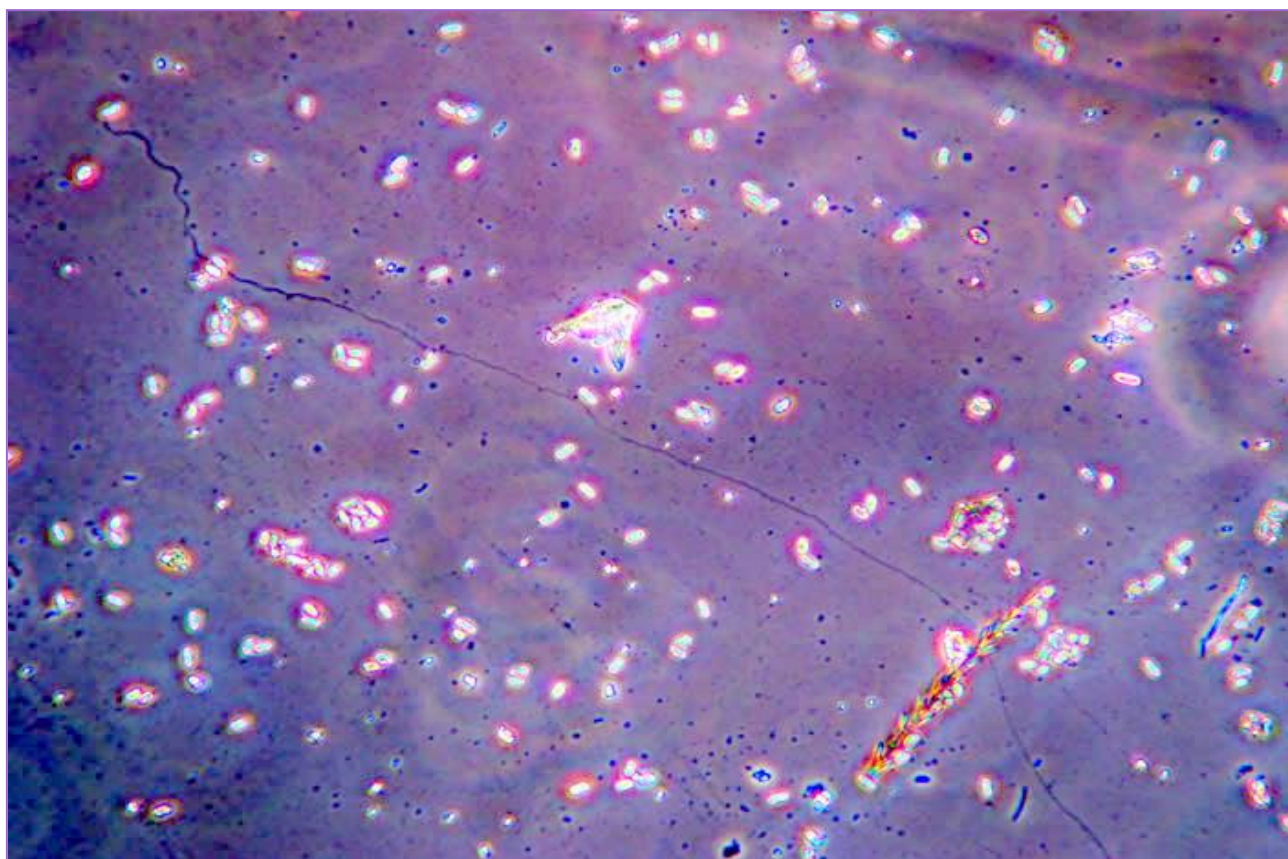


P r o g r a m a A p í c o l a N a c i o n a l
2 0 1 1 - 2 0 1 3

M e d i d a 6 A

P A N

P O R T U G A L , A P I C U L T U R A E N O S E M A



Federação dos
Apicultores
de Portugal



Instituto
Politécnico
de Bragança

u.évora

Universidade
de Évora



Universidade de
Trás-os-Montes
e Alto Douro



Laboratório
Nacional de
Investigação
Veterinária

Julho d e 2013

Conteúdo

Índice Geral.....	ii
Índice de Quadros.....	ii
Lista de gráficos e figuras	iii
AGRADECIMENTOS	iv
NOTA PRÉVIA.....	v
I - I N T R O D U Ç Ã O	1
1 Caracterização dos apicultores inquiridos	3
1.1 Caracterização etária do apicultor.....	3
1.2 Caracterização dos apiários	5
2. Caracterização da saúde das abelhas.....	7
2.1 Quantificação de colónias produtivas a 01. Outubro.2010 e a 01. Abril.2011	7
2.2 Número de desdobramentos realizados e/ou núcleos comprados e média por apicultor	9
2.3 Venda e/ou perda de colónias ou núcleos entre Outubro de 2010 e Abril de 2011	10
2.4 Caracterização sintomatológica de colónias mortas	11
2.5 Raças de abelhas.....	12
2.6 Caracterização da produtividade do efetivo dos apicultores inquiridos.....	14
2.7 Prática de transumância	17
2.8 Definição da mortalidade mensal no período entre abril e outubro de 2010	18
2.9 Caracterização das perdas de colónias ocorridas no período entre abril e outubro de 2010	19
2.10 Principal fator que induziu a morte de colónias	21
2.11 Identificação do início da fase invernal das colónias em 2010	22
2.12 Caracterização do início da atividade primaveril das colónias em 2011	23
2.13 Indicação de perdas aceitáveis de colónias no período compreendido entre 1Outubro de 2010 e 1 Abril de 2011	25
2.14 Considerações finais.....	26
3 Implementação da componente de recolha de amostras	27
4 Estudo da distribuição da Nosemose	29
4.1 Pesquisa preliminar de Nosema por técnicas de Microscopia Ótica	29
4.1.1 Introdução	29

4.1.2	Material e métodos	30
4.1.3	Resultados obtidos por Microscopia.....	32
4.2	Avaliação molecular das espécies de <i>Nosema</i> por PCR.....	35
4.2.1	Introdução	35
4.2.2	Material e métodos	36
4.2.3	Resultados	40
5	Conviver com a Nosemose	46
5.1	Avaliação da eficácia de campo de dois produtos comercialmente disponíveis em Portugal para mitigação de impacto do <i>Nosema ceranae</i>	46
5.1.2	Objetivos	46
5.1.3	Materiais e Métodos	47
5.1.4	Resultados, Conclusões e Recomendações	48
5.1.5	Referências Bibliográficas	49
I I I - DIVULGAÇÃO DE RESULTADOS		50
IV - EXECUÇÃO ORÇAMENTAL		53
V - NOTA FINAL		55
VI - BIBLIOGRAFIA		58

Índice de Quadros

QUADRO I. DISTRIBUIÇÃO POR DISTRITO DO NÚMERO DE INQUIRIDOS, SUA IDADE MÉDIA, MÍNIMA E MÁXIMA	4
QUADRO II. DISTRIBUIÇÃO POR DISTRITO E POR INSTITUIÇÃO DOS APICULTORES INQUIRIDOS, POR CLASSES DE IDADE (FREQUÊNCIA E PERCENTAGEM)	5
QUADRO III. NÚMERO DE COLMEIAS E MÉDIA POR APICULTOR	6
QUADRO IV. NÚMERO DE APIÁRIOS E MÉDIA POR APICULTOR	7
QUADRO V. NÚMERO DE COLÓNIAS PRODUTIVAS E MÉDIA POR APICULTOR (OUTUBRO 2010)	8
QUADRO VI. NÚMERO DE COLÓNIAS PRODUTIVAS E MÉDIA POR APICULTOR (ABRIL 2011)	9
QUADRO VII. REALIZAÇÃO DE DESDOBRAMENTOS E/OU AQUISIÇÃO DE NÚCLEOS	10
QUADRO VIII. NÚMERO MÉDIO DE VENDAS E/OU PERDAS DE COLÓNIAS	11
QUADRO IX. MORTE DE COLÓNIAS SEM ABELHAS MORTAS NO INTERIOR E/OU EXTERIOR DA COLMEIA	12
QUADRO X. RAÇAS DE ABELHAS UTILIZADOS PELOS APICULTORES	13
QUADRO XI. NÚMERO DE COLÓNIAS PRODUTIVAS E MÉDIA POR APICULTOR (ABRIL 2010)	15
QUADRO XII. PRODUÇÃO MÉDIA DE MEL (KG) POR COLÓNIA PRODUTIVA EM 2010	16
QUADRO XIII. NÚMERO DE COLÓNIAS UTILIZADAS PARA SERVIÇOS DE POLINIZAÇÃO	17
QUADRO XIV. NÚMERO DE VEZES QUE AS COLÓNIAS FORAM MOVIMENTADAS PARA TRANSUMÂNCIA	18
QUADRO XV. PRINCIPAL MÊS DE MORTALIDADE DE COLÓNIAS	19
QUADRO XVI. QUANTIFICAÇÃO DA MORTALIDADE DE COLÓNIAS ENTRE APIÁRIOS	20
QUADRO XVII. CAUSA DA MORTALIDADE DE COLÓNIAS ENTRE ABRIL E OUTUBRO DE 2010	22

QUADRO XVIII. MÊS DE INÍCIO DA FASE INVERNAL	23
QUADRO XIX. MÊS DE INÍCIO DA FASE DE PASTOREIO	24
QUADRO XX. PERCENTAGEM DE PERDAS ACEITÁVEIS DE COLÓNIAS NA EXPLORAÇÃO APÍCOLA E NA REGIÃO ENTRE ABRIL E OUTUBRO DE 2010	25
QUADRO XXI. DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRAGEM REALIZADA POR INSTITUIÇÃO NOS ANOS DE 2011 E 2012	28
QUADRO XXII. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA POR INSTITUIÇÃO E DISTRITO	33
QUADRO XXIII. AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE INFEÇÃO POR INSTITUIÇÃO E DISTRITO	34
QUADRO XXVI. AVALIAÇÃO MOLECULAR POR INSTITUIÇÃO E DISTRITO.	41
QUADRO XXVII. AVALIAÇÃO MOLECULAR POR INSTITUIÇÃO E DISTRITO.	42
QUADRO XXVIII. EXECUÇÃO ORÇAMENTAL DO ÚLTIMO ANO DE PROJETO	54

Lista de gráficos e figuras

FIGURA 1.PORMENOR DA COLHEITA DE AMOSTRAS.....	29
FIGURA 2.RECOLHA DE ABELHAS ADULTAS	29
FIGURA 3. AMOSTRA DE ABELHAS ADULTAS	31
FIGURA 4. MANIPULAÇÃO DE UMA AMOSTRA.....	31
FIGURA 5. ESPOROS DO NOSEMA SPP. OBSERVADOS AO MICROSCÓPIO	31
FIGURA 6. EXEMPLO DE UM GEL OBTIDO NA AVALIAÇÃO MOLECULAR NA UTAD	40
FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DO MICROSPORÍDEO N. CERANAE, POR CLASSES DE PREVALÊNCIA E DISTRITO.	43
FIGURA 8CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA PARA UM FRAGMENTO DA REGIÃO IGS DO GENE RRNA DO MICROSPORÍDEO N. CERANAE.....	44
FIGURA 9CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA PARA UM FRAGMENTO DO GENE DA PROTEÍNA DO TUBO POLAR DO MICROSPORÍDEO N. CERANAE.	45
FIGURA 10EXEMPLO ILUSTRATIVO DO ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DO GENE QUE CODIFICA PARA UMA PROTEÍNA DO TUBO POLAR DO N. CERANAE.	45

AGRADECIMENTOS

À generalidade das Associações, Cooperativas e/ou Agrupamento de Produtores que colaboraram:

- Ao ofertar informação sobre os seus associados

O nosso MUITO OBRIGADO pela sua aceitabilidade à informação e/ou apoio solicitado no âmbito deste projeto. A sua colaboração foi essencial para a viabilização desta arriscada missão...

