

# ASCOSFERIOSE (*Ascosphaera apis*): CAUSAS PREDISPOÑENTES, MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO

JOSÉ MANUEL FLORES<sup>1</sup>, SÍLVIA REGINA CUNHA FUNARI<sup>2</sup>, JOSÉ ANTONIO RUIZ<sup>1</sup>, JOSÉ MARIA RUIZ<sup>1</sup>, FRANCISCO PUERTA<sup>1</sup>, FRANCISCO CAMPANO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Andaluz de Apicultura Ecológica, Faculdade de Veterinária, Campus de Rabanales, Universidade de Córdoba, 14.071, Córdoba, Espanha.

<sup>2</sup>Departamento de Produção e Exploração Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 18.618-000, Botucatu, SP, Brasil.  
E-mail: srcfunari@feca.unesp.br

RESUMO: Ainda que a ascosferiose tenha sido descrita nos primeiros anos do século XX, não adquiriu relevância até as décadas de setenta e oitenta, quando foi detectada com grande frequência em amplas regiões do mundo. No Brasil, esta enfermidade foi encontrada pela primeira vez, em 1997, no Estado de São Paulo. Este trabalho é uma revisão de sua etiopatogenia, epidemiologia do processo, tratamento e prevenção.

Palavras chave: abelhas *Apis mellifera*, ascosferiose, *Ascosphaera apis*, patologia apícola, fungos.

## CHALKBROOD DISEASE: PREDISPOSING CONDITIONS, CONTROL AND PREVENTION

ABSTRACT: Although chalkbrood was described in the beginning of the XX century, only in the 70's and 80's it was widespread extended. In Brazil, chalkbrood was first described in 1997, in São Paulo State. This paper is a review of the etiopathogeny, epidemiology, control and prevention of this disease.

Key words: honeybees, *Apis mellifera*, ascosferiosis, *Ascosphaera apis*, bee pathology, fungus.

## INTRODUÇÃO

A ascosferiose é uma doença fúngica das abelhas (*Apis mellifera* L.) cujo agente causal *Ascosphaera apis* invade a cria em desenvolvimento causando sua morte e posterior mumificação (HEATH, 1982a),

quando ocorre uma situação de estresse sobre a colônia (BAILEY, 1967; HEATH, 1982a; FLORES, 1992; PUERTA *et al.*, 1994; FLORES *et al.*, 1995; FLORES *et al.*, 1996b). Recebe os nomes de cria giz, cria gessificada ou ascosferiose. Não é comum que esta enfermidade

chegue a matar a colônia, mas pode reduzir sua produção (HEATH, 1982a; ROSENTHAL *et al.*, 1992).

Esse patógeno foi descrito no início do século XX atacando abelhas, mas só começou a ser importante como doença nos anos setenta e oitenta (NELSON e GOCHNAVER, 1982; PUERTA, 1988; GILLIAM, 1990; PUERTA *et al.*, 1990b). No Brasil foi detectada no Estado de São Paulo, no ano de 1997, por ROCHA *et al.*, 1998. Na Argentina foi encontrada no ano de 1978 por ROSSI e CARRANZA (1980), na região sudeste da Província de Buenos Aires. Na Espanha, o problema é mencionado por Gómez e Fernández, em 1979 (em GÓMEZ, 1983; FLORES, 1992). A partir deste momento, se produziu um espetacular aumento no número de brotes (GÓMEZ, 1983; SERRANO, 1985; PUERTA, 1988; PUERTA *et al.*, 1989a; AGUNDO, 1990; FLORES, 1992), convertendo-se no principal problema patológico da apicultura espanhola, até a chegada da varroatose, em 1985.

## ETIOPATOGENIA

Depois de diversas modificações, consequência dos diferentes estudos realizados ao longo do século XX, pode-se dizer que a ascosferiose é provocada pelo fungo ascomiceto *Ascospaera apis* (Maasen ex Claussen) Oliver e Spiltoir (Ordem Ascosphaerales, Família Ascosphaeraceae) (SKOU, 1972). *Ascospaera major* é outra espécie que tem sido considerada responsável por brotes de ascosferiose, mas sua incidência é apenas testemunhal (HEATH, 1982b; PUERTA *et al.*, 1989b; GILLIAM, 1990).

