a assimetria flutuante podem ser avaliadas a partir de técnicas de morfometria geométrica (Fornel; Cordeiro-Estrela, 2012; Klingenberg, 2015).

O estudo da plasticidade fenotípica é importante para compreender a capacidade de um organismo de se ajustar a diferentes estímulos ambientais (Pigliucci, 2005). Como as estratégias de imunidade social podem conferir resistência contra doenças (Leclercq et al., 2017), espera-se uma maior estabilidade no desenvolvimento de abelhas com altos níveis de higiene, e um padrão inverso em seus parasitos. Com tal informação será possível compreender como a relação hospedeiro-parasito entre *A. mellifera* e *V. destructor* molda a morfologia e assimetria desses antagonistas. Ademais, apesar do crescente número de estudos sobre comportamento higiênico e sua ampla utilização em programas de melhoramento, sua eficiência contra o ácaro parasito *V. destructor* ainda não está clara (Leclercq et al., 2017). Os resultados de pesquisas que utilizam métodos de investigação baseados na correlação entre nível de infestação e taxa de comportamento higiênico, avaliado a partir de ensaios de cria morta artificialmente, são contrastantes (Leclercq et al., 2017; Mondet et al., 2020). Assim, mais investigações são necessárias para entender como esse comportamento afetar o ácaro.

Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre o nível de comportamento higiênico das colônias de abelhas africanizadas e a morfologia de *V. destructor*, bem como a relação entre assimetria flutuante do hospedeiro e do parasito nos diferentes tipos de colônia. As hipóteses formuladas foram: 1) A morfologia do ácaro está relacionada ao nível de comportamento higiênico da colônia; 2) A assimetria flutuante do ácaro está ligada ao grau de comportamento higiênico da colônia; 3) A assimetria flutuante das abelhas está ligada ao nível de comportamento higiênico da colônia, e 4) Há uma relação inversa entre a assimetria flutuante do parasito e do hospedeiro.

Material e métodos

Amostragem

Amostras de abelhas adultas e ácaros em fase de dispersão, período em que se fixam ao corpo de abelhas adultas e circulam pela colônia, foram obtidas de vinte e oito colônias em um apiário localizado no município de Itabi no estado de Sergipe (10°05'13.71"S 37°11'09.26" W). Para isso, quadros de cria foram retirados das colônias, aproximadamente cem abelhas foram coletadas de cada colônia, armazenadas em recipiente com álcool a 70% e encaminhadas ao laboratório, para separação e contabilização dos ácaros e abelhas (Stort et al., 1981; Schafaschek et al., 2019; OIE, 2021).

A área de estudo está inserida no domínio das Caatingas, onde o clima é semiárido e apresenta uma estação seca e outra chuvosa, as temperaturas são elevadas e relativamente constantes, a umidade relativa do ar é baixa e o regime de chuvas é marcado pela escassez e irregularidade (Velloso et al., 2002; Ab'Sáber, 2003; Moura et al., 2007). A amostragem foi realizada no período de estiagem.

Avaliação do comportamento higiênico

Para determinar o grau de comportamento higiênico das colônias, utilizamos a metodologia de perfuração de células de cria com alfinete (pin-killed), que consiste em sacrificar a cria perfurando-a com alfinete entomológico, e a partir disso, avaliar as taxas de detecção e remoção da cria morta (Gramacho et al., 1999; Büchler et al., 2013; Khan; Ghramh, 2021). De cada colônia, um favo contendo cria operculada de operária foi selecionado para condução do experimento. Em cada favo, foram delimitadas duas áreas de cem células cada, com auxílio de moldura romboide (10x10 células de largura) e tinta branca atóxica, uma correspondeu ao tratamento de perfuração e outra ao controle. Em seguida, o número de células operculadas e vazias das duas áreas foi registrado em planilha e a partir de registro fotográfico.

Na área do tratamento, a área central de todas as células operculadas foi perfurada com auxílio de alfinete entomológico (nº1). Na área controle, as células não foram perfuradas. Em seguida, o favo foi marcado na borda superior e devolvido à colônia na posição original. Após vinte e quatro horas, a quantidade de células operculadas e vazias nas duas áreas foi novamente registrada.

A partir disso, o grau de comportamento higiênico da colônia foi calculado por meio da área de tratamento, utilizando a fórmula:

$$CH = \frac{CV_{(24h)} - CV_{(0h)}}{CO_{(0h)}} \times 100$$

Onde $CV_{(24h)}$ = número de células vazias vinte e quatro horas após a perfuração; CV = número de células vazias antes da perfuração e CO = número de células seladas antes da perfuração (Gramacho

et al., 1999). Em seguida o valor obtido de CH foi subtraído pelo fator de correção Z obtido a partir da área de controle.

O fator de correção Z corresponde à taxa de limpeza natural. O valor estimado para o comportamento higiênico da colônia só é considerado quando o Z no controle for $\leq 10\%$ (Moretto; Gonçalves, 1993). O fator Z é estimado a partir da fórmula:

$$Z = \frac{Y}{A} \times 100b$$

Em que Z = porcentagem de remoção natural de cria no controle; Y= número de células na qual a cria foi removida naturalmente no controle, sendo que: $Y=C - B$ (C é o número de células vazias do controle após o teste de limpeza e B é o número de células vazias da área controle antes do teste) e A= número de células de cria operculadas no controle antes do teste de limpeza (Moretto; Gonçalves, 1993). A partir disso, foram consideradas higiênicas, colônias com $\geq 90\%$ de remoção (Palacio et al., 2010). Após 30 dias, uma repetição do experimento foi realizada em todas as colônias, para certificação dos resultados.

Após as avaliações, foram registradas colônias com índices $\geq 90\%$ e $< 90\%$ de remoção de cria morta. Afim de avaliar a morfometria de abelhas e ácaros coletados em colônias com diferentes graus de comportamento higiênico, selecionamos dez colônias, cinco com $\geq 90\%$ e cinco $< 90\%$ de higiene. A partir disso, foram realizadas análises morfométricas de 200 abelhas, 100 para cada tipo de colônia (higiênicas e não higiênicas), e todos os ácaros encontrados nas colônias selecionadas (95 ácaros, 49 provenientes de colônias não higiênicas e 46 de colônias higiênicas).