À generalidade dos apicultores que colaboraram:

- na resposta aos inquéritos

- ou nas colheitas de amostras de abelhas adultas para testes de laboratório.

O nosso MUITO OBRIGADO pela sua receptividade ao projeto e pela disponibilidade para aceitar as visitas das equipas das três Instituições executantes. A sua cooperação foi vital para a viabilização deste estudo... Estudar sem poder decisório sobre as unidades experimentais.

...Um constante trabalho de persuasão para as Instituições executoras...

Ao pessoal técnico temporariamente contratado pelas Instituições executantes é também devida uma GRANDE PALAVRA DE AGRADECIMENTO

Ficaram a (melhor) conhecer o país (apícola), e experimentaram o que significa “trabalho forçado”, com poucas horas de sono realizado...

NOTA PRÉVIA

Este projeto surgiu com base na necessidade de se esclarecer, no contexto específico da nossa apicultura, qual o atual perfil epidemiológico da Nosemose, discriminando os possíveis agentes etiológicos do género *Nosema* ao nível específico e, eventualmente identificando possíveis tipologias intraespecíficas, face (i) à constatação de que o *Nosema* é um dos agentes etiológicos associado a patologias apícolas que maior incidência tem revelado nos últimos anos, (ii) ao desconhecimento sobre a(s) espécie(s) de *Nosema* presentes no país e (iii) à necessidade em se avaliar a eficácia de possíveis alternativas à fumagilina no combate a esta patologia.

No sentido de informar sobre a finalização do projeto PAN - Portugal, Apicultura e Nosema”, submete-se agora à Entidade Avaliadora “Relatório Final”, em concordância com a calendarização pré-estabelecida no Protocolo.

Este relatório apresenta uma primeira parte constituída pela caracterização dos apicultores e pela definição concreta dos apiários a estudar, baseada nos inquéritos efetuados aos apicultores inquiridos. Numa segunda parte, são apresentados os resultados dos testes laboratoriais para o estudo da distribuição da Nosemose em Portugal continental e, numa terceira fase, apresentam-se os resultados da identificação da(s) espécie(s) de *Nosema* encontradas. Por último, apresentam-se os resultados da avaliação de dois produtos atualmente disponíveis, o VitaFeedGold e o ApiHerb para reduzir o impacto

da nosebose, baseada nos testes de apiário para determinar a sua eficácia de campo.

.

I - INTRODUÇÃO

Este projeto surgiu com base na necessidade de se esclarecer, no contexto específico da nossa apicultura, qual o atual perfil epidemiológico da Nosemose, discriminando os possíveis agentes etiológicos do género *Nosema* ao nível específico e, eventualmente identificando possíveis tipologias intraespecíficas, face à constatação de que o *Nosema* é um dos agentes etiológicos associado a patologias apícolas que maior incidência tem revelado nos últimos anos. Em Portuga, tem-se observado um número crescente de casos positivos de *Nosema*, muitos deles comprovados laboratorialmente (ainda que sem identificação específica), quer pelo Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, quer pelo Laboratório de Patologia Apícola da ESAB/AAPNM. Deste modo, surgiu o projeto "PAN - Portugal, Apicultura e Nosema" que neste período final foi dividido em cinco domínios de ação.

Num primeiro domínio de ação, foram selecionados cinco apicultores como potenciais respondentes de cada concelho, através de um conjunto de informação que tem vindo a ser acumulada em várias bases de dados independentes existentes em cada um dos parceiros e, alguma da qual, foi também cedida por várias associações, cooperativas e agrupamento de produtores aos quais foi solicitada. Após a sua seleção foi realizada uma entrevista telefónica, segundo o modelo de inquérito "Coloss" utilizado por todos os parceiros associados à implementação desta tarefa, onde foi possível obter determinadas informações, tais como o perfil etário do apicultor, algumas características do manejo apícola, alguns fatores relativos á saúde das abelhas e basicamente conhecer aspetos de distribuição da Nosemose no território nacional.

Deste modo foi possível quantificar a probabilidade de selecionar apiários a amostrar que reflitam dois tipos de “suspeita”: apiários sem Nosemose vs. apiários com Nosemose para materializar o estudo de distribuição de espécies de Nosema em Portugal. Posteriormente, foram basicamente selecionados, em cada concelho do território nacional (continental), 2 ou 3 apicultores para a realização da segunda ação do projeto.

Num segundo domínio de ação, a maioria das Instituições envolvidas neste projeto (ESAB, UTAD e UÉvora), realizou visitas aos apicultores, com o intuito de recolher amostras de abelhas adultas iniciadas na atividade de pastoreio para posteriormente proceder à pesquisa de Nosema. Por vezes este objectivo não foi cumprido devido a várias contrariedades, principalmente, à movimentação por transumância e a fatores climáticos. Num terceiro domínio, foram realizados testes laboratoriais para diagnosticar (ou não) a presença preliminar de Nosema nas amostras recolhidas a nível nacional e, posteriormente, procedeu-se à identificação da(s) espécie(s) de Nosema encontradas. As metodologias laboratoriais seguidas, quer para o diagnóstico preliminar, quer para a identificação de espécies de Nosema foram bastante distintas e, como tal, serão também relatadas em duas secções independentes deste Relatório Final. Após a aplicação dos testes laboratoriais para diagnosticar e para identificar a(s) espécie(s) de Nosema encontradas, o apicultor foi informado dos resultados obtidos, em conformidade com o estabelecido entre as quatro Instituições.

Genericamente, poderemos indicar uma forte distribuição da noseemose pelo território continental causada unicamente pelo agente *Nosema ceranae*.

A última fase deste projeto, correspondeu à seleção de 44 colónias (casos em que se produziu confirmação laboratorial da existência de colónias que hospedam *Nosema ceranae*), a partir das quais e, com o delineamento experimental proposto, foi possível avaliar a eficácia de campo do VitaFeedGold e do ApiHerbe e as suas implicações práticas na luta contra a nosebose.

III - AÇÕES EXECUTADAS

1 Caracterização dos apicultores inquiridos

1.1 Caracterização etária do apicultor

No Quadro I, apresenta-se a distribuição do número de apicultores inquiridos em função da sua idade. Aparentemente, em Portugal continental a idade média dos apicultores corresponde aos 55 anos, variando entre uma idade mínima de 19 anos e uma máxima de 83 anos. Contudo, aguarda-se ainda a informação referente à idade dos apicultores inquiridos pela equipa da UTAD de forma a completar o perfil etário global.

É de salientar a inevitabilidade, por parte das Instituições parceiras de recorrer a um esforço acrescido, para cumprir integralmente a área geográfica de cobertura inicialmente estabelecida para cada equipa do projeto (embora se tenha optado por uma amostragem não aleatória, mas estratificada), como consequência da impossibilidade de acesso a informação contida no registo nacional de apicultores (nomeadamente, aos contactos de apicultores).

Quadro I. Distribuição por distrito do número de inquiridos, sua idade média, mínima e máxima

Distritos	Nº de Inquiridos	Idade média	Idade mínima	Idade máxima
IPB				
Bragança	63	51,1	28	76
Castelo Branco	26	52,6	25	79
Guarda	27	55,0	31	81
Vila Real	28	49,7	32	80
Viseu	24	60,5	36	76
UTAD				
Aveiro	36	-	-	-
Braga	27	-	-	-
Coimbra	36	-	-	-
Leiria	31	-	-	-
Lisboa	37	64	56	72
Porto	33	-	-	-
Santarém	42	68	55	81
Viana do Castelo	27	-	-	-
UÉVORA				
Beja	38	50,8	29	80
Évora	40	58,2	20	79
Faro	49	58,1	34	83
Portalegre	51	49,5	19	74
Setúbal	47	58,0	25	79

No Quadro II observa-se a distribuição por classes, da idade dos apicultores inquiridos. É de salientar o facto de a faixa etária mais representativa pertencer à classe dos 55-64 anos, quer para o interior norte (Trás-os-Montes e Beiras), representando 24,2% do total de inquiridos, quer para a região sul (Alentejo e Algarve), representando 27,8%. Pela observação deste Quadro, verifica-se também que as classes que representam as faixas etárias até aos 34 anos apresentam percentagens mais elevadas no interior norte (7,6%) e percentagens relativamente semelhantes no sul do país (6,5%), do que a classe correspondente a mais de 75 anos (5,4% no interior norte e 6,6% no sul do país). O que evidencia que esta atividade está, atualmente, a cativar adeptos mais jovens, refletindo alguma transformação ao nível do sector apícola.

Quadro II. Distribuição por distrito e por Instituição dos apicultores inquiridos, por classes de idade (frequência e percentagem)

Classes de idades	<25		25-34		35-44		45-54		55-64		65-74		>75	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IPB														
Bragança	0	0,0%	2	3,2%	21	33,3%	10	15,9%	12	19,0%	16	25,4%	2	3,2%
Castelo Branco	0	0,0%	3	12,0%	5	20,0%	5	20,0%	6	24,0%	5	20,0%	1	4,0%
Guarda	0	0,0%	3	11,5%	2	7,7%	8	30,8%	8	30,8%	3	11,5%	2	7,7%
Vila Real	0	0,0%	3	11,5%	9	34,6%	5	19,2%	3	11,5%	5	19,2%	1	3,8%
Viseu	0	0,0%	0	0,0%	3	12,5%	5	20,8%	4	16,7%	10	41,7%	2	8,3%
Média		0,0%		7,6%		21,6%		21,3%		24,2%		20,4%		5,4%
UTAD														
Aveiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Braga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coimbra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leiria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisboa	-	-	-	-	-	-	-	-	2	50,0%	2	50,0%	-	-
Porto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Santarém	-	-	-	-	-	-	-	-	1	50,0%	-	-	1	50,0%
Viana Castelo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média										12,5%		6,3%		6,3%
UÉVORA														
Beja	0	0,0%	2	5,7%	7	20,0%	14	40,0%	9	25,7%	1	2,9%	2	5,7%
Évora	1	3,1%	0	0,0%	4	10,5%	9	23,7%	12	31,6%	9	23,7%	3	7,9%
Faro	0	0,0%	2	4,3%	4	8,5%	12	25,5%	13	27,7%	11	23,4%	5	10,6%
Portalegre	2	4,3%	3	6,4%	12	25,5%	12	25,5%	9	19,1%	9	19,1%	0	0,0%
Setúbal	0	0,0%	4	8,7%	4	8,7%	5	10,9%	16	34,8%	13	28,3%	4	8,7%
Média		1,5%		5,0%		14,6%		25,1%		27,8%		19,5%		6,6%
Média Total		0,45%		3,6%		10,9%		12,8%		14,7%		12,7%		3,4%

1.2 Caracterização dos apiários

No Quadro III indica-se o número total de colmeias dos apicultores entrevistados por distrito, e a média de colmeias por apicultor. Verifica-se que é no distrito de Faro que os apicultores têm, em média, maior número de colmeias (504), enquanto, o menor número de colmeias observa-se no distrito de Viseu, com uma média de 46 colmeias por apicultor.