*Ascospaera apis* é uma espécie dióica (sexos separados). Apresenta-se de duas formas: esporo que é a forma de resistência e com capacidade de infectar, e micélio, que é a forma vegetativa e com a função de invadir os tecidos (HEATH, 1982a; HEATH, 1982b; PUERTA *et al.*, 1989a).

Os esporos apresentam a forma de rins, com 2 a 3,8  $\mu\text{m}$  por 1 a 2,7  $\mu\text{m}$ , são refringentes e estão cobertos por uma substância viscosa que permite

sua aderência ao corpo das abelhas, favorecendo sua dispersão. Resistem a concentrações elevadas de ácido sulfúrico, compostos iodados e outros produtos habitualmente empregados na desinfecção. Resistem a baixas temperaturas, e no mel ou pólen permanecem viáveis por vários anos, o que propicia seu acúmulo, ao longo do tempo, em colméias infectadas. O micélio é formado por hifas irregularmente septadas, de cor branca, com um diâmetro médio de 4,5  $\mu\text{m}$ . Apresenta grande sensibilidade aos agentes desinfetantes. São as hifas que invadem os tecidos, provocando a morte da cria (SKOU, 1972; HEATH, 1982b; PUERTA *et al.*, 1989a).

A enfermidade afeta as larvas de operárias, zangões e rainhas, durante o desenvolvimento. O processo se inicia com a ingestão dos esporos pela larva, antes da operculação. No intestino produz-se a germinação, dando lugar às hifas do micélio (GILLIAM, 1978; HEATH, 1982a,b; PUERTA *et al.*, 1994).

Tradicionalmente são considerados vários fatores que incidem na germinação dos esporos (HEATH, 1982b). BANFORD e HEATH (1989) verificaram que o fungo se desenvolveu bem em uma faixa de pH entre 5 e 7,8, sendo este o pH do intestino médio e da hemolinfa da larva, pouco antes da metamorfose. Abaixo deste pH os esporos não germinariam. Por isto, se pensou que o pH ácido, provocado pela alimentação da cria, à base de geléia real, nos três primeiros dias de vida larvária, não permitiria a germinação dos esporos até os últimos dias deste período. Por outro lado, no cultivo do fungo, a presença de CO<sub>2</sub> (12%) é necessária para a germinação dos esporos e pode ter importância na germinação no interior do tubo digestivo das abelhas (HEATH e GAZE, 1987).

Além disso, quando as condições são adequadas para a germinação dos esporos, há um fator fundamental para o desenvolvimento da enfermidade, qual seja o desenvolvimento anormal da cria. Trata-se de uma enfermidade oportunista e necessita da ação de alguma forma de estresse para poder-se expressar. O desenvolvimento anormal da larva é essencial para o aparecimento do processo patológico. O intestino da larva se encontra fechado na sua

extremidade caudal até depois da operculação (JAY, 1963). Isto faz com que todo o resto de alimento ingerido se encontre acumulado no intestino médio, onde também estão os esporos. Em condições normais, ocorre a abertura e evacuação dos restos alimentícios, pouco tempo depois da operculação e antes que comece o processo da metamorfose. Assim, o fungo que poderia encontrar-se nestes restos é eliminado, evitando-se a invasão dos tecidos larvários. Neste caso, não ocorrerá a enfermidade. Ao contrário, qualquer situação anormal, que possa atrasar essa evacuação, dará oportunidade ao fungo de invadir os tecidos, desencadeando-se a enfermidade. Essas circunstâncias adversas são as causas predisponentes (HEATH, 1982a; FLORES *et al.*, 1995).

Depois da germinação, o micélio invade os tecidos, provocando a morte da larva. Ainda não se sabe claramente como se produz essa invasão, embora se suspeite que o fungo deve aproveitar as grandes transformações que ocorrem na estrutura digestiva da larva, por ocasião da metamorfose larvária (HEATH, 1982a). Posteriormente, empregando um duplo mecanismo enzimático e por pressão (ALONSO *et al.*, 1993b), as hifas atravessam a cutícula larvária, emergindo sobre a superfície da larva morta, que toma neste estágio, um aspecto de algodão. Quando, na larva morta, existem hifas de um só sexo (femininas ou masculinas) não é possível a reprodução sexuada, e o fungo permanece com a coloração esbranquiçada e dando lugar a uma múmia branca, de aspecto e consistência de um pedaço de giz. Se, na larva morta, houver hifas dos dois sexos, serão produzidas estruturas reprodutivas que gerarão o intercâmbio do material genético. Finalmente, se formarão estruturas esféricas denominados corpos frutificantes ou ascocistos, em cujo interior se formam os novos esporos. Primeiramente, estes constituirão aglomerações denominadas ascos, que são liberados à medida que amadurecem. Os ascocistos se produzem em grande quantidade, escurecendo-se à medida que amadurecem e mudando a coloração da larva morta de branca a parda ou negra (múmia negra). Finalmente, os ascocistos maduros se abrem e liberam os esporos. Os esporos difundem-se pela colméia, com os restos de alimento ou sobre as abelhas, chegando muitos deles ao intestino de