Montagem do material e obtenção de imagens

Em laboratório, as asas posteriores, direitas e esquerdas, das abelhas foram removidas e montadas utilizando esmalte incolor, entre lâminas e lamínulas de microscopia. Os ácaros tiveram seus últimos pares de pernas removidos com auxílio de alfinete entomológico, para evitar que se sobrepussem às placas ventrais a serem medidas. Em seguida foram montados com a face ventral voltada para cima, entre lâminas e lamínulas de microscopia, utilizando esmalte incolor. Os materiais foram fotografados com auxílio de um estereomicroscópio digital com câmera acoplada. As imagens das asas foram espelhadas para obter posição idêntica para as asas direita e esquerda, afim de facilitar a medição das regiões anatômicas. O mesmo foi feito com as imagens dos ácaros, para igualar a posição dos escudos metapodais direito e esquerdo. Em seguida, as imagens foram transformadas em arquivo tps no programa tpsUtil32.

Estabelecimento dos marcos anatômicos

O par de escudos metapodais possui a forma de um triângulo alongado e é delimitado pelas margens superior (marcos 2 a 3), mediana (marcos 1 a 2) e lateral (marcos 1 a 3), conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 1. A). O escudo genito-ventral possui um ápice arredondado (marcos 7, 8 e 9), uma base achatada (marcos 1, 11 e 4) e em cada margem, há uma projeção angulosa (Figura 1. A). Levando em consideração a morfologia dos escudos a serem medidos, o programa tpsdig264 foi usado para registrar três marcos (1-3) nos vértices e cinco semimarcos (4-8) nas margens dos escudos metapodais, direito e esquerdo (Figura 1. A). No escudo genito-ventral foram registrados quatro marcos (1-4) e oito semimarcos (5-12) (Figura 1. A).

Para as asas das abelhas, foram utilizados dezenove marcos homólogos localizados nas intersecções das veias das asas direita e esquerda (Francoy et al., 2008) (Figura 1. B) Para cada escudo e asa, as medições foram realizadas duas vezes para a estimativa dos erros de medição (Palmer, 1994). As matrizes de coordenadas obtidas a partir do registro dos marcos anatômicos foram utilizadas para as análises estatísticas.

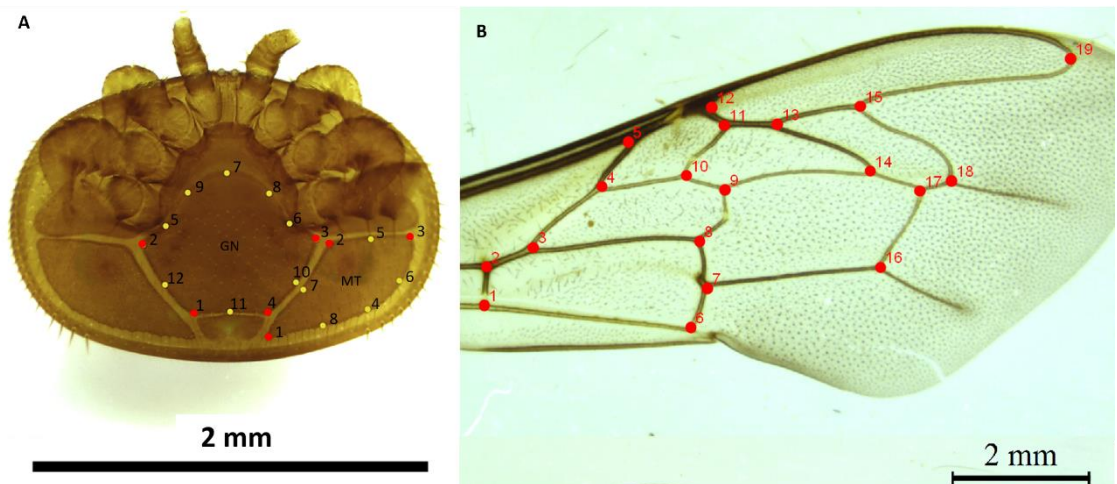


Figura 1. Marcos anatômicos nos escudos ventrais do ácaro e na asa da abelha. **A.** Vista ventral de *Varroa destructor*, mostrando os marcos (vermelho) e semimarcos (amarelo) nos escudos genito-ventral (GN) e metapodal (MT). **B.** Asa anterior direita de abelha africanizada mostrando os marcos anatômicos.

Análises estatísticas das variações morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas no software MorphoJ (Klingenberg, 2011) iniciando com a sobreposição de Procrustes, que ajusta a posição dos objetos, por meio de translação, proporcionalização e rotação, e gera as variáveis a serem analisadas (forma e tamanho) (Bookstein, 1982). Em seguida, para a análise da variação de forma das estruturas, levando em consideração ambientes e tipos de colônia, uma matriz de covariância foi criada e, a partir dela, realizada uma Análise de Componentes principais (PCA) (Zelditch et al., 2004). Posteriormente, uma análise discriminante de

validação cruzada considerando 1.000 permutações foi aplicada (Zelditch et al., 2004). Para visualizar a tendência de deformação das estruturas, analisamos grades de deformação e Wireframes. As análises de tamanho das estruturas foram realizadas no software PAST, utilizando o tamanho do centroide, ou seja, a raiz quadrada da soma dos desvios quadrados dos marcos em torno de seu centro de massa (Bookstein, 1991), após teste de normalidade (Shapiro-Wilk) um teste t foi aplicado.