Quadro III. Número de colmeias e média por apicultor

Distritos	Nº de Inquiridos	Nº de Colónias	Média
IPB			
Bragança	63	12316	195,49
Castelo Branco	26	2827	108,73
Guarda	27	2265	83,89
Vila Real	28	3824	131,57
Viseu	24	1104	46,00
UTAD			
Aveiro	36	2273	63,14
Braga	27	1482	54,89
Coimbra	36	2450	68,06
Leiria	31	2068	66,71
Lisboa	37	2489	67,21
Porto	33	4771	144,58
Santarém	42	5237	124,70
Viana do Castelo	27	2288	84,74
UÉVORA			
Beja	38	13333	350,87
Évora	40	8588	214,70
Faro	49	24674	503,55
Portalegre	51	6509	127,63
Setúbal	47	5894	125,40

Em relação ao número de apiários, observa-se no Quadro IV que é no distrito de Faro que cada apicultor tem, em média, maior número de apiários (19), enquanto, o menor número observa-se no distrito de Braga, com uma média de 2,6 apiários por apicultor.

Quadro IV. Número de apiários e média por apicultor

Distritos	N° de Inquiridos	N° de Apiários	Média
IPB			
Bragança	63	325	5,16
Castelo Branco	26	127	4,88
Guarda	27	96	3,56
Vila Real	28	112	4,00
Viseu	24	68	2,83
UTAD			
Aveiro	36	111	3,08
Braga	27	69	2,56
Coimbra	36	122	3,39
Leiria	31	168	5,42
Lisboa	37	118	3,19
Porto	33	165	5,00
Santarém	42	173	4,12
Viana do Castelo	27	88	3,26
UÉVORA			
Beja	38	422	11,11
Évora	40	279	6,98
Faro	49	911	18,59
Portalegre	51	328	6,43
Setúbal	47	292	6,21

2. Caracterização da saúde das abelhas

No que diz respeito ao modelo do Inquérito “Coloss”, este contempla uma série de questões que permitem facilitar o acesso a informação para indiciar aspetos relativos à saúde das abelhas, nomeadamente, ao conhecimento sobre a(s) espécie(s) de *Nosema* presentes no país, o seu padrão de distribuição e a sintomatologia de campo relatada pelos apicultores.

2.1 Quantificação de colónias produtivas a 01. Outubro.2010 e a 01. Abril.2011

A nível de todos os distritos estudados, foram os apicultores de Faro, Beja e Bragança, os que relataram um maior número de

colónias produtivas (24288, 13800 e 11279, respetivamente) a 01 de outubro de 2010, como se pode observar no Quadro V. Contrariamente, o menor número de colónias produtivas, apresenta-se no distrito de Viseu (941).

Quadro V. Número de colónias produtivas e média por apicultor (Outubro 2010)

Distritos	Nº de Inquiridos	Nº de Colónias produtivas 1.Out.10	Média
IPB			
Bragança	63	11279	179,03
Castelo Branco	26	2596	99,85
Guarda	27	2333	86,41
Vila Real	28	3425	122,32
Viseu	24	941	39,21
UTAD			
Aveiro	36	2197	61,03
Braga	27	1363	50,48
Coimbra	36	2261	62,80
Leiria	31	1683	54,29
Lisboa	37	2184	59,03
Porto	33	4698	142,36
Santarém	42	3557	84,69
Viana do Castelo	27	2137	79,15
UÉVORA			
Beja	38	13800	363,16
Évora	40	9147	228,68
Faro	49	24288	495,67
Portalegre	51	5946	116,59
Setúbal	47	6672	141,96

Pela observação do Quadro VI pode-se verificar que a 1 de Abril de 2011, na maioria dos distritos a nível continental, se registou uma diminuição no número total de colónias produtivas, quando comparado com o efetivo existente a 1 de Outubro de 2010. Contudo, pode realçar-se que a diferença global de colónias produtivas entre 1 de outubro de 2010 e 1 de Abril de 2011 foi de 3979.

Quadro VI. Número de colónias produtivas e média por apicultor (Abril 2011)

Distritos	Nº de Inquiridos	Nº de Colónias produtivas 1.Abr.11	Média
IPB			
Bragança	63	10417	165,35
Castelo Branco	26	2447	94,12
Guarda	27	2200	81,48
Vila Real	28	3039	108,50
Viseu	24	1024	42,67
UTAD			
Aveiro	36	2105	58,47
Braga	27	1421	52,63
Coimbra	36	2303	63,97
Leiria	31	1742	56,19
Lisboa	37	2205	59,59
Porto	33	4697	142,33
Santarém	42	3763	80,60
Vianado Castelo	27	2148	79,56
UÉVORA			
Beja	38	13272	349,26
Évora	40	8189	204,72
Faro	49	24656	503,18
Portalegre	51	5154	101,06
Setúbal	47	5746	122,26

2. 2 Número de desdobramentos realizados e/ou núcleos comprados e média por apicultor

O Quadro VII revela-nos o número de desdobramentos que foram efetuados e/ou núcleos comprados e média por apicultor entre Outubro de 2010 e Abril de 2011. No nosso país (continente) foram efetuados em média, dezassete desdobramentos por apicultor. De salientar também que os distritos onde é mais expressiva esta operação, são os de Faro e Beja, com uma média de, 42 e 30 desdobramentos, respetivamente, realizados por apicultor.

Quadro VII. Realização de desdobramentos e/ou aquisição de núcleos

Distritos	Nº de Inquiridos Desdobramento		Média
IPB			
Bragança	63	630	10,00
Castelo Branco	26	140	2,22
Guarda	27	131	2,08
Vila Real	28	409	6,49
Viseu	24	226	3,59
UTAD			
Aveiro	36	376	5,97
Braga	27	144	2,29
Coimbra	36	614	9,75
Leiria	31	651	10,33
Lisboa	37	523	8,30
Porto	33	850	13,49
Santarém	42	838	13,30
Viana do Castelo	27	382	6,06
UÉVORA			
Beja	38	1907	30,27
Évora	40	395	6,27
Faro	49	2622	41,62
Portalegre	51	360	5,71
Setúbal	47	202	3,21

2.3 Venda e/ou perda de colónias ou núcleos entre Outubro de 2010 e Abril de 2011

No que diz respeito ao número de colónias (núcleos) vendidas e/ou perdas registadas e média por apicultor entre Outubro de 2010 e Abril de 2011 (Quadro VIII), pode-se observar que foi na região sul do país que, em média, se venderam e/ou perderam um maior número de colónias e/ou núcleos por apicultor e por distrito (39 em Faro e 37 em Beja, respetivamente). De salientar também que a norte do país, foi no distrito de Bragança que, em média, um maior número de colónias foi transacionada e/ou perdida (21 colónias e/ou núcleos) por apicultor.

Quadro VIII. Número médio de vendas e/ou perdas de colónias

Distritos	Nº de Inquiridos	Vendas/Perdas	Média
IPB			
Bragança	63	1340	21,27
Castelo Branco	26	312	4,95
Guarda	27	239	3,79
Vila Real	28	373	5,92
Viseu	24	195	3,10
UTAD			
Aveiro	36	143	2,27
Braga	27	85	1,35
Coimbra	36	135	2,14
Leiria	31	292	4,63
Lisboa	37	346	5,49
Porto	33	479	7,60
Santarém	42	377	5,98
Viana do Castelo	27	110	1,75
UÉVORA			
Beja	38	2314	36,73
Évora	40	1348	21,40
Faro	49	2456	38,98
Portalegre	51	1189	18,87
Setúbal	47	1096	17,40

2.4 Caracterização sintomatológica de colónias mortas

No Quadro IX indica-se o número total de colónias dos apicultores entrevistados por distrito, e a média de colónias por apicultor que morreram entre o período de 1 Outubro de 2010 e 1 de Abril de 2011, e que não apresentavam abelhas mortas nos quadros nem na entrada da colmeia. Verifica-se que é na região sul do país (distrito de Faro, Beja e Évora que os apicultores têm, em média, maior número de colónias (1823, 1693 e 1118, respetivamente) que morreram no período em estudo e não apresentavam abelhas mortas, quer no interior quer no exterior da colmeia. Contrariamente, o menor número de colónias que morreram sem apresentar esta sintomatologia, observa-se no distrito de Viana do Castelo (37), e representa o número total de apicultores inquiridos neste distrito.

Quadro IX. Morte de colónias sem abelhas mortas no interior e/ou exterior da colmeia

Distritos	Nº de Inquiridos	Nº de colónias mortas e despovoadas	Média
IPB			
Bragança	63	779,5	12,37
Castelo Branco	26	162	6,23
Guarda	27	175	6,48
Vila Real	28	205	7,32
Viseu	24	139	5,79
UTAD			
Aveiro	36	64	1,78
Braga	27	64	2,37
Coimbra	36	201	5,58
Leiria	31	147	4,74
Lisboa	37	249	6,73
Porto	33	119	3,61
Santarém	42	68	1,62
Viana do Castelo	27	37	1,37
UÉVORA			
Beja	38	1693	44,55
Évora	40	1188	29,70
Faro	49	1823	37,20
Portalegre	51	878	17,22
Setúbal	47	922	19,62

2.5 Raças de abelhas

Pela observação do Quadro X, podemos constatar a raça de abelhas que os apicultores declararam utilizar nos seus apiários. Pode dizer-se que, a nível nacional, a raça maioritariamente utilizada pelos apicultores inquiridos é a *Apis mellifera iberiensis* (*A. m. iberiensis*), variando as percentagens médias entre os 30% (na área de intervenção do IPB, região de Trás-os-Montes e Beiras), 22% (na área de intervenção da UTAD, região litoral centro) e os 97% (na área de intervenção da UÉVORA, região sul do país). Por ordem decrescente podemos enumerar as restantes raças identificadas como sendo as mais utilizadas no nosso país, *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligústica* e *Apis mellifera carnica*.