outras larvas e fechando, desta, forma o ciclo. Muitos esporos ficam armazenados no mel, no pólen, nos quadros e vão circular novamente quando as reservas são mobilizadas (MOELLER e WILLIAM, 1976; HEATH, 1982a,b; PUERTA *et al.*, 1989a; GILLIAM, 1990).

A enorme quantidade de esporos que são produzidos em cada múmia negra e a viabilidade dos mesmos fazem com que esse processo possa permanecer latente durante muito tempo, esperando a ação de uma causa predisponente que permita a expressão da enfermidade. Uma forma de controle da doença é a redução da concentração de esporos na colméia (HEATH, 1982a; FLORES *et al.*, 1995).

#### AS CAUSAS PREDISPONENTES

Para que a enfermidade se expresse é necessária a presença do agente e também que atue uma causa predisponente (MOELLER e WILLIAMS, 1976; GILLIAM, 1978; HEATH, 1984; PUERTA *et al.*, 1989a; CARDENAL *et al.*, 1990a; GILLIAM, 1990). São várias as causas predisponentes mencionadas na bibliografia, ainda que só o estresse causado pelo esfriamento das crias, tenha sido demonstrado como uma causa direta (BAILEY, 1967; PUERTA *et al.*, 1994; FLORES *et al.*, 1995; FLORES *et al.*, 1996b).

PUERTA *et al.* (1994) e FLORES *et al.* (1996b) reproduziram esta enfermidade com a indução de um estresse térmico por esfriamento. As larvas inoculadas foram resfriadas a 18-20°C, nas horas precedentes e logo após a operculação. Conseguiram 100% de crias enfermas, quando mantiveram as crias a 25°C, depois do estresse térmico. As larvas inoculadas que não foram esfriadas, não desenvolveram a enfermidade, apesar de terem recebido uma dose de  $5 \times 10^5$  esporos. Como isto, se verificou a ação direta de uma causa predisponente. Contrariamente ao que se poderia esperar, quando a cria inoculada foi mantida à temperatura inferior a 25°C não contraiu a enfermidade, mas tampouco sofreu a metamorfose, o que parece indicar que é necessária que se inicie a metamorfose para que o fungo invada os tecidos.

São várias as circunstâncias que podem gerar o esfriamento da cria (HEATH, 1982a; BEFUS-NOGEL *et al.*, 1992; FLORES *et al.*, 1995).

Em regiões frias, este esfriamento pode ser produzido de forma natural, em pleno outono ou inverno, quando uma forte e inesperada queda nas temperaturas encontra ainda muita cria nas colméias ou, na primavera, com as primeiras floradas, que estimulam uma grande postura pela rainha, mas com número insuficiente de abelhas adultas para aquecerem a cria (desproporção entre nutrizes e cria) (KOENIG *et al.*, 1987a,b). Nas regiões tórridas a enfermidade pode ser desencadeada com as baixas temperaturas alcançadas durante a noite (PUERTA *et al.*, 1994).

Em épocas ainda frias, o estresse térmico pode ser provocado pelo apicultor, com a alimentação artificial estimulante. A rainha efetuará uma grande postura e o problema poderá ocorrer se há grande quantidade de cria e poucas abelhas nutrizes (FLORES *et al.*, 1995).

Também, pode-se produzir esfriamento da cria na divisão das colônias quando uma grande quantidade de cria pode ficar sem os cuidados necessários nos novos núcleos (FLORES *et al.*, 1995).

Existem outras possíveis causas predisponentes mencionadas na literatura (HEATH, 1982a). Mas nenhuma delas foi demonstrada definitivamente.