Análises estatísticas da assimetria flutuante

Para avaliar o índice de assimetria flutuante do tamanho e da forma das estruturas analisadas, foi realizada uma Procrustes ANOVA (Klingenberg; McIntyre, 1998; Palmer; Strobeck, 2003) no software MorphoJ, onde o tamanho do centroide e a forma foram utilizados como variáveis independentes, o lado do corpo como efeito fixo e o indivíduo como efeito aleatório (Klingenberg; McIntyre, 1998). Dessa forma, o efeito do indivíduo representa a variação individual, e o efeito do lado do corpo representa a assimetria da estrutura. O valor para o efeito do lado do corpo e dos indivíduos foi obtido pelo denominador da interação indivíduo x lado obtido pelo denominador do erro de medição (Klingenberg; McIntyre, 1998). Após teste de normalidade (Shapiro-Wilk), um teste t foi aplicado para avaliar diferenças de forma e tamanho entre os grupos, utilizando o programa PAST.

Resultados

Influência do comportamento higiênico da colônia na morfometria de *V. destructor*

Quando ácaros que infestam colônias de abelhas higiênicas e não higiênicas foram analisado com base no escudo metapodal, a PCA mostrou que os três primeiros componentes explicam 75% da variação total da forma do escudo, o primeiro componente 32,6%, o segundo 22,4% e o terceiro 20% (Figura 2. A). A partir da análise de função discriminante, foram encontradas diferenças significativas na forma do escudo entre os grupos, tanto para a distância de Procrustes ($p < 0,001$), quanto para a de Mahalanobis ($p < 0,001$), e o índice de classificação dos indivíduos em seus respectivos grupos, com base no escudo metapodal, foi de 70%. Em ácaros de colônias não higiênicas o escudo metapodal é mais estreito (margem mediana, marcos 1 a 2) e a porção apical (6-3) da margem lateral é mais expandida (Figura 2. B). Quanto ao tamanho, houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$), o escudo metapodal de ácaros de colônias higiênicas é menor (Figura 3).

Quando os grupos de ácaros foram analisados a partir do escudo genito-ventral, a PCA mostrou que os três primeiros componentes principais explicaram 75% da variação da forma do escudo, o

primeiro 31%, o segundo 25% e o terceiro 19% (Figura 2. C). Pela função discriminante, não houve diferença significativa entre os grupos para a distância de Procrustes ($p>0,05$), apenas para a distância de Mahalanobis ($p=0,001$). Pela validação cruzada o índice de classificação dos indivíduos em seus respectivos grupos com base no escudo genito-ventral foi de 64%. Em ácaros de colônias não higiênicas, há um leve estreitamento no ápice do escudo (marcos 7, 8 e 9) e uma expansão na parte superior das projeções marginais (2-5 e 3-6), quando comparado ao escudo de ácaros de colônias higiênicas (Figura 2. D). O tamanho do escudo genito-ventral, não diferiu significativamente entre grupos ($p>0,05$).