Contudo, 32% do total de apicultores inquiridos declararam não saber identificar a raça que utilizam refletindo, aparentemente, um défice ao nível da formação apícola.

Quadro X. Raças de abelhas utilizados pelos apicultores

Distritos	Não Sabe		<i>A. m. mellifera</i>		<i>A. m. iberiensis</i>		<i>A. m. ligustica</i>		<i>A. m. carnica</i>		Outras	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IPB												
Bragança	10	16%	28	44%	26	41%	1	2%	0	0%	0	0%
Castelo Branco	5	19%	14	54%	8	31%	1	4%	0	0%	0	0%
Guarda	4	15%	11	41%	15	56%	3	11%	0	0%	1	4%
Vila Real	4	14%	20	71%	4	14%	0	0%	0	0%	0	0%
Viseu	11	46%	10	42%	2	8%	1	4%	2	8%	0	0%
Média		22%		50%		30%		4%		2%		1%
UTAD												
Aveiro	28	78%	1	3%	7	19%	0	0%	0	0%	0	0%
Braga	23	85%	0	0%	2	7%	0	0%	0	0%	2	7%
Coimbra	24	67%	0	0%	11	31%	1	3%	0	0%	1	3%
Leiria	24	77%	1	3%	6	19%	0	0%	0	0%	0	0%
Lisboa	25	68%	2	5%	7	19%	1	3%	0	0%	5	14%
Porto	24	73%	0	0%	9	27%	1	3%	0	0%	1	3%
Santarém	27	64%	1	2%	13	31%	1	2%	0	0%	1	2%
Viana Castelo	19	70%	0	0%	7	26%	0	0%	0	0%	1	4%
Média		73%		2%		22%		1%		0%		4%
UÉVORA												
Beja	1	3%	0	0%	36	95%	0	0%	0	0%	0	0%
Évora	0	0%	0	0%	40	100%	1	3%	0	0%	1	3%
Faro	0	0%	0	0%	48	98%	3	6%	0	0%	5	10%
Portalegre	0	0%	0	0%	51	100%	0	0%	0	0%	0	0%
Setúbal	1	2%	2	4%	43	91%	5	11%	0	0%	5	11%
Média		1%		1%		97%		4%		0%		5%
Média Total		32%		18%		50%		3%		1%		3%

2.6 Caracterização da produtividade do efetivo dos apicultores inquiridos

Existem algumas questões formuladas no modelo de inquérito “Coloss” que permitem caracterizar a produtividade anual do efetivo apícola nacional (continente), nomeadamente, o número de colónias produtivas à data de 1 de Abril de 2010, a produção média por colónia produtiva e o número de colónias utilizadas para serviços de polinização em culturas agrícolas, e que posteriormente (noutros domínios de ação deste projeto) permitirão, conjuntamente com as outras questões formuladas, investigar as interações entre o(s) agente(s) patogénico(s) em estudo e outros fatores que possam contribuir para clarificar a situação da Nosemose em Portugal. Assim, nesta fase dos trabalhos optou-se por considerar a apresentação sumária dos resultados já obtidos.

Em relação ao efetivo de colónias produtivas existentes a 1 de Abril de 2010 relatadas pelos apicultores inquiridos, observa-se no Quadro XI que são os apicultores dos distritos de Faro (24415), Beja (13132) e Bragança (10034) os que apresentavam um maior número de colónias produtivas nessa data. É de referir que no distrito de Viseu, se pode observar o menor número de colónias produtivas (1104 colónias produtivas).

Quadro XI. Número de colónias produtivas e média por apicultor (Abril 2010)

Distritos	Nº de Inquiridos	Colónias produtivas a 1.Abr.2010	Média
IPB			
Bragança	63	10034	159,27
Castelo Branco	26	2369	91,12
Guarda	27	2128	78,81
Vila Real	28	3084	110,14
Viseu	24	938	39,08
UTAD			
Aveiro	36	2084	57,89
Braga	27	1212	44,89
Coimbra	36	2085	57,92
Leiria	31	1589	51,26
Lisboa	37	1965	53,11
Porto	33	4104	124,36
Santarém	42	3523	83,88
Viana do Castelo	27	1984	73,48
UÉVORA			
Beja	38	13132	345,58
Évora	40	8804	220,10
Faro	49	24415	498,26
Portalegre	51	5292	103,76
Setúbal	47	6106	129,91

No que se refere à produção média de mel por colónia produtiva (em kg) obtida em 2010 (Quadro XII), verifica-se que a nível nacional (continente) os apicultores inquiridos obtiveram uma produção média de 15kg, sendo que a produção média mais elevada (17kg) corresponde aos apicultores localizados na área geográfica de cobertura pela DSVR-Norte. Pode-se constatar, também, que são os apicultores do distrito de Leiria que apresentam a menor produção média de mel por colónia produtiva (12kg).

Quadro XII. Produção média de mel (kg) por colónia produtiva em 2010

Distritos	Nº de Inquiridos	Produção média de mel (Kg)	Média
IPB			
Bragança	63	1070,80	16,99
Castelo Branco	26	334,00	12,85
Guarda	27	544,15	20,15
Vila Real	28	534,30	19,08
Viseu	24	409,40	17,06
UTAD			
Aveiro	36	732,00	20,33
Braga	27	362,50	13,43
Coimbra	36	524,00	14,56
Leiria	31	374,00	12,07
Lisboa	37	431,00	11,65
Porto	33	617,00	18,69
Santarém	42	563,00	13,41
Viana do Castelo	27	521,00	19,29
UÉVORA			
Beja	38	609,00	16,03
Évora	40	649,00	16,23
Faro	49	620,00	12,65
Portalegre	51	711,00	13,94
Setúbal	47	624,00	13,28

A utilização de colónias para serviços de polinização de culturas agrícolas pelos apicultores inquiridos, relativamente ao ano de 2010 pode observar-se do Quadro XIII. Pela sua análise, verificamos que a nível nacional, são utilizadas um total de 5684 colónias para a realização desta prática. No entanto, podemos constatar que os apicultores dos distritos de Bragança, Viseu, Braga, Viana do Castelo e Vila Real não utilizam colónias para serviços de polinização. Contrariamente, os apicultores dos distritos do sul do País são os que utilizam um maior número de colónias, designadamente, Faro (2650), Beja (1370), Portalegre (489) e Évora (450).

Neste contexto, podemos afirmar que no nosso País (continente) a maioria dos apicultores não utiliza os serviços de polinização como fonte de rendimento apícola.

Quadro XIII. Número de colónias utilizadas para serviços de polinização

Distritos	Nº de Inquiridos	Serviços de polinização	Média
IPB			
Bragança	63	0	0,00
Castelo Branco	26	35	1,35
Guarda	27	7	0,26
Vila Real	28	15	0,54
Viseu	24	0	0,00
UTAD			
Aveiro	36	1	0,03
Braga	27	0	0,00
Coimbra	36	1	0,03
Leiria	31	15	0,48
Lisboa	37	353	9,54
Porto	33	2	0,06
Santarém	42	201	4,79
Viana do Castelo	27	0	0,00
UÉVORA			
Beja	38	1370	36,05
Évora	40	450	11,25
Faro	49	2650	54,08
Portalegre	51	489	9,59
Setúbal	47	45	0,96

2.7 Prática de transumância

O número de vezes que as colónias foram movimentadas para (transumância/polinização) no ano de 2010 foi uma questão colocada aos apicultores inquiridos, apresentando-se no Quadro XIV os resultados obtidos. Pela sua análise, verificamos que a nível nacional, 82% dos apicultores não movimentaram as colónias nenhuma vez. Todavia, uma percentagem média total de 14% dos apicultores declarou que movimentava as colónias uma vez. É de salientar que apenas, uma percentagem média total de 1% dos apicultores relatou ter movimentado as colónias três ou mais vezes.

Quadro XIV. Número de vezes que as colónias foram movimentadas para transumância

Distritos	Nº de inquiridos		Nenhum		Um		Dois		Três ou mais	
	N	n	n	%	n	%	n	%	n	%
IPB										
Bragança	63	46	73%		17	27%	0	0%	0	0%
Castelo Branco	26	24	92%		2	8%	0	0%	0	0%
Guarda	27	26	96%		1	4%	0	0%	0	0%
Vila Real	28	16	57%		11	39%	1	4%	0	0%
Viseu	24	23	96%		1	4%	0	0%	0	0%
Média			83%			16%		1%		0%
UTAD										
Aveiro	36	31	86%		5	14%	0	0%	0	0%
Braga	27	26	96%		1	4%	0	0%	0	0%
Coimbra	36	28	78%		7	19%	1	3%	0	0%
Leiria	31	24	77%		4	13%	2	6%	1	3%
Lisboa	37	32	86%		4	11%	1	3%	0	0%
Porto	33	23	70%		7	21%	3	9%	0	0%
Santarém	42	37	88%		2	5%	2	5%	1	2%
Viana Castelo	27	20	74%		5	19%	2	7%	0	0%
Média			82%			13%		4%		1%
UÉVORA										
Beja	38	28	74%		3	8%	6	16%	1	3%
Évora	40	34	85%		5	13%	1	3%	0	0%
Faro	49	29	59%		14	29%	3	6%	3	6%
Portalegre	51	41	80%		8	16%	2	4%	0	0%
Setúbal	47	44	96%		1	2%	1	2%	1	2%
Média			79%			13%		6%		2%
MÉDIA TOTAL			82%			14%		4%		1%

2.8 Definição da mortalidade mensal no período entre abril e outubro de 2010

Pela observação do Quadro XV pode-se concluir que, a maioria das perdas de colónias dos apicultores inquiridos a nível nacional (continente) no ano de 2010 ocorreram nos meses de Agosto e Setembro (27%) (variando esta mortalidade entre 12%, no distrito de Portalegre, a 42% no distrito de Viseu). No entanto, podemos observar que no mês de Outubro foi relatada

pelo total de apicultores uma percentagem média de mortalidade das suas colónias de 22%.

Verifica-se também que a percentagem média mais baixa da mortalidade de colónias no nosso país ocorreu nos meses de Abril e Maio (6%).