Um exemplo seria a coleta excessiva de pólen. O pólen é a fonte de proteínas das abelhas, cuja maior parte é utilizada na alimentação das crias. Como qualquer outra espécie animal, um déficit de aporte protéico pode promover um atraso no desenvolvimento e uma maior susceptibilidade às enfermidades. Por isto, se supõe que um abuso na extração de pólen possa causar um déficit na colméia e, conseqüentemente, crias mais propensas a terem enfermidades. O certo é que esta circunstância, que pode ter base lógica, ainda não foi demonstrada por pesquisas.

A umidade é considerada, também, como uma causa capaz de desencadear a ascosferiose.

Provavelmente, a base disto seja o aparecimento da enfermidade em colméias situadas em regiões úmidas, ou que possuem grande umidade em seu interior.

FLORES *et al.* (1996b) comprovaram que a umidade, por si só, não desencadeia o processo, mas que pode atuar como um esfriamento moderado.

Outra das possíveis causas predisponentes mencionadas na bibliografia é o abuso do emprego de antibióticos, para tratar outra enfermidade, por exemplo a loque, que pode provocar o aparecimento da ascosferiose. Um dos riscos do emprego contínuo de antibióticos é o de facilitar a proliferação de fungos. Esta hipótese também não foi demonstrada até o momento.

## EPIDEMIOLOGIA

A transferência de esporos do fungo, de colméias enfermas para as sãs, pode ser devida à deriva de abelhas coletoras, por pilhagem ou por zangões, que têm livre circulação entre as colméias. As visitas às flores contaminadas, bebedouros ou outras instalações comuns têm sido citadas como possíveis causas de contaminação (KOENIG *et al.*, 1987a), ainda que sejam de menor importância. Em todo caso, os esporos são transportados na superfície das abelhas ou em seus tubos digestivos (HEATH, 1982a).

O apicultor pode ser um importante agente de transmissão da enfermidade, quando faz manejo inadequado, reutilizando o material, sem os devidos cuidados sanitários, de colméias enfermas em sãs. Com isto, as colméias sãs são infectadas ou pode-se aumentar a carga de esporos de uma já infectada.

O acúmulo de material infectante, os esporos, nas colméias promove um aumento no risco do aparecimento da enfermidade (PUERTA *et al.*, 1990c). A eliminação do material infectante é uma das formas de combate mais importante contra a

ascosferiose. O comportamento higiênico das abelhas pode ser fundamental no controle da enfermidade. Abelhas com acentuado comportamento higiênico podem localizar e eliminar as crias enfermas antes que se produza a maturação dos esporos, reduzindo assim a possibilidade de reinfecção (PALACIO *et al.*, 1996, SPIVAK e GILLIAM, 1998). Por outro lado, rainhas jovens podem dar origem a colônias mais vigorosas e ativas, com maior capacidade para limparem o ninho de cria, sendo portanto, de grande interesse na redução do material infectante.

#### DIAGNÓSTICO DA ASCOSFERIOSE

O diagnóstico da enfermidade, no campo, é o surgimento de múmias diante dos alvados, nos fundos das colméias, no coletor de pólen ou nos alvéolos. Evidentemente, quanto maior a quantidade, mais grave é a infecção (HEATH, 1982a).

Não é difícil encontrar múmias nos alvados depois do início de uma florada ou de mudança das colméias. Isto se deve à estimulação do comportamento higiênico provocado pelo aporte de néctar na colméia ou pelo movimento da mudança. Esta situação indica que a enfermidade já estava presente anteriormente, podendo ter passado despercebida. Circunstâncias como as descritas têm levado a crenças errôneas sobre as causas da enfermidade.

O diagnóstico de laboratório se realiza com a visualização da larva morta (múmia), sob estereomicroscópio, com aumento de 20 vezes. Pode-se observar os ascocistos quando se trata de múmias negras (esporuladas), e o micélio nas múmias brancas. O diagnóstico diferencial pode ser feito frente a outras micoses, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, que geram larvas mortas muito similares, mas seu aparecimento é esporádico e é facilmente diferenciado porque sua multiplicação é assexuada, com formação de conídios. Observando-se suas múmias, sob lupa binocular e com aumento de 20 vezes, verifica-se que em aspergilose não são encontrados corpos reprodutivos esféricos, como na ascosferiose, mas sim conidióforos, de aspecto aglomerado não

esférico. São localizados nos extremos das hifas eréteis e não na massa do micélio, como ocorre com a ascosferiose.