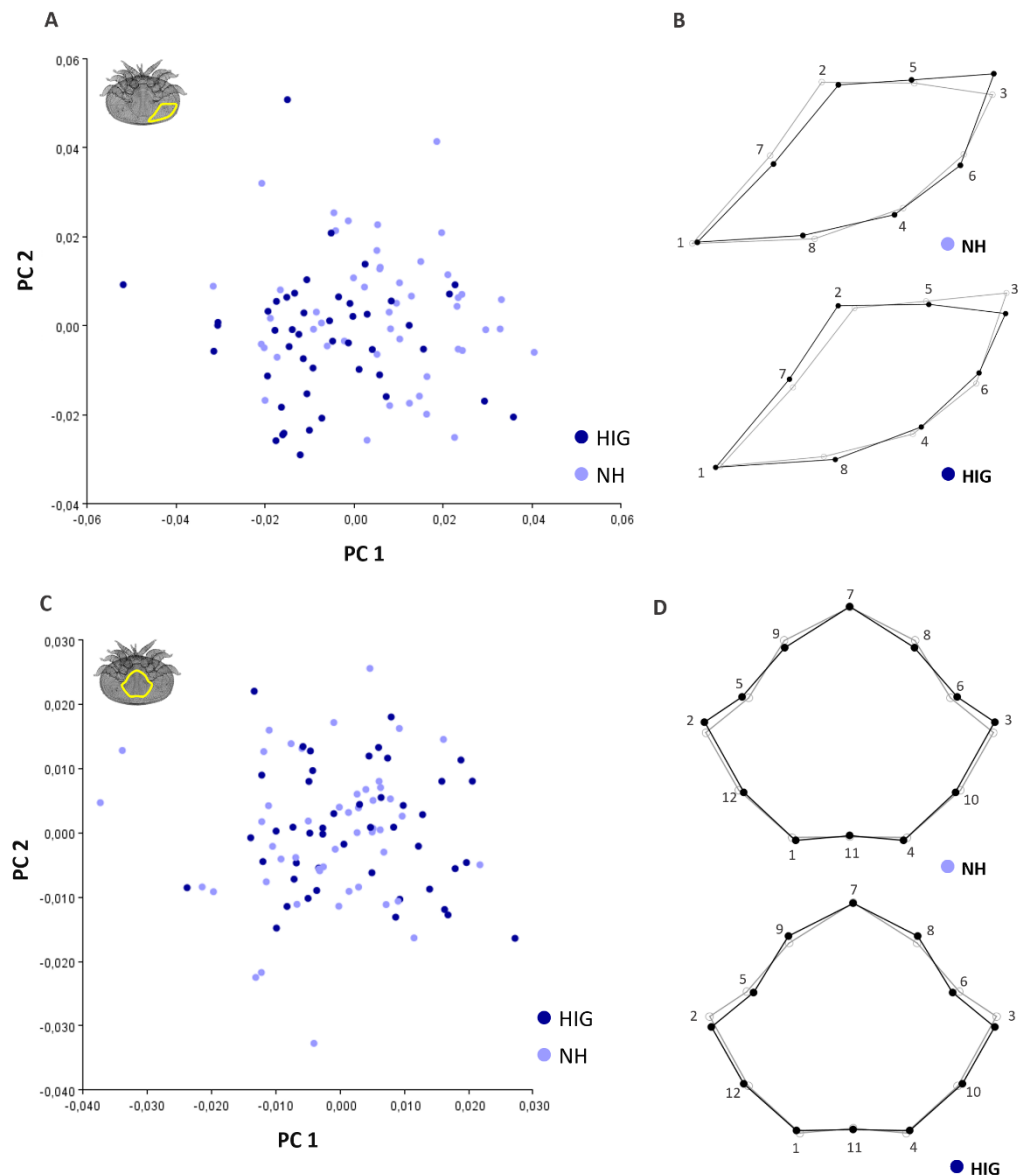


Figura 2. Análise de componentes principais e tendência de deformação dos escudos metapodal e genito-ventral de ácaros *Varroa destructor* que infestam de colônias higiênicas (HIG) e não higiênicas (NH). **A.** Análise de componentes principais da forma do escudo metapodal de ácaros que infestam HIG e NH, apresentando o primeiro e segundo componentes principais (PC1, PC2). **C.** Análise de componentes principais da forma do escudo genito-ventral de ácaros que infestam HIG e NH, apresentando PC1 e PC2. **B.** Tendência de deformação do escudo metapodal de ácaros que infestam NH

e HIG. **D.** Tendência de deformação do escudo genito-ventral de ácaros que infestam NH e HIG. As Linhas claras correspondem à forma média e as linhas escuras à variação da forma.

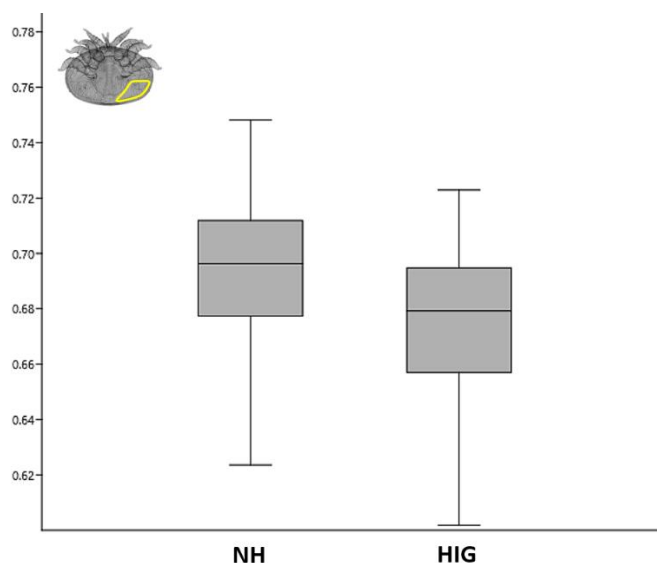


Figura 3. Variação do tamanho do escudo metapodal entre ácaros que infestam colônias não higiênicas (NH) e ácaros que infestam colônias higiênicas (HIG).

Influência do comportamento higiênico na assimetria flutuante do parasito

Quando os escudos metapodais direito e esquerdo de ácaros de colônias de abelhas higiênicas e não higiênicas foram analisados, a interação significativa de individuo x lado confirmou a presença de assimetria flutuante tanto para a forma ($p < 0,001$) quanto para o tamanho ($p < 0,001$) dos escudos nos dois grupos. Apesar disso, apenas a assimetria flutuante do tamanho diferiu significativamente entre os grupos estudados ($p < 0,01$) (Figura 4. A), não havendo diferença significativa para a forma ($p > 0,05$). Os ácaros de colônias higiênicas apresentam níveis mais baixos de assimetria flutuante do tamanho dos escudos metapodais.

A presença de assimetria flutuante da forma do escudo genito-ventral foi confirmada em ácaros que infestam colônias higiênicas e não higiênicas ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferença significativa para a assimetria flutuante da forma entre os grupos ($p > 0,05$).

Assimetria flutuante do hospedeiro: colônias higiênicas e não higiênicas

Quando os pares de asas dianteiras de abelhas de colônias higiênicas e não higiênicas foram analisados, a presença de assimetria flutuante na forma ($p < 0,001$) e no tamanho ($p < 0,001$) foi confirmada nos dois grupos. Apesar disso, apenas a assimetria flutuante do tamanho diferiu significativamente entre os grupos ($p < 0,01$), não havendo diferença significativa para a assimetria da

forma ($p>0,05$). Abelhas de colônias higiênicas apresentaram índices mais elevados de assimetria flutuante do tamanho das asas dianteiras (Figura 4. B).