Quadro XV. Principal mês de mortalidade de colónias

Distritos	Abril-Maio		Junho-Julho		Agosto-Setembro		Outubro	
	n	%	n	%	n	%	n	%
IPB								
Bragança	5	8 %	11	17 %	25	40 %	7	11 %
Castelo Branco	1	4 %	3	12 %	7	27 %	4	15 %
Guarda	1	4 %	3	11 %	6	22 %	4	15 %
Vila Real	2	7 %	4	14 %	9	32 %	3	11 %
Viseu	4	17 %	2	8 %	10	42 %	3	13 %
Média		8 %		13 %		33 %		13 %
UTAD								
Aveiro	3	8 %	2	6 %	11	31 %	5	14 %
Braga	2	7 %	3	11 %	9	33 %	2	7 %
Coimbra	3	8 %	1	3 %	12	33 %	2	6 %
Leiria	2	6 %	1	3 %	7	23 %	3	10 %
Lisboa	4	11 %	1	3 %	7	19 %	7	19 %
Porto	1	3 %	2	6 %	8	24 %	5	15 %
Santarém	1	2 %	3	7 %	6	14 %	5	12 %
Viana do Castelo	1	4 %	1	4 %	5	19 %	2	7 %
Média		6 %		5 %		24 %		11 %
UÉVORA								
Beja	2	5 %	1	3 %	9	24 %	1	42 %
Évora	3	8 %	1	3 %	10	25 %	1	48 %
Faro	1	2 %	6	12 %	11	22 %	1	29 %
Portalegre	0	0 %	1	2 %	6	12 %	3	59 %
Setúbal	0	0 %	4	9 %	15	32 %	1	40 %
Média		3 %		6 %		23 %		43 %
MÉDIA TOTAL		6 %		8 %		27 %		22 %

2.9 Caracterização das perdas de colónias ocorridas no período entre abril e outubro de 2010

A constatação de alguma diferença substancial nas perdas de colónias ocorridas entre Abril e Outubro de 2010 foi uma questão colocada aos apicultores inquiridos, apresentando-se no

Quadro XVI os resultados obtidos. A nível nacional (continental), a maioria dos apicultores não constatou nenhuma diferença substancial na mortalidade de colónias ocorrida entre os seus apiários. No entanto, devemos destacar que é na região sul do país (Évora, Faro e Portalegre) que mais apicultores testemunharam diferenças substanciais na mortalidade de colónias nos seus apiários (45%, 43% e 43%, respetivamente). Pode observar-se também que, 5% do total de inquiridos afirmou não saber se ocorreram perdas substanciais de colónias nos seus apiários no período em estudo.

Quadro XVI. Quantificação da mortalidade de colónias entre apiários

Distritos	N° de Inquiridos N	Sim		Não		Não sabe	
		n	%	n	%	n	%
IPB							
Bragança	63	5	8%	51	81%	3	5%
Castelo Branco	26	2	8%	20	77%	2	8%
Guarda	27	3	11%	20	74%	1	4%
Vila Real	28	5	18%	17	61%	6	21%
Viseu	24	3	13%	15	63%	6	25%
Média			12%		71%		13%
UTAD							
Aveiro	36	4	11%	25	69%	0	0%
Braga	27	4	15%	10	37%	0	0%
Coimbra	36	7	19%	16	44%	0	0%
Leiria	31	1	3%	20	65%	0	0%
Lisboa	37	9	24%	12	32%	0	0%
Porto	33	8	24%	15	45%	0	0%
Santarém	42	6	14%	13	31%	1	2%
Viana Castelo	27	3	11%	16	59%	0	0%
Média			15%		48%		0%
UÉVORA							
Beja	38	14	37%	24	63%	0	0%
Évora	40	18	45%	20	50%	0	0%
Faro	49	21	43%	28	57%	0	0%
Portalegre	51	22	43%	25	49%	1	2%
Setúbal	47	15	32%	30	64%	3	6%
Média			40%		57%		2%
Média Total			22%		59%		5%

2.10 Principal fator que induziu a morte de colónias

No Quadro XVII podem observar-se os principais fatores descritos pelos apicultores inquiridos como causadores de mortalidade das suas colónias. Podemos afirmar que a nível nacional (continente) 44% dos apicultores não sabe qual a causa de morte das suas colónias, sendo que, 27% dos apicultores atribui a principal causa de mortalidade a outros fatores, tais como, orfandade das colónias, outras doenças (nomeadamente à Loque americana e Ascosferiose), medicamentos utilizados para o tratamento da Varroose, pesticidas, despovoamento das colmeias, etc. Pode-se constatar, também, que é no distrito de Faro que existe uma maior percentagem de apicultores que atribui a morte das suas colónias à Varroose (41%), considerada esta doença como o terceiro principal fator a que se atribui a mortalidade de colónias em Portugal. Por outro lado, podemos observar uma média de 6% de apicultores que considera o Nosema como o principal fator causador de morte de colónias no nosso país (destacando-se o distrito de Castelo Branco com a maior percentagem de apicultores (23%) que assinalou este fator).

Quadro XVII. Causa da mortalidade de colónias entre Abril e Outubro de 2010

Distritos	Não Sabe		Fome		Rainhas de baixa qualidade		Varroa		Nosema		Colónias fracas no Outono		Outras	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IPB														
Bragança	40	63%	1	2%	6	10%	19	30%	5	8%	5	8%	27	43%
Castelo Branco	16	62%	5	19%	3	12%	3	12%	6	23%	2	8%	5	19%
Guarda	18	67%	3	11%	2	7%	5	19%	3	11%	4	15%	9	33%
Vila Real	10	36%	0	0%	3	11%	5	18%	2	7%	3	11%	15	54%
Viseu	15	63%	2	8%	0	0%	6	25%	1	4%	1	4%	8	33%
Média		58%		8%		8%		21%		11%		9%		36%
UTAD														
Aveiro	17	47%	8	22%	4	11%	6	17%	0	0%	1	3%	6	17%
Braga	14	52%	2	7%	6	22%	4	15%	0	0%	1	4%	2	7%
Coimbra	22	61%	5	14%	2	6%	4	11%	1	3%	1	3%	6	17%
Leiria	16	52%	2	6%	4	13%	8	26%	0	0%	1	3%	1	3%
Lisboa	15	41%	3	8%	6	16%	9	24%	0	0%	0	0%	12	32%
Porto	14	42%	4	12%	5	15%	6	18%	2	6%	0	0%	6	18%
Santarém	22	52%	4	10%	4	10%	7	17%	2	5%	1	2%	12	29%
Viana Castelo	18	67%	0	0%	3	11%	5	19%	1	4%	0	0%	1	4%
Média		52%		10%		13%		18%		2%		2%		16%
UÉVORA														
Beja	9	24%	9	24%	8	21%	12	32%	1	3%	1	32%	11	29%
Évora	8	20%	5	13%	9	23%	12	30%	3	8%		18%	11	28%
Faro	10	20%	9	18%	13	27%	20	41%	1	2%	1	27%	15	31%
Portalegre	17	33%	7	14%	6	12%	14	27%	1	2%		18%	15	29%
Setúbal	9	19%	8	17%	6	13%	17	36%	2	4%	1	28%	13	28%
Média		23%		17%		19%		33%		4%		24%		29%
Média Total		44%		12%		13%		24%		6%		12%		27%

2.11 Identificação do início da fase invernal das colónias em 2010

O Quadro XVIII revela os meses em que as colónias iniciam a fase invernal. Podemos afirmar que a maioria dos apicultores (51%) relata a sua ocorrência no início dos meses de Novembro e/ou Dezembro. Possivelmente, por equívoco, má interpretação da questão colocada e/ou desconhecimento 50% dos apicultores da região Centro, Lisboa e Vale do Tejo entrevistados pelos parceiros da UTAD, testemunham a sua ocorrência noutros meses (nomeadamente, Julho e Agosto). A nível nacional, 8% dos inquiridos afirmou não saber responder a esta questão.

Quadro XVIII. Mês de início da fase invernal

Distritos	Nº de Inquiridos	Outros meses		Setembro- Outubro		Novembro- Dezembro		Janeiro- Fevereiro		Não Sabe	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IPB											
Bragança	63	0	0%	25	40%	38	60%	0	0%	0	0%
Castelo Branco	26	0	0%	11	42%	14	54%	0	0%	1	4%
Guarda	27	0	0%	19	70%	6	22%	0	0%	1	4%
Vila Real	28	0	0%	10	36%	16	57%	0	0%	0	0%
Viseu	24	0	0%	12	50%	12	50%	0	0%	0	0%
Média			0%		48%		49%		0%		2%
UTAD											
Aveiro	36	21	58%	3	8%	9	25%	0	0%	0	0%
Braga	27	5	19%	5	19%	12	44%	0	0%	0	0%
Coimbra	36	19	53%	2	6%	13	36%	0	0%	0	0%
Leiria	31	16	52%	1	3%	11	35%	1	3%	0	0%
Lisboa	37	19	51%	2	5%	11	30%	0	0%	1	3%
Porto	33	24	73%	2	6%	4	12%	0	0%	0	0%
Santarém	42	24	57%	3	7%	14	33%	0	0%	0	0%
Viana Castelo	27	11	41%	2	7%	11	41%	0	0%	0	0%
Média			50%		8%		32%		0%		0%
UÉVORA											
Beja	38	0	0%	0	0%	24	63%	0	0%	8	21%
Évora	40	0	0%	0	0%	34	85%	0	0%	5	13%
Faro	49	0	0%	0	0%	27	55%	0	0%	21	43%
Portalegre	51	0	0%	0	0%	51	100%	0	0%	0	0%
Setúbal	47	0	0%	0	0%	29	62%	3	6%	14	30%
Média			0%		0%		73%		1%		21%
MÉDIA TOTAL			17%		19%		51%		0%		8%

2.12 Caracterização do início da atividade primaveril das colónias em 2011

O Quadro XIX mostra também que foi entre os meses de Fevereiro e Março que a maior percentagem média total dos apicultores questionados (34% e 32%, respetivamente) respondeu ter sido nestes meses do ano de 2011 que as colónias iniciaram a sua

atividade produtiva. Todavia, uma percentagem média total de 18% de apicultores da região Centro, Lisboa e Vale do Tejo declarou que o início da atividade apícola correspondia a outros meses (entre os quais, Setembro e Outubro foram os meses mencionados com maior frequência), refletindo, aparentemente, um equívoco, má interpretação da questão colocada e/ou desconhecimento. Apenas 1% dos apicultores afirmou não saber em que meses as colónias iniciam a sua fase de pastoreio.