Para o cultivo do fungo, podem ser empregados diversos meios, como o MY-20 (TAKATORI e TANAKA, 1982). Se o cultivo se realiza a partir de esporos, deve-se mantê-lo, ao menos na fase inicial, em um ambiente com 12% de CO<sub>2</sub>. A temperatura média do cultivo é de 30°C e a umidade de 40%. Para evitar a contaminação, a suspensão de esporos deve ser tratada com uma solução de povidona iodada à 50% e, posteriormente, lavada por três vezes com água destilada estéril (FLORES, 1992).

Quando a semeadura se realiza a partir de múmias brancas ou negras recém-coletadas, é suficiente depositá-las inteiras ou parte delas sobre o meio de cultura, sem que seja necessário o ambiente com CO<sub>2</sub> (HEATH e GAZE, 1987).

#### FORMAS DE COMBATE OU CONTROLE

Ainda que tenham sido efetuadas diferentes tentativas *in vitro* e *in vivo* para conseguir um tratamento farmacológico contra a ascosferiose, nenhum se mostrou eficiente (MOELLER e WILLIAMS, 1976; GILLIAM, 1978; GOCHNAVER *et al.*, 1979; HEATH, 1982a; NELSON e GOCHNAVER, 1982; MENAPACE e HALE, 1984; HERBERT *et al.*, 1985; STONER e WILSON, 1985; CARDENAL *et al.*, 1990b; JENKO *et al.*, 1990; PUERTA *et al.*, 1990a,b; FLORES, 1992; ALONSO *et al.*, 1993a; PUERTA *et al.*, 1995; FLORES *et al.*, 1996a). Além disso, seu emprego seria um custo sem vantagens, com o agravante de poder gerar resíduos nos produtos das colméias. Também foram efetuadas tentativas com óleos essenciais (COLIN *et al.*, 1989) e agentes biológicos, que não se mostraram eficientes.

Devido a estas circunstâncias, o combate deve ser preventivo e pelo manejo. Longe de ser um inconveniente, é uma vantagem, pois esta forma de enfrentar a enfermidade é muito eficiente e não tem os problemas dos tratamentos

farmacológicos. As medidas recomendadas para a prevenção são as seguintes (HEATH, 1982a; NELSON e GOCHNAVER, 1982; KOENIG *et al.*, 1987a,b; PUERTA *et al.*, 1989a; ALBO *et al.*, 1994; FLORES *et al.*, 1995):

- Eliminação do material infectante

São vários os métodos que permitem reduzir a concentração dos esporos nas colméias. A renovação dos quadros é um deles. A eliminação dos favos velhos, especialmente se contiverem cria, ou particularmente cria enferma, é uma medida necessária no combate à enfermidade. Desta forma eliminam-se os esporos. A cera nova tem a vantagem de favorecer a postura da rainha. É recomendável renovar, a cada ano, 1/3 dos favos da colméia.

A limpeza e a desinfecção do material são medidas importantes no controle da enfermidade. As colméias devem ser limpas e, se possível, deve-se desinfetá-las, flambando-as ou parafinando-as antes de serem reutilizadas, especialmente se procedem de colméias onde havia crias enfermas ou mortas. Os utensílios de manejo, como pega-quadros, vassourinhas, luvas, etc, devem ser limpos depois de manipular as colméias enfermas e antes de serem utilizados em outras sãs. Em qualquer caso, é recomendável manipular as colméias enfermas em último lugar.

Trocar a rainha é outra medida indicada no combate contra a enfermidade, principalmente quando se trata de uma rainha velha. Uma rainha nova dará à colméia maior vigor e atividade, estimulando o comportamento higiênico das abelhas. Esse comportamento pode ser fundamental no controle da enfermidade. Abelhas com comportamento higiênico eficiente podem localizar e eliminar a cria enferma antes que se produza a maturação dos esporos, reduzindo a possibilidade de reinfecção. Por outro lado, rainhas jovens podem produzir colônias mais vigorosas e ativas, com maior capacidade para limpar o ninho de cria, apresentando grande interesse na redução do material infectante. A nova rainha não deve ser filha da rainha anterior, mas de uma rainha de outra colméia boa produtora e que não apresente a

enfermidade. Essa prática também evita os efeitos nocivos da consanguinidade.