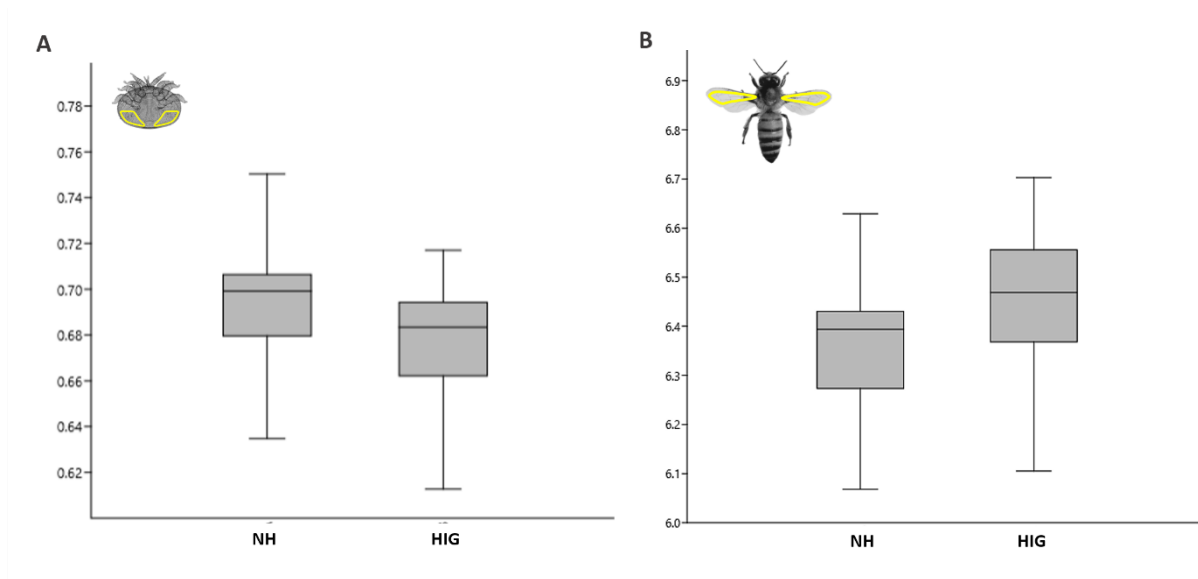


Figura 4. Assimetria flutuante do tamanho. **A.** Assimetria flutuante do tamanho do escudo metapodal de ácaros que infestam colônias não higiênicas (NH) e colônias higiênicas (HIG). **B.** Assimetria flutuante do tamanho das asas dianteiras de abelhas de colônias NH e HIG.

Discussão

Os diferentes níveis de resistência contra doenças a partir de estratégias de defesa comportamental, como o comportamento higiênico, são moduladas pelo contexto genético e ecológico da colônia (Wilson-Rich et al., 2009), o que pode resultar em diferentes ambientes para seus parasitos e patógenos e os expor a pressões distintas. As pressões ambientais podem interferir nos processos químicos, fisiológicos e de desenvolvimento de um organismo (Forsman, 2015). No entanto, a plasticidade fenotípica desses organismos permite que se ajustem às mudanças ambientais mais rápido do que pela adaptação genética, pois pode ocorrer dentro de uma única geração e promover uma solução temporária à uma dada condição ambiental (Clifton et al., 2020).

Os resultados do presente estudo confirmaram a variação morfológica em ácaros que infestam colônias de abelhas africanizadas com diferentes níveis de comportamento higiênico. Foram encontradas diferenças significativas na forma dos escudos genito-ventral e metapodal e no tamanho do escudo metapodal de ácaros que infestam colônias higiênicas e não higiênicas. Essa variação pode indicar que os dois grupos de ácaros estão sofrendo pressões ambientais distintas durante seus processos de desenvolvimento. Isso era esperado, pois muitos processos biológicos podem levar a mudanças na

forma entre indivíduos a partir de pressões seletivas e diferenças nos processos de crescimento e morfogênese (Zelditch et al., 2004).

Outras pesquisas têm demonstrado variação morfológica em *V. destructor* em diferentes contextos: entre populações (Maggi et al., 2009; Aude et al., 2016; Farjamfar et al., 2018) entre estações (Yevstafieva et al., 2020), pela exposição a acaricidas (Maggi et al., 2012; Loeza-Concha et al., 2018), e os morfotipos podem resultar de correlações morfométricas entre de *V. destructor* e *A. mellifera* (Giménez et al., 2017).

A variabilidade corporal de *V. destructor* parece ser um mecanismo natural que modula sua resistência à estressores, e a manutenção dessa estratégia em uma população pode desempenhar um papel fundamental na sobrevivência dos indivíduos (Maggi et al., 2012). De modo que seja possível expressar um fenótipo, dentre todos, que favoreça sua sobrevivência em determinadas circunstâncias (Agrawal, 2001; Maggi et al., 2012). Como o comportamento higiênico expresso pela colônia pode variar a depender do contexto (Wilson-Rich et al., 2009), a variabilidade corporal desse parasito pode ser um atributo importante para persistir no ambiente variável da colônia.

Os ácaros de colônias higiênicas apresentaram um escudo metapodal menor em comparação aos das colônias não higiênicas. Pesquisas futuras devem ser conduzidas para testar se a redução do tamanho do ácaro é uma estratégia que dificulta sua detecção e remoção, nesse caso, ácaros maiores seriam removidos da colônia, pois as abelhas também podem apresentar comportamento higiênico seletivo e dependente da extensão dos danos (Schöning et al., 2012). Nesse contexto, as abelhas de colônias higiênicas poderiam ser mais sensíveis aos sinais associados ao dano do que as de colônias não higiênicas (Mondet et al., 2015).

Enquanto as variações morfológicas dos indivíduos podem refletir diferenças entre os processos de morfogênese nos dois grupos de ácaros avaliados (Zelditch et al., 2004), a assimetria flutuante pode indicar qual grupo sofreu maior estresse durante o desenvolvimento (Klingenberg; Nijhout, 1999; Palmer, 1994; Klingenberg, 2015). Os sistemas de desenvolvimento podem apresentar diferentes sensibilidades à perturbações ambientais, tais ruídos podem causar desvios de simetria e seus efeitos dependem tanto da quantidade de perturbação, quanto da estabilidade do desenvolvimento de um indivíduo, ou seja, a capacidade do seu sistema de desenvolvimento de lidar com perturbações e minimizar os efeitos sobre sua morfologia (Kligenberg, 2003). Diante disso, em um sistema onde hospedeiro e parasito se desenvolvem juntos, como é o caso de *V. destructor* e as abelhas que infestam, é possível que a interação entre múltiplos fatores dos antagonistas possa causar diferentes quantidades de ruído em seus processos de desenvolvimento. Tais perturbações se apresentarão como desvios de simetria e podem ser mensuradas a partir da assimetria flutuante entre os lados do corpo (Klingenberg; Nijhout, 1999; Palmer, 1994; Klingenberg, 2015).