Quadro XIX. Mês de início da fase de pastoreio

Distritos	N° de Inquirido	Outros meses		Janeiro		Fevereiro		Março		Abril		Maio		Não Sabe	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IPB															
Bragança	63	0	0%	2	3%	43	68%	17	27%	1	2%	0	0%	0	0%
Castelo Branco	26	0	0%	1	4%	17	65%	6	23%	2	8%	0	0%	0	0%
Guarda	27	0	0%	1	4%	13	48%	8	30%	3	15%	0	0%	1	4%
Vila Real	28	0	0%	1	4%	11	39%	12	43%	2	7%	0	0%	0	0%
Viseu	24	0	0%	1	4%	15	63%	8	33%	2	8%	0	0%	0	0%
Média			0%		4%		57%		31%		7%		0%		1%
UTAD															
Aveiro	36	24	67%	0	0%	7	19%	2	6%	0	0%	0	0%	0	0%
Braga	27	4	15%	1	4%	13	48%	3	11%	2	7%	0	0%	0	0%
Coimbra	36	19	53%	0	0%	3	8%	12	33%	0	0%	0	0%	0	0%
Leiria	31	16	52%	1	3%	9	29%	3	10%	0	0%	0	0%	0	0%
Lisboa	37	20	54%	9	24%	3	8%	1	3%	0	0%	0	0%	0	0%
Porto	33	25	76%	2	6%	0	0%	3	9%	0	0%	0	0%	0	0%
Santarém	42	27	64%	4	10%	7	17%	3	7%	0	0%	0	0%	1	2%
Viana Castelo	27	11	41%		11%	6	22%	4	15%	0	0%	0	0%	0	0%
Média			53%		7%		19%		12%		1%		0%		0%
UÉVORA															
Beja	38	0	0%		0%	15	39%	13	34%	3	8%	3	8%	1	3%
Évora	40	0	0%		3%	10	25%	21	53%	5	13%	1	3%	1	3%
Faro	49	0	0%		6%	12	24%	30	61%	3	6%	0	0%	0	0%
Portalegre	51	0	0%		0%	10	20%	38	75%	2	4%	0	0%	1	2%
Setúbal	47	0	0%		11%	13	28%	22	47%	4	9%	2	4%	0	0%
Média			0%		4%		27%		54%		8%		3%		1%
MÉDIA TOTAL			18%		5%		34%		32%		5%		1%		1%

2.13 Indicação de perdas aceitáveis de colónias no período compreendido entre 1 Outubro de 2010 e 1 Abril de 2011

A percentagem de perdas de aceitáveis de colónias para a exploração e para a região no período compreendido entre Outubro de 2010 e Abril de 2011 figura no Quadro XX. A nível nacional (continente), os apicultores questionados responderam que a percentagem de perdas aceitáveis para as suas explorações correspondia a 7% e para a sua região a 10%.

Quadro XX. Percentagem de perdas aceitáveis de colónias na exploração apícola e na região entre Abril e Outubro de 2010

Distritos	% de perdas para a exploração	% de perdas para a região
IPB		
Bragança	7 %	8 %
Castelo Branco	7 %	8 %
Guarda	7 %	10 %
Vila Real	6 %	8 %
Viseu	6 %	7 %
Média	7 %	8 %
UTAD		
Aveiro	11 %	13 %
Braga	12 %	15 %
Coimbra	11 %	14 %
Leiria	11 %	13 %
Lisboa	15 %	14 %
Porto	10 %	13 %
Santarém	10 %	13 %
Viana do Castelo	11 %	12 %
Média	11 %	13 %
UÉVORA		
Beja	11 %	12 %
Évora	10 %	10 %
Faro	10 %	10 %
Portalegre	9 %	10 %
Setúbal	11 %	11 %
Média	10 %	11 %
MÉDIA TOTAL	9 %	11 %

2.14 Considerações finais

Na sequência da análise dos resultados obtidos às entrevistas telefónicas/presenciais efetuadas aos apicultores, e no que diz respeito ao perfil etário do apicultor, podemos afirmar que este se caracteriza por ter uma idade média de 55 anos.

No que se refere à caracterização dos apiários constata-se que é no distrito de Faro que os apicultores têm, em média, um maior número de colmeias e um maior número de apiários, refletindo o carácter profissional dos apicultores da região sul do País. O menor número de colmeias por apicultor observa-se no distrito de Lisboa. A nível nacional, cada apicultor tem, em média seis apiários.

Relativamente, ao número de colónias produtivas existentes, salienta-se que á data de 1 de Outubro existiam 100507 e em Abril de 2011 96528. Aparentemente, esta diminuição de efetivo, está relacionada com as possíveis perdas de colónias que possam ter ocorrido durante a época invernal e que corresponderam, apenas, a perdas na ordem das 3979 colónias. Nos dados apresentados a prática de desdobramentos e/ou aquisição de núcleos que ocorre na época primaveril, correspondeu, a um aumento de 11400 colónias a nível nacional (continente). Não obstante, verifica-se também que a transação e/ou perda de colónias e/ou núcleos no período referenciado representou um número total de 12 829 colónias. Convém também referir que é na região sul do país que os apicultores têm, em média, um maior número de colónias que morreram no período acima citado e não apresentavam abelhas mortas, quer no interior quer no exterior da colmeia.

A maioria dos apicultores afirma ter utilizado, como raça de abelhas a *A. m. iberiensis*.

No que se refere ao número de colónias produtivas que os apicultores relataram ter em Abril de 2010, pode-se dizer que no total nacional existia um efetivo de 94848 colónias, ao qual correspondeu uma produção média de 15kg de mel, sendo que apenas 5634 das colónias foram utilizadas para serviços de polinização de culturas agrícolas. Na sua maioria, os apicultores afirmam que no ano de 2010 as suas colónias não

foram movimentadas para transumância, embora nos distritos de Faro e Beja esta prática possa ter uma razoável expressão.

Em relação ao mês em que ocorreram a maioria das suas perdas de colónias, a maioria dos apicultores inquiridos relatou a sua ocorrência em Agosto e/ou Setembro. No entanto, em relação à constatação se existiu alguma diferença substancial na morte de colónias ocorridas nos seus apiários, a maioria dos apicultores respondeu negativamente, tendo também revelado não saberem a principal causa da morte das suas colónias.

Na sua maioria, os apicultores afirmam que no ano de 2010 as suas colónias começaram a invernar no início do mês de Novembro e/ou Dezembro e que o início da atividade produtiva ocorreu no mês de Fevereiro do ano de 2011.

Por último, em relação à questão sobre quais as percentagens de perdas aceitáveis para a sua exploração e/ou região, a nível do País (continente) as respostas corresponderam a 9% e 11%, respetivamente.

3 Implementação da componente de recolha de amostras

Ambas as fases da componente de rastreio foram concluídas, com sucesso. A amostragem incidiu sobre apiários localizados em 224 freguesias de 148 concelhos pertencentes aos 18 distritos de Portugal continental. Na primeira fase, foram recolhidas um total de 277 amostras, designadamente 105 pela UE, 107 pela UTAD e 65 pelo IPB (Quadro XXI). Em relação à segunda fase, apenas se verificou uma pequena diminuição, consequência da movimentação para transumância de algumas das colónias a re-amostrar. Esta componente de recolha foi concluída, a nível nacional (continente), em finais do mês de Julho do ano transato, em linha com o “Protocolo de Execução” que sustenta este projeto.

Quadro XXI. Distribuição da amostragem realizada por Instituição nos anos de 2011 e 2012

Instituição	Amostragem realizada em 2011	Amostragem realizada em 2012	Distritos
IPB	65	64	Bragança, Vila Real, Castelo Branco, Guarda, Viseu
UÉvora	105	102	Évora, Portalegre, Faro, Setúbal, Beja
UTAD	107	108	Viana do Castelo, Braga, Porto, Aveiro, Coimbra, Leiria, Santarém

Globalmente, o número de amostras recolhidas respeitou o compromisso assumido com a Instituição financiadora desta ação, ainda que tenha sido necessário recorrer a um esforço acrescido, por parte das Instituições, na visita de um maior número de apiários do que o inicialmente previsto na situação de projeto.

Este tipo de atividade (rastreo de campo) requereu um grande empenhamento por parte das Instituições, na tentativa de motivar e convencer muitos apicultores a ultrapassar a sua predisposição para abandonar a cooperação que tinha sido iniciada com a resposta aos questionários. Uma das soluções que se veio a mostrar de extrema utilidade neste domínio, foi o compromisso de enviar - a todos os apicultores participantes neste rastreo - os resultados dos testes de campo efetuados às suas colónias. Este compromisso das Instituições para com os apicultores cooperantes (extra-protocolar, mas com o conhecimento e aprovação da FNAP) foi célere e integralmente cumprido, o que viria a agradar a muitos apicultores que contactaram as Instituições, maioritariamente no sentido de pedir esclarecimentos sobre o significado dos resultados dos testes laboratoriais e/ou ajuda sobre a identificação de alternativas de combate a esta patologia.



Figura 1. Pormenor da colheita de amostras



Figura 2. Recolha de abelhas adultas

4 Estudo da distribuição da Nosemose

4.1 Pesquisa preliminar de Nosema por técnicas de Microscopia Ótica

Esta componente de rastreio foi concluída, com sucesso, entre o período de 2011 a 2012 sem desvios cronológicos ou substantivos, relativamente à situação de projeto.

Globalmente, o número de análises efetuadas respeitou o compromisso assumido com a Instituição financiadora desta ação.

4.1.1 Introdução

As técnicas laboratoriais para o diagnóstico de patologias apícolas (nomeadamente, da Nosemose), são metodologias baseadas na microscopia ótica que recorrem a um método qualitativo simples recomendado no Manual da Organização

Mundial de Saúde Animal sobre Animais Terrestres (Cantwell, 1970; OIE, 2008), adotadas pelo Laboratório Nacional de Referência em Patologia Apícola (LNIV) e universalmente utilizadas para este fim. Contudo, estas metodologias não permitem a identificação da(s) espécie(s) de agentes etiológicos causadores de doença, pelo que, serão complementadas pela avaliação molecular de amostras.

4.1.2 Material e métodos

A metodologia adotada incidiu na escolha das amostras (obreiras adultas iniciadas na atividade de campo) para os testes laboratoriais com base na análise dos resultados das entrevistas, selecionando apiários a mostrar que refletissem dois tipos de suspeita: apiários sem Nosemose vs. apiários com Nosemose (tentando-se aproximar uma proporção alvo de 1:3, respetivamente). As amostras recolhidas por cada uma das equipas foram registadas, etiquetadas, conservadas no próprio dia da colheita, segundo protocolo único adotado pelos parceiros. Foram mantidas refrigeradas até serem posteriormente enviadas ao laboratório de patologia Apícola da ESAB (caso tenham sido recolhidas pela ESAB ou pela UTAD) ou ao LNIV (caso tenham sido recolhidas pela UÉvora), entidades responsáveis pela avaliação por microscopia ótica.

O fundamento desta metodologia consiste na determinação da presença e/ou ausência do agente etiológico. Basicamente são utilizadas amostras compreendendo não menos de 60 obreiras (recolhidas à entrada da colmeia). Os abdómens são macerados num almofariz com 10 ml de água destilada, sendo seguidamente uma gota dessa suspensão observada por microscopia ótica de campo claro ou contraste de fase (400x). Os esporos destacam-

se como corpúsculos ovoides, refrigerantes, brilhantes e envolvidos por uma membrana escura e são quantificados utilizando uma câmara de Neubauer.