- Evitar a difusão do material infectante, os esporos

Para isto é essencial evitar o intercâmbio de quadros, favos vazios, com restos de cria, mel ou pólen, entre as colméias, especialmente de fracas a fortes, e principalmente de enfermas a sadias. Tampouco se deve usar o mel ou pólen procedentes de colônias enfermas ou mortas para alimentar outras colméias. Sempre que seja possível deve-se usar substitutos do mel ou do pólen para a alimentação das abelhas.

Não devem ficar no apiário restos de favos com alimento, procedentes de colméias enfermas, para evitar que abelhas de colméias sãs os visitem e se infectem.

Deve-se ter precaução com as colméias debilitadas pela enfermidade, pois estas podem ser roubadas por abelhas de outras colméias, difundindo-se a enfermidade rapidamente.

- Evitar as causas predisponentes

Apesar do agente estar presente, verifica-se que a enfermidade não desencadeia se não ocorre uma causa predisponente. O esfriamento é a principal causa, mas é difícil lutar contra ele na apicultura intensiva, pois as colméias devem ser estimuladas muito cedo para melhorar o aproveitamento do fluxo de néctar e para a formação dos núcleos. As circunstâncias, nestes casos, devem de ser avaliadas pelo apicultor. Deve-se evitar deixar as colméias por muito tempo abertas, ou os quadros com cria fora da colméia, nos dias frios. É mais difícil fazer recomendações quanto as outras causas predisponentes descritas, já que em sua maioria nem sequer apresentam incidência real comprovada. Em qualquer caso, é interessante evitar a umidade, não colocando as colméias em zonas úmidas e procurando mantê-las acima do solo para favorecer a ventilação externa e interna, especialmente nos períodos de fluxo nectarífero. Quanto à extração de pólen, o principal mecanismo de prevenção é o controle das reservas

das colméias. Quanto aos antibióticos, o recomendável é empregá-los somente nos casos mais drásticos de ataque da doença.

No caso de colméias ou apiários enfermos pode-se aplicar medidas mais drásticas.

- Separar as colônias enfermas do resto do apiário. Se possível manter um apiário isolado para as colméias enfermas.

- Se a enfermidade se encontra muito difundida é mais provável que todas as colméias estejam infectadas, ainda que em algumas não se encontrem os sintomas. É importante a renovação da cera nestas colméias, para eliminar o material infectante.

- Não deixar, no apiário, os restos das colônias mortas pela enfermidade.

- Se a colméia se encontra pouco afetada, renovar os quadros, em geral os de cria e, em especial, os que apresentem crias afetadas.

- Se a colméia se encontra muito afetada, o melhor é efetuar um pacote sanitário de abelhas ou a técnica do varredura de abelhas, da mesma forma que se faz no caso de loque.

- Substituir a rainha por outra selecionada, ou filha daquelas que não apresentem enfermidades e que sejam boas produtoras.

## AGRADECIMENTOS

INIA: Ao Ministério de Agricultura, Pesca e Alimentação da Espanha pelo financiamento de muitas pesquisas aqui apresentadas.

FAPESP: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil pela bolsa de pesquisa no exterior.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUNDO, R. Patología apícola en Córdoba. Vida Apícola, v. 39, p. 48-53, 1990.
- ALBO, G., CARRANZA, M., LARROQUE, G. et al. Ensayos preliminares para el control integrado de Ascospferosis o Cría Yesificada en la Argentina. In: CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4., Rio Cuarto, Argentina, 1994. Anais... Apimondia: 1994. p. 105-108.
- ALONSO, J.M., PUERTA, F., REY, J.M., HERMOSO DE MENDOZA, J. et al. *Ascosphaera*. Efecto *in vitro* sobre el crecimiento del hongo de algunos quimioterápicos de uso apícola. Vida Apícola, v. 62, p. 41-44, 1993a.
- ALONSO, J.M., REIG, J., PUERTA, F. et al. Enzymatic equipment of *Ascosphaera apis* and the development of infection by this fungus in *Apis mellifera*. Apidologie, v. 24, p. 383-390, 1993b.
- BAILEY, L. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus *Ascosphaera apis* for larvae of the honey bee, *Apis mellifera*. Proceed. Intern. Colloq. Insect Pathology & Microbial Control. North-Holland, Amsterdam, v. 162-167, 1967.
- BANFORD, S., HEATH, L.A.F. The effects of temperature and pH on the germination of spores of the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. J. of Apic. Res., Bucks, v.28, p. 36-40, 1989.
- BEFUS-NOGEL, J., NELSON, D.L., LEFKOVITCH, L.P. Observations on the effect of management procedures on chalkbrood levels in honey bee (*Apis mellifera* L.: Hymenoptera: Apidae) colonies. Bee Sci., v. 2, p.20-24, 1992.
- CARDENAL, J.A., ALONSO, J.M., ANTÓN, J.M. et al.. Ascospferosis. Análisis de los factores que favorecen y desencadenan la enfermedad. Vida Apícola, v. 40, p. 54-58, 1990a.
- CARDENAL, J.A., ALONSO, J.M., HERMOSO DE MENDOZA, J. et al.. Eficacia de fungicidas frente a la micosis. Vida Apícola, v. 43, p. 47-53, 1990b.
- COLIN, M.E., DUCOS DE LAHITTE, J., LARRIBAU, E. et al.. Activité des huiles essentielles de labiées sur *Ascosphaera apis* et traitement d'une ruche