Diante do papel do comportamento higiênico na resistência da colônia (Wilson-Rich et al., 2009), uma relação inversa entre a assimetria flutuante do hospedeiro e do parasito era esperada e foi confirmada pelos resultados do presente estudo. Também era esperado que em colônias higiênicas as

abelhas apresentassem níveis mais baixos de assimetria flutuante e que os ácaros que infestam essas colônias demonstrassem índices mais altos de assimetria flutuante. No entanto, uma relação inversa foi encontrada. A capacidade das abelhas em lidar com o parasitismo de *V. destructor* depende de fatores ambientais, de manejo, do ácaro e das características do próprio hospedeiro, como resistência e tolerância (Mondet et al., 2020). A resistência está ligada à redução da aptidão do parasito, ou seja, seu sucesso reprodutivo, a fim de manter a população abaixo de um limite prejudicial, por sua vez, a tolerância corresponde à redução dos danos causados pelo parasito (Dynes et al., 2020; Mondet et al., 2020). Abelhas adultas e a ninhada apresentam diferentes mecanismos de resistência e tolerância (Mondet et al., 2020). Essas características abrangem uma variedade de mecanismos coletivos e individuais, comportamentais e fisiológicos, de modo que a capacidade de uma colônia em lidar com um parasito não depende apenas de uma única característica, mas da combinação entre elas (Wilson-Rich et al., 2009; Mondet et al., 2020). De fato, a colônia combina estratégias de tolerância e resistência, mas o nível de investimento em cada uma delas depende do contexto genético e ecológico, incluindo as condições da própria colônia e o nível de dano (Wilson-Rich et al., 2009; Cremer et al., 2018).

Desse modo, outros mecanismos de resistência ou tolerância, no contexto do presente estudo, podem estar mais associados à estabilidade no desenvolvimento do hospedeiro e do parasito que o comportamento higiênico. Uma possível explicação para a relação encontrada é que quando as larvas são expostas à *V. destructor*, podem regular proteínas associadas à imunidade e ao estresse, essa é uma resposta imune direcionada em antecipação aos danos esperados, portanto, um mecanismo de tolerância, mas a complexidade e força dessa resposta difere entre genótipos hospedeiros, o que pode levar a impactos distintos sob a aptidão do hospedeiro e do parasito (Fang et al., 2022). Assim, diferenças na tolerância das larvas parasitadas nos dois tipos de colônias avaliadas poderiam explicar as diferenças nos níveis de assimetria flutuante das abelhas e de seus ácaros associados.

Além disso, é preciso levar em consideração que além de *V. destructor* outros parasitos, patógenos e fatores de estresse que não foram medidos podem estar presentes nas colônias e interferir nessa dinâmica (Kligenberg, 2003; Le Conte et al., 2010; Blanken et al., 2015). O próprio *V. destructor* é vetor de vírus que infectam as abelhas, dentre eles destaca-se o vírus da asa deformada (DWV), essa associação mutualística ácaro-vírus pode influenciar tanto o hospedeiro quanto o parasito (Di Prisco et al., 2016). Nas abelhas, cargas crescentes de DWV reduzem a imunocompetência nos níveis humoral e celular, levando a diferentes níveis de imunossupressão e deixando-as mais susceptíveis aos danos causados pelo ácaro (Di Prisco et al., 2016), e possivelmente por outros fatores de estresse, tais como pesticidas, escassez de alimento, mudanças ambientais e outros parasitos e patógenos (Blanken et al., 2015; Le Conte et al., 2010). A partir disso, é provável que a imunossupressão somada à coocorrência de fatores de estresse resulte em diferentes níveis de instabilidade no desenvolvimento das abelhas (Kligenberg, 2003; Le Conte et al., 2010; Blanken et al., 2015; Di Prisco et al., 2016). Adicionalmente, nos ácaros é possível que o aumento da imunossupressão das abelhas infestadas, até um limite crítico, influencie sua eficiência alimentar, se as respostas imunes da larva interferirem na absorção e utilização

dos recursos energéticos (Di Prisco et al., 2016). Diante disso, diferenças nas cargas virais dos grupos de ácaros avaliados poderiam explicar porque as colônias higiênicas apresentaram maiores níveis de assimetria flutuante que os ácaros que as infestam. Outras pesquisas devem ser conduzidas para analisar a presença e a carga viral de DWV e a coocorrência de outros fatores de estresse para deixar essa relação mais clara.

Ademais, o nível de comportamento higiênico encontrado no presente estudo pode ser resultado dos danos da associação ácaros-vírus, visto que análises químicas dos perfis de odor da cria sugerem que as abelhas adultas reconhecem o nível de dano da cria a partir de pistas olfativas e que a extensão dos danos causados desencadeia o comportamento higiênico (Schöning et al., 2012). Crias parasitadas por ácaros com alto potencial de induzir infecções de DWV são removidas com maior frequência, isso sugere que as abelhas apresentam comportamento higiênico seletivo e dependente de danos, o que pode ser uma maneira econômica para as colônias lidarem com a infestação de ácaros (Schöning et al., 2012).

Outra possibilidade é que as diferenças morfométricas e de assimetria encontradas nos dois grupos de ácaros avaliados podem estar ligadas a haplótipos distintos do parasito. No Brasil foram identificados dois haplótipos de *V. destructor*, o japonês (J) e o coreano (K), o último é o mais prevalente em colônias de abelhas africanizadas e apresenta maior capacidade reprodutiva, tendo ao longo dos anos prevalecido sobre o haplótipo J, que primeiro se estabeleceu na América do Sul (Pinto et al., 2022). No entanto, o haplótipo J ainda está presente e coexiste com o K (Pinto et al., 2022). Nesse caso, os ácaros presentes nos diferentes tipos de colônia poderiam ser de haplótipos distintos, mas isso precisa ser avaliado, portanto, pesquisas futuras devem incluir a identificação de haplótipos.

Apesar dos ácaros que infestam colônias com níveis de comportamento higiênico distintos apresentarem diferenças morfológicas e de assimetria flutuante, o comportamento higiênico em si não parece ser a causa dessas variações, mas talvez seja a consequência de características dos próprios ácaros, pelo menos no contexto do presente estudo. Visto que o comportamento higiênico expresso pela colônia depende do contexto de interação entre múltiplos fatores (Wilson-Rich et al., 2009), uma mesma colônia pode representar um ambiente variável entre gerações de ácaros, o que pode ser avaliado por pesquisas futuras que analisem essa relação em diferentes contextos de tempo e espaço.

Para estudar os efeitos de mecanismos de resistência e tolerância das abelhas no desenvolvimento de *V. destructor*, a análise morfológica e a assimetria flutuante podem oferecer importantes pistas, mas dada a complexidade de combinações entre as características do hospedeiro e do parasito, pesquisas futuras que avaliem o papel de múltiplos fatores podem deixar essa relação mais clara.

Referências bibliográficas

Ab'sáber AN (2003) Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas. Ateliê editorial

- Agrawal AA (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294:321-326. <https://doi.org/10.1126/science.106070>
- Aude KE, Armand P, Francois A, Charlemagne G, Georg G, Manuelle T, Lamine BM (2016) Morphometric characterization of parasite *Varroa* sp. of bee *Apis mellifera* L. in Benin. *European Scientific Journal* 12(33): 221. <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n33p221>
- Aumeier P, Rosenkranz P, Gonçalves LS (2000) A comparison of the hygienic response of Africanized and European (*Apis mellifera carnica*) honey bees to *Varroa*-infested brood in tropical Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 23:787-791
- Blanken LJ, Van Langevelde F, Van Dooremalen C (2015) Interaction between *Varroa destructor* and imidacloprid reduces flight capacity of honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282:17-38
- Bookstein FL (1982) Foundations of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13(1):451–470. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.13.110182.002315>
- Bookstein FL (1991) Morphometric tools for landmark data. *Geometry and Biology*. Cambridge University Press, New York
- Büchler R, Andonov S, Bienefeld K, Costa C, Hatjina F, Kezic N, Kryger P, Spivak M, Uzunov A, Wilde J (2013) Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research* 52(1): 1-30. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.07>
- Clifton IT, Chamberlain JD, Gifford ME (2020) Role of phenotypic plasticity in morphological differentiation between watersnake populations. *Integrative Zoology* 15(4):329–337. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12431>
- Cremer S, Pull CD, Fürst MA (2018) Social Immunity: Emergence and Evolution of Colony-Level Disease Protection. *Annual Review of Entomology* 63(1):105–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043110>
- Di Prisco G, Annoscia D, Margiotta M, Ferrara R, Varricchio P, Zanni V, Pennacchio F (2016) A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(12): 3203-3208. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523515113>
- Donzé G, Guerin PM (1994) Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34:305-319. <https://doi.org/10.1007/BF00197001>
- Dynes TL, Berry JA, Delaplane KS, Roode JC, Brosi BJ (2020) Assessing virulence of *Varroa destructor* mites from different honey bee management regimes. *Apidologie* 51(2):276-289. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00716-6>
- Egekwu NI, Posada F, Sonenshine DE, Cook S (2018) Using an in vitro system for maintaining *Varroa destructor* mites on *Apis mellifera* pupae as hosts: studies of mite longevity and feeding behavior. *Experimental and applied acarology* 74:301-315. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0236-0>
- Fang Y, Wubie AJ, Feng M, Ma C, Baer B, Li J (2022) Larval exposure to parasitic *Varroa destructor* mites triggers specific immune responses in different honey bee castes and species. *Molecular and Cellular Proteomics* 21(8):100257. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100257>
- Farjamfar M, Saboori A, Nozari J (2018) Morphometric analysis in different geographical populations of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) associated with *Apis mellifera* colonies in Iran. *Systematic and Applied Acarology* 23(10): 1915-1930. <https://doi.org/10.11158/saa.23.10.4>
- Fornel R, Cordeiro-Estrela P (2012) Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: Marinho JR, Hepp LU, Fornel R (org) *Temas em Biologia: Edição comemorativa*

aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia da URI Campus de Erechim, 1ª ed. Erechim, EDIFAPES, pp 101-120.

- Forsman A (2015) Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity*, 115: 276–284. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.92>
- Francoy TM, Wittmann D, Drauschke M, Müller S, Steinhage V, Bezerra-Laure MAF, De Jong D, Gonçalves LS (2008) Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: Two fast and efficient procedures. *Apidologie* 39(5):488–494. <https://doi.org/10.1051/apido:2008028>
- Giménez PM, Mendoza Y, Invenizzi C, Fuselli S, Alonso SR., Fernández IP, Maggi M (2017) Morphometric correlation between *Apis mellifera* morphotypes (Hymenoptera) and *Varroa destructor* (Acari) from Uruguay. *Journal of Apicultural Research* 56(2): 122–129. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1287998>
- Gramacho KP, Gonçalves LS, Rosenkranz P, De Jong D. (1999). Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. *Apidologie* 30(5):367-374. <https://doi.org/10.1051/apido:19990502>
- Khan KA, Ghramh HA (2021) An investigation of the efficacy of hygienic behavior of various honey bee (*Apis mellifera*) races toward *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) mite infestation. *Journal of King Saud University-Science* 33(3):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101393>
- Klingenberg CP, McIntyre GS (1998) Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52(5):1363-1375. <http://dx.doi.org/10.2307/2411306>
- Klingenberg CP, Nijhout HF (1999) Genetics of fluctuating asymmetry: a developmental model of developmental instability. *Evolution* 53(2):358–375. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb03772.x>
- Klingenberg CP (2003) A developmental perspective on developmental instability: theory, models and mechanisms. In: Polak M (ed) *Developmental instability: causes and consequences*. Oxford University Press, New York, pp 427–442
- Klingenberg CP (2011) MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11(2):353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Klingenberg CP (2015) Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry* 7(2):843–934. <https://doi.org/10.3390/sym7020843>
- Koleoglu G, Goodwin PH, Reyes-Quintana M, Hamiduzzaman MM, Guzman-Novoa E (2017) Effect of *Varroa destructor*, wounding and *Varroa* homogenate on gene expression in brood and adult honey bees. *PloS one* 12(1):e0169669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169669>.
- Kralj J, Fuchs S (2006) Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie* 37(5):577-587. <https://doi.org/10.1051/apido:2006040>
- Le Conte Y, Ellis M, Ritter W (2010) *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses?. *Apidologie* 41(3):353-363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>
- Leclercq G, Pannebakker B, Gengler N, Nguyen BK, Francis F (2017) Drawbacks and benefits of hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.): A review. *Journal of Apicultural Research* 56(4):366–375. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1327938>
- Loeza-Concha H, Domínguez-Rebolledo A, Escalera-Valente F, Ávila-Ramos F, Carmona-Gasca C (2018) Morphometric identification of *Varroa destructor* and its plasticity by the exposure to thymol. *Abanico Veterinario* 8(2): 98–107. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.82.9>