- Apidologie, v. 20, p. 221-228, 1989.
- FLORES, J.M. Mecanismos de control de la ascosferiosis en *Apis mellifera iberica*. España : Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, 1992. Tesis Doctoral..
- FLORES, J.M., PUERTA, F., BUSTOS, M., PADILLA, F. et al. . Ascosferiosis: efecto de las causas predisponentes y métodos de Prevención en el colmenar. Vida Apícola, v. 71, p. 33-39, 1995.
- FLORES, J.M., RUIZ, J.A., RUZ, J.M., PUERTA, F. et al. Estudio *in vivo* e *in vitro* para el control de la ascosferiosis en *Apis mellifera*. Rev. Iberoamericana de Micología, v.13 , p. 292-295, 1996a.
- FLORES, J.M., RUIZ, J.A., RUZ, J.M. et al. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. Apidologie, v. 27, p. 185-192, 1996b.
- GILLIAM, M. Chalkbrood disease of honey bees, *Apis mellifera*, caused by the fungus, *Ascosphaera apis*: a review of past and current research. Proceedings of the V<sup>th</sup> International Colloquium On Invertebrate Pathology And Microbial Control. Adelaide, Australia, p. 398-402, 1990.
- GILLIAM, M. Chalkbrood-status today and hopes for control. Am. Bee J., Bucks, v. 118, p. 468-471, 1978.
- GOCHNAVER, T.A., BOCH, R., MARGETTS, V.J. Inhibition of *Ascosphaera apis* by citral and geraniol.. J. Inv. Pathol., v. 34, p. 57-61, 1979.
- GÓMEZ, A. La micosis del pollo de abeja. Vida Apícola., v .6, p. 18-23, 1983.
- HEATH, L.A.F. Chalkbrood pathogens: a review. Bee World, Bucks, v. 63, p.130-135, 1982b.
- HEATH, L.A.F. Development of chalkbrood in a honeybee colony: a review. Bee World, Bucks, v..63, p. 119-130, 1982a.
- HEATH, L.A.F. The chalkbrood enigma. Central Assoc. Beekpr. Ilford: Essex, 1984. 12 p.
- HEATH, L.A.F., GAZE, B.M. Carbon dioxide activation of spores of the chalkbrood fungus *Ascosphaera apis*. J. Apic. Res., Bucks, v..26, p. 243-246, 1987.
- HERBERT, E.W., DAVID, J.R., CHITWOOD, J. et al.. New compounds with potential for the control of chalkbrood. Am. Bee J., Bucks, v. 125, p. 430-431, 1985.
- JAY, C.S. The development of honeybees in their cells. J. Apic.. Res., Bucks, v. 2, p. 117-134, 1963.
- JENKO, M., ZEBA, L., KOVACEVIC, A. et al.. Control of chalkbrood disease: *in vitro* and *in vivo* studies. Intern. Symp. Recent Res. Bee Pathol. Apimondia: Gent, Belgium, 1990.
- KOENIG, J.P., BOUSH, G.M., ERICKSON, E.H. JR. Effect of spore introduction and ratio of adult bees to brood on chalkbrood disease in honeybee colonies. J. . Api. Res., Bucks, v. 26, p. 191-195, 1987a.
- KOENIG, J.P., BOUSH, G.M., ERICKSON, E.H. JR. Isolation of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, from honey bee (*Apis mellifera*) surface, pollen loads, and a water source. Am. Bee J., Bucks, , v. 122, p. 581-583, 1987b.
- MENAPACE, D., HALE, P. Two fungicides that increased the incidence of chalkbrood in honey bee colonies. *Apiacta*, v. 189, p.115-119, 1984.
- MOELLER, F.E., WILLIAMS, P.H. Chalkbrood research at Madison, Wisconsin. Am. Bee J., Bucks, v. 116, p.484-495, 1976.
- NELSON, D.L., GOCHNAVER, T.A. Field and laboratory studies on chalkbrood disease of honey bees. Am..Bee J., Bucks, v . 122, p .29-32, 1982.
- PALACIO, M.A., FIGINI, E., DEL HOYO, M. et al. Selección para comportamiento higiénico en una población de *Apis mellifera* L. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 5., Mercedes, Uruguay, 1996. Anais... Apimondia: 1996. p. 148-150.
- PUERTA, F. Etiopatogenia y tratamiento de la ascosferiosis en *Apis mellifera* L. Estudio de infección experimental en larvas cultivadas *in vitro*. España : Servicio de Publicaciones de La Universidad de Córdoba., 1988.