- Maggi MD, Sardella NH, Ruffinengo SR, Eguaras MJ (2009) Morphotypes of *Varroa destructor* collected in *Apis mellifera* colonies from different geographic locations of Argentina. *Parasitology Research* 105(6): 1629–1636. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1605-8>
- Maggi MD, Peralta L, Ruffinengo S, Fuselli S, Eguaras MJ (2012) Body size variability of *Varroa destructor* and its role in acaricide tolerance. *Parasitology Research*, 110(6):2333–2340. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2768-7>
- Martin SJ (1994) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and applied acarology* 18(2):87-100
- Martin SJ (1995) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and applied acarology* 19(4):199-210
- Miranda JR, Cordoni G, Budge G (2010) The acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of invertebrate pathology* 103:30-47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014>
- Mondet F, Alaux C, Severac D, Rohmer M, Mercier A R, Le Conte Y (2015) Antennae hold a key to *Varroa*-sensitive hygiene behaviour in honey bees. *Scientific reports* 5(1):10454. <https://doi.org/10.1038/srep10454>
- Moretto G, Gonçalves LS (1993) Estudo de Algumas Variáveis Relacionadas a um Mecanismo de Defesa de Operárias de *Apis mellifera* à Varroatose e à Taxa de Reprodução do Ácaro *Varroa jacobsoni*. Tese, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Moura MSB, Galvêncio JD, Brito LDL, Souza LD, SÁ IDS, Silva TGF (2007) Clima e água de chuva no Semi-Árido. In: Brito LDL, Moura MSB, Gama GFB (ed) *Potencialidades da água de chuva no Semi-árido brasileiro*. Embrapa Semi-Árido, Petrolina, pp 37-59
- Office International des Epizooties (OIE) (2021) Varroosis of honey bees (infestation of honey bees with *Varroa* spp.). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.07_VARROOSIS.pdf. Accessed 08 march 2022
- Palacio MA, Rodriguez E, Goncalves L, Bedascarrasbure E, Spivak M (2010) Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. *Apidologie* 41(6):602-612. <https://doi.org/10.1051/apido/2010022>
- Palmer AR (1994) Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow TA (ed) *Developmental instability: its origins and evolutionary implications*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 335-364
- Palmer AR, Strobeck C (2003) Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: Polak M (ed) *Developmental instability (DI): causes and consequences*. University Press, Oxford, pp 279- 319
- Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?. *Trends in ecology and evolution* 20(9):481-486. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.001>
- Pinto FA, Teixeira EW, Cestaro LG, Martins MF, Alves MLT (2022) *Varroa destructor* in Africanized honey bees in Brazil: genetic and reproductive profile. *Sociobiology* 69(1):e7340. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v69i1.7340>
- Ramsey SD, Ochoa R, Baughan G, Gulbranson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, Hawthorne D, VanEngelsdorp D (2019) *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(5):1792-1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103:96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

- Schafaschek TP, Hickel ER, Oliveira CAL, Toledo VDAA (2019) Infestation and reproduction of *Varroa destructor* Anderson and Trueman and hygienic behavior in colonies of *Apis mellifera* L. (africanized honeybee) with queens of different genetic origins. *Sociobiology* 66(3):448-456. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v66i3.3444>
- Schöning C, Gisder S, Geiselhardt S, Kretschmann I, Bienefeld K, Hilker M, Genersch E (2012) Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor* parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology* 215(2):264–271. <https://doi.org/10.1242/jeb.062562>
- Steiner J, Dittmann F, Rosenkranz P, Engels W (1994) The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Invertebrate reproduction and development* 25(3):175-183
- Stort AC, Gonçalves LS, Malaspina O, Duarte FAM (1981) Study on sineacar effectiveness in controlling *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 12(3):289-297
- Thaduri S, Locke B, Granberg F, de Miranda JR (2018) Temporal changes in the viromes of Swedish *Varroa*-resistant and *Varroa*-susceptible honeybee populations. *PLoS One* 13(12):e0206938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206938>
- Traynor KS, Mondet F, De Miranda JR, Techer M, Kowallik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A (2020) *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology* 36(7):592–606.
- Velloso AL, Sampaio EVSB, Pareyn FGC (2002) Ecorregiões propostas para o bioma caatinga. Associação Plantas do Nordeste. The Nature Conservancy do Brasil, Recife.
- Wagoner KM, Spivak M, Rueppell O (2018) Brood Affects Hygienic Behavior in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 111(6):2520–2530. <https://doi.org/10.1093/jee/toy266>
- Wilfert L, Long G, Leggett HC, Schmid-Hempel P, Butlin R, Martin SJM, Boots M (2016) Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science* 351:594-597. <https://doi.org/10.1126/science.aac9976>
- Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual review of entomology* 54:405-423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>
- Yevstafieva VO, Zaliznaya LM, Nazarenko OS, Melnychuk VV, Sobolta AG (2020) Morphological variation of *Varroa destructor* (Parasitiformes, Varroidae) in different seasons. *Biosystems Diversity* 28(1):18–23. <https://doi.org/10.15421/012003>
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL (2004) *Geometric morphometrics for biologists: A primer*. Elsevier Academic Press