- PUERTA, F., FLORES, J.M., BUSTOS, M. et al. Efecto del ácido tricloroisocianúrico sobre la germinación de las esporas de *Ascosphaera apis*. Rev. Iberoamericana de Micología, v. 12, p. 49-51, 1995.
- PUERTA, F., FLORES, J.M., HERMOSO, M. et al. Tratamiento farmacológico de la ascosferiosis. Situación y perspectivas. Vida Apícola, v.44, p. 50-55, 1990a.
- PUERTA, F., FLORES, J.M., TARIN, R. et al. Actividad antifúngica de productos seleccionados contra *Ascosphaera apis*. Estudios *in vitro*. Rev. Iberoamericana de Micología, v.7, p.103-106, 1990b.
- PUERTA, F., PADILLA, F., BUSTOS, M. et al. Algunas aportaciones sobre la ascosferiosis (cría calcárea o escayolada) en *Apis mellifera*. Vida Apícola, v. 33, p. 44-51, 1989a.
- PUERTA, F., PADILLA, F., BUSTOS, M. et al. Contribución al estudio de la etiología de la ascosferiosis en *Apis mellifera*. Rev. Ibérica de Micología, v. 6, p.17-24, 1989b.
- PUERTA, F., PELLIN, P., FLORES, J.M. et al.. Influencia de la dosis infectante en la aparición de la ascosferiosis en *Apis mellifera* y notas sobre su desarrollo. Rev. Ibérica de Micología, v.7, p. 11-14, 1990c.
- PUERTA, F., FLORES, J.M., BUSTOS, M. et al. Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. Apidologie, v. 25, p.540-546, 1994.
- ROCHA, H.C., FUNARI, S.R.C., BAGAGLI, E. Identificação do fungo *Ascosphaera apis* em colméias de abelhas *Apis mellifera* L. no Estado de São Paulo-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12., Salvador, 1998. Anais... Salvador : Confederação Brasileira de Apicultura, 1998. p.247-248.
- ROSENTHAL, C., KAMER, Y., EFRAT, H. Micosis y cosecha de miel.. Vida Apícola, v.52, p.52-56, 1992.
- ROSSI, C., CARRANZA, M. Momificación de larvas de abejas (*Apis mellifera* L.) provocada por *Ascosphaera apis*. Rev. Fac. de Agron., v. 56, p. 11-15, 1980.
- SERRANO, I. La micosis de la abeja "pollo escayolado". II Feria Regional Apícola De Castilla-La Mancha. España : Pastrana. Guadalajara , 1985.
- SKOU, J.P. Ascosphaerales. Friesis, v. 10, p. 1-24, 1972.
- SPIVAK, M., GILLIAM, M. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and Varroa. Part II. *Bee World*, Bucks, v.79, p.169-186, 1998.
- STONER, A., WILSON, W.T. Toxicity effects and chalkbrood incidence in honey bee colonies fed with controlled doses of fungicides. *J. of Entomol Sci.*, v. 20, p.172-178, 1985.
- TAKATORI, E., TANAKA, I. *Ascosphaera apis* isolated from Chalk Brood in honey bees. *Japan. J. of Zootech. Sci.*, v. 53, p. 89-92, 1982.