Figura 3. Amostra de abelhas adultas *Figura 4. Manipulação de uma amostra*

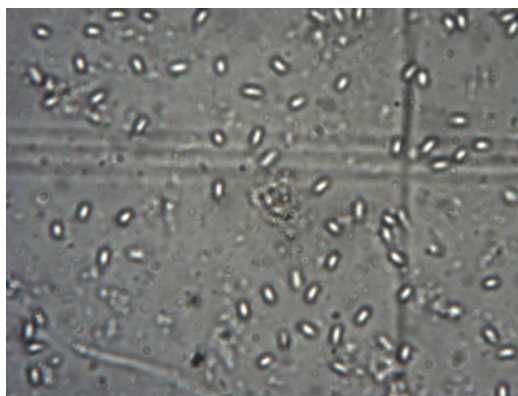


Figura 5. Esporos do Nosema spp. observados ao microscópio

4.1.3 Resultados obtidos por Microscopia

No quadro XXII são apresentados os resultados obtidos após avaliação microscópica das amostras recolhidas em cada um dos períodos de amostragem, por instituição e por distrito. Da sua análise depreende-se que em todos os distritos do nosso país (continente) foram detetadas amostras com resultados positivos, isto é, nas quais foi identificada a presença de esporos de *Nosema* spp. Pode-se constatar, também, que relativamente ao primeiro período de recolha de amostras é no distrito de Faro que existe o mais baixo valor de prevalência do agente patogénico (14%). Contrariamente, o valor mais elevado de prevalência, encontra-se no distrito de Aveiro e representa 89% do total de amostras recolhidas neste distrito. Relativamente, ao segundo período de amostragem, pode-se evidenciar, o facto de na maioria dos distritos, ter sido detetado um número crescente de amostras com resultados positivos. Este facto pode ser facilmente comprovado pela constatação de que, em termos médios, 45% das amostras e respetivos apiários apresentaram esporos de *Nosema*, no período de recolha correspondente a 2011. Acresce ainda que em 2012 este valor aumentou para 63%.0 que nos permite corroborar os resultados oficiais comprovados anteriormente pelos laboratórios oficiais e sugerir que em Portugal continental, a prevalência de *Nosema* é, aparentemente, elevada.

Quadro XXII. Avaliação microscópica por Instituição e distrito

Distritos	1ª RECOLHA			2ª RECOLHA		
	Nº total amostras	Nº de amostras positivas	% Positivas	Nº total amostras	Nº de amostras Positivas	% Positivas
IPB						
Bragança	16	8	50%	15	8	53%
Castelo Branco	14	7	50%	14	8	57%
Guarda	9	5	56%	9	7	78%
Vila Real	13	8	62%	13	10	77%
Viseu	13	9	69%	13	7	54%
UTAD						
Aveiro	9	8	89%	8	7	88%
Braga	12	2	17%	12	7	58%
Coimbra	14	5	36%	13	11	85%
Leiria	13	5	38%	14	7	50%
Lisboa	16	7	44%	17	4	24%
Porto	14	11	79%	14	12	86%
Santarém	16	4	25%	12	9	75%
Viana do Castelo	13	6	46%	12	10	83%
UÉVORA						
Beja	23	9	39%	21	10	48%
Évora	21	10	48%	22	8	36%
Faro	21	3	14%	23	11	48%
Portalegre	23	12	52%	20	12	60%
Setúbal	17	7	41%	22	15	68%
Média Total	15	7	45%	15	9	63%

Quadro XXIII. Avaliação do nível de infeção por Instituição e distrito

Distritos	1ª RECOLHA		2ª RECOLHA	
	Nº de amostras positivas	Nº esporos/abelha (milhões)	Nº de amostras positivas	Nº esporos/abelha (milhões)
IPB				
Bragança	8	0,326	8	2,497
Castelo Branco	7	2,100	8	0,921
Guarda	5	0,858	7	0,179
Vila Real	8	0,385	10	0,765
Viseu	9	1,400	7	0,848
UTAD				
Aveiro	8	1,770	7	0,143
Braga	2	0,371	7	0,238
Coimbra	5	0,847	11	0,320
Leiria	5	1,101	7	0,724
Lisboa	7	0,844	4	0,717
Porto	11	3,261	12	0,465
Santarém	4	0,233	9	1,4
Viana do Castelo	6	1,000	10	0,437
UÉVORA				
Beja	9	0,225	10	0,017
Évora	10	0,577	8	0,533
Faro	3	0,281	11	0,125
Portalegre	12	0,328	12	0,250
Setúbal	7	0,196	15	0,017
Média Total	48%	892.701,87	63%	590.387,16

Os níveis médios de infeção do *Nosema* presente nos apiários amostrados por distrito relativamente à percentagem de casos positivos comprovados laboratorialmente, apresentam-se no quadro XXIII. É relevante destacar, que o nível de infeção encontrado nas amostras recolhidas no primeiro período de rastreio é, aparentemente elevado (o nível de infeção mais elevado correspondeu a cerca de 2 milhões de esporos/abelha encontrados nos apiários localizados no distrito de Castelo Branco) e muito variável. Obviamente, relacionando o número de amostras positivas obtidas entre os dois períodos de amostragem com o nível de infeção médio, alcançam-se valores globais consideravelmente inferiores mas preocupantes por

refletiram um aumento de incidência de nosemose face ao total de colónias re-amostradas.

4.2 Avaliação molecular das espécies de *Nosema* por PCR.

Esta tarefa incluiu duas vertentes, por um lado levar a cabo a identificação da (ou das) espécie(s) de *Nosema* e por outro procurar identificar variantes genéticas, identificáveis pela análise da sequência de um fragmento de um gene com objetivo de eventualmente encontrar uma associação entre esta e a prevalência ou mesmo virulência manifestada pelo número de esporos contados.

A primeira parte decorreu em consonância e em sequência com a avaliação microscópica uma vez que utilizava o material biológico proveniente da análise microscópica, encontrando-se concluída. A segunda parte decorreu com imprevistos que originaram atraso os quais serão explanados no decurso deste relatório.

4.2.1 Introdução

A nosemose não é uma patologia recente em Portugal, nem tão pouco confinada a uma qualquer região. O seu agente etiológico, o microsporídeo *N. apis*, estava bem caracterizado e a sintomatologia era conhecida, não provocando danos de monta nas colónias afetadas. A infeção da abelha europeia por uma nova espécie de *Nosema*, característica da abelha asiática, que se crê ter sido recente, veio alterar este panorama. Trata-se da espécie *N. ceranae* que, do pouco que se conhece, parece apresentar características epidemiológicas bastante diferentes e muito mais gravosas, do que as provocadas pelo *N. apis*. É de destacar o facto de ter sido associada ao recente fenómeno do despovoamento de colónias que já dizimou milhares de colónias em todo o mundo. Este fenómeno por si só justifica a importância/necessidade de não se limitar o diagnóstico laboratorial à deteção dos esporos característicos deste género, mas proceder-se também à identificação da(s) espécie(s) presentes. Por outro lado, apesar da microscopia ótica ser uma metodologia expedita e pouco onerosa, aparentemente, parece apresentar uma sensibilidade menor, comparativamente aos métodos baseados na reação anticorpo antigénio e às que assentam na técnica da PCR, que, por sua vez, implicam maiores custos e requerem equipamento específico.

Adicionalmente, como não foi possível implementar a avaliação imunológica (por questões técnicas que transcendem o domínio do presente projeto), optou-se por ampliar o estudo da avaliação molecular a todas as amostras recolhidas. Desta forma foi possível colmatar o imprevisto referido e garantir o cumprimento dos objetivos estipulados.

4.2.2 Material e métodos

A amostragem incidiu sobre apiários localizados em 224 freguesias de 148 concelhos pertencentes aos 18 distritos de Portugal continental. O número de amostras recolhidas em ambos os anos apenas diferiu ligeiramente (277 e 274 respetivamente). O material biológico, que serviu de base à análise microscópica foi posteriormente enviado para o Laboratório Apícola da UTAD. Numa primeira fase procedeu-se à extração de ADN, a que se seguiu a amplificação pela PCR e eletroforese de um fragmento do gene rRNA, diferenciador das espécies de *Nosema* alvo. O método seguido foi, na sua essência, o indicado pela OIE (2008). Resumidamente, este método assenta numa reação multiplex que usa dois pares de 'primers' simultaneamente. Um par específico para o *N. apis* e um outro para o *N. ceranae*. Adicionalmente optou-se por incluir na mesma reação a amplificação um fragmento de ADN de abelha, com o propósito de minimizar a possibilidade de ocorrência de falsos resultados negativos (resultantes de uma eventual falha na extração de ADN ou da própria PCR). De forma prévia testou-se a metodologia e procedeu-se à sua otimização da antes de dar início à análise das amostras do presente estudo.

No que diz respeito à pesquisa de eventuais haplótipos de *N. ceranae*, não existe nenhuma diretriz específica por parte de qualquer organismo. Por conseguinte foi realizada uma pesquisa bibliográfica para enquadrar a opção elegida. O genoma do microsporídeo *Nosema* encontra-se já sequenciado, contudo não foi ainda anotado, ou seja não foram delimitados e identificados os respetivos genes que o constituem. Em bibliografia consultada sobre este tema no ano transato, verificou-se que o único gene que foi devidamente caracterizado era o gene rRNA, no qual assentavam todos os trabalhos consultados sobre esta temática (HUANG et al., 2008; CHEN e HUANG, 2009; CHEN et al., 2010). Formularam-se duas abordagens alternativas: proceder à sequenciação do fragmento utilizado na etapa anterior ou desenvolver uma metodologia inédita. A primeira alternativa tinha a desvantagem de obter

pouca informação, uma vez que, o fragmento amplificado é de 225pb. A segunda, o desenvolvimento de metodologia inédita que tem como desvantagem uma menor possibilidade de comparação de resultados. Assim optou-se por manter a região IGS do gene rRNA como alvo e desenharam-se *primers*, para amplificar um fragmento de aproximadamente 600 pb, da qual existe informação relevante nas bases de dados públicas da especialidade. Esta decisão foi suportada pela circunstância de ser possível obter uma maior informação discriminante com o mesmo custo. De facto, o custo associado à amplificação e sequenciação é idêntico até ao tamanho de 1000 pb (contudo a qualidade da sequência a partir dos 600 pb diminui). Em rigor, devemos salientar contudo que pela leitura dos trabalhos publicados depreendia-se que este gene podia apresentar cópias em múltiplas variantes num mesmo esporo, o que representaria uma dificuldade na interpretação dos cromatogramas de sequenciação. Acresce a este facto que as amostras utilizadas neste estudo consistiram em macerado de várias abelhas, podendo, portanto, ocorrer coinfeção de várias estirpes (haplótipos) de *N. ceranae*, o que agravaria a dificuldade de interpretação dos resultados. Nessa altura não se afigurou disponível outra alternativa e por conseguinte avançou-se com a sequenciação do fragmento de cerca de 600 pb deste gene de 10 amostras como prospeção. Como se explanará adiante confirmou-se o que se suspeitava o que obrigou a abandonar este gene e procurar alternativa. Fizemos nova pesquisa tendo-se identificado um trabalho recente (HATJINA et al., 2011), onde era descrito um estudo sobre o polimorfismo de um gene de uma proteína do tubo polar do *N. ceranae*, estrutura esta usada pelo agente para transladar o conteúdo do esporo para o interior da célula alvo. Por conseguinte, pareceu-nos tratar-se de um gene muito adequado ao objetivo deste trabalho que era o de verificar se haveria alguma relação entre eventuais haplótipos genéticos e a contagem de esporos nas respetivas amostras. O referido trabalho apresentava os resultados da sequência da totalidade do gene para várias amostras referindo a existência de polimorfismos. Contudo esta abordagem era economicamente incomportável para o âmbito deste trabalho, tendo-se optado por desenhar *primers* que amplificassem apenas um fragmento de aproximadamente 600 pb. Após uma primeira tentativa em que obtivemos bons resultados para a amplificação, seguiu-se um período longo de ausência de resultados que nos levou a testar vários fatores, provocando um atraso significativo nesta tarefa. No final conclui-se que houve um lote de Taq polimerase (enzima usada na amplificação) que não se encontraria em boas condições. Ultrapassada esta

fase, foram selecionadas 36 amostras para o ano 2011/2012 e 36 para o ano 2012/2013, considerando os seguintes critérios:

1. Distribuição geográfica - 2 amostras por distrito,
2. Carga de esporos observada - uma com a carga mais elevada e outra com baixa carga, para cada distrito.

Nas Quadros XXIV e XXV são descritas as amostras selecionadas. As sequências obtidas foram posteriormente alvo de alinhamento no programa MEGA5.2, para por evidência eventuais polimorfismos.

Quadro XXIV Erro! Marcador não definido. – Distribuição das amostras para a sequenciação relativas ao ano 2011/2012

Amostra nº	Distrito	Concelho
IPB 021 /11	Bragança	Macedo de Cavaleiros
IPB 057 /11	Bragança	Vila Flor
IPB 085 /11	Castelo Branco	Vila Velha de Ródão
IPB 088 /11 A	Castelo Branco	Penamacor
IPB 093 /11	Guarda	Almeida
IPB 102 /11	Guarda	Guarda
IPB 123 /11	Vila Real	Chaves
IPB 132 /11	Vila Real	Ribeira de Pena
IPB 144 /11 A	Viseu	Castro Daire
IPB 148 /11 B	Viseu	Castro Daire
UE 021/11	Portalegre	Castelo de Vide
UE 035/11	Portalegre	Nisa
UE 064/11	Évora	Portel
UE 090B/11	Beja	Moura
UE 118/11	Faro	Vila do Bispo
UE 129/11	Évora	Mora
UE 183/11	Setúbal	Grândola
UE 190/11	Faro	Castro Marim
UE 206/11	Beja	Odemira
UE 211B/11	Setúbal	Santiago do Cacém
UTAD 005/11	Lisboa	Torres Vedras
UTAD 016/11	Leiria	Figueiró dos Vinhos
UTAD 027/11	Lisboa	Azambuja
UTAD 030/11	Santarém	Santarém
UTAD 034/11	Braga	Cabeiras de Basto
UTAD 036/11	Braga	Cabeiras de Basto
UTAD 053/11	Leiria	Pombal
UTAD 057/11	Viana do Castelo	Valença
UTAD 060/11	Viana do Castelo	Vila N. Cerveira
UTAD 066/11	Santarém	Constância
UTAD 078/11	Coimbra	Montemor-o-Velho
UTAD 079/11	Aveiro	Ílhavo

UTAD 081/11	Aveiro	Vale de Cambra
UTAD 083/11	Coimbra	Cantanhede
UTAD 099/11	Porto	Matosinhos
UTAD 107/11	Porto	Vila Nova de Famalicão

Quadro XXV – Distribuição das amostras para a sequenciação relativas ao ano 2012/2013

Amostra nº	Distrito	Concelho
IPB 1 B/12	Bragança	Alfândega
IPB 57 B/12	Bragança	Vila Flor
IPB 80 B/12	Castelo Branco	Fundão
IPB 88 B/12 C	Castelo Branco	Penamacor
IPB 100 B/12	Guarda	Guarda
IPB 95 B/12	Guarda	Figueira Castelo Rodrigo
IPB 125 B/12	Vila Real	Valpaços
IPB 134 B/12 C	Vila Real	Ribeira de Pena
IPB 144 B/12	Viseu	Castro Daire
IPB 167 B/12	Viseu	Viseu
UE 95/12	Beja	Castro Verde
UE 203A/12	Beja	Ourique
UE 179/12	Évora	Montemor-o-Novo
UE 145/12	Évora	Portel
UE 117/12	Faro	Olhão
UE 125B/12	Faro	Tavira
UE 21/12	Portalegre	Castelo de Vide
UE 35/12	Portalegre	Nisa
UE 183C/12	Setúbal	Grândola
UE 146B/12	Setúbal	Sesimbra
UTAD 91/12	Aveiro	Ovar
UTAD 92/12	Aveiro	Estarreja
UTAD 37/12	Braga	Terras de Bouro
UTAD 34/12	Braga	Cabeceiras de Basto
UTAD 77/12	Coimbra	Montemor-o-Velho
UTAD 84/12	Coimbra	Montemor-o-Velho
UTAD 16/12	Leiria	Figueiró dos Vinhos
UTAD 48/12	Leiria	Alcobaça
UTAD 26/12	Lisboa	Azambuja
UTAD 3/12	Lisboa	Cadaval
UTAD 94/12	Porto	Gaia
UTAD 97/12	Porto	Felgueiras
UTAD 68/12	Santarém	Ferreira do Zêzere
UTAD 30/12	Santarém	Santarém
UTAD 42/12	Viana do Castelo	Ponte da Barca
UTAD 45/12	Viana do Castelo	Ponte de Lima

4.2.3 Resultados

A tarefa de identificação da espécie de *Nosema* decorreu com sucesso. Apesar de ter havido necessidade de repetir várias amostras por falha de amplificação ou porque a banda controlo não se apresentou com intensidade suficiente.

Na figura 6 apresenta-se um exemplo de uma imagem de um gel de agarose corado com brometo de etídeo, onde é possível observar 9 amostras positivas ao *Nosema ceranae* num total de 24.

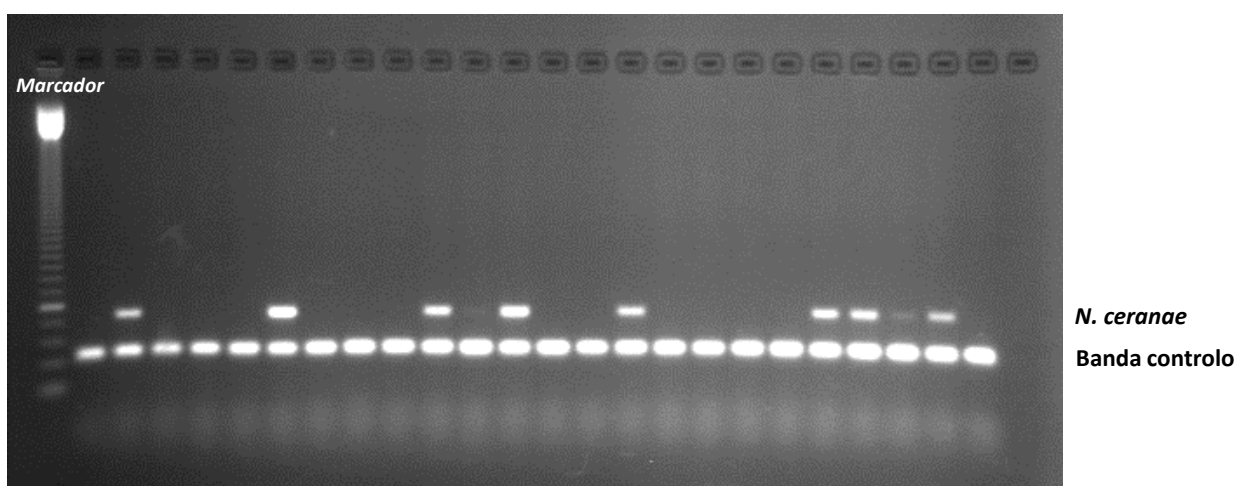


Figura 6. Exemplo de um gel obtido na avaliação molecular na UTAD

No Quadro XXVI apresentam-se os resultados da avaliação molecular efetuada ao total de amostras recolhidas por distrito e por instituição no primeiro período de amostragem. Estes resultados corroboram, a avaliação realizada previamente por técnicas de microscopia ótica, complementando-a, ao identificar a espécie de *Nosema* presente nas amostras analisadas. Podemos destacar o facto de ter sido apenas identificada a espécie *N. ceranae*. O que nos permite sugerir que em Portugal continental, esta é, atualmente, a única espécie causadora de Nosemose.

Contudo, surpreendendo o facto do *N. apis* não ter sido detetado em nenhuma das amostras analisadas, foi solicitado ao Centro Apícola de Marchamalo que fizesse a gentileza de nos enviar amostras positivas desta espécie. A análise posterior destas amostras confirmou a sua positividade aquela espécie ficando excluída, portanto, a suspeita de uma eventual falha de metodologia executada.

È de referir que, embora tenham sido aplicadas diferentes metodologias laboratoriais, os resultados são globalmente semelhantes. Todavia, verificaram-se algumas divergências nos resultados obtidos. Salvo raras exceções, as amostras que apresentavam resultados divergentes apresentavam, também, um baixo número de esporos por amostra. Este facto torna compreensível que o resultado seja menos reproduzível devido ao efeito da aleatoriedade de subamostragem, razão pela qual, este aspeto, não deve ser sobrevalorizado.

Quadro XXIV. Avaliação molecular por Instituição e distrito

Distritos	Nº de amostras	Positivas <i>N. ceranae</i>	%Positivas <i>N. ceranae</i>
IPB			
Bragança	16	10	63 %
Castelo Branco	14	7	50 %
Guarda	9	6	67 %
Vila Real	13	9	69 %
Viseu	13	5	38 %
UTAD			
Aveiro	9	8	89 %
Braga	12	4	33 %
Coimbra	14	7	50 %
Leiria	13	9	69 %
Lisboa	16	6	38 %
Porto	14	12	86 %
Santarém	16	7	44 %
Viana do Castelo	13	6	46 %
UÉVORA			
Beja	23	11	48 %
Évora	21	11	52 %
Faro	21	4	19 %
Portalegre	23	14	61 %
Setúbal	17	5	29 %
Média Total	15	8	51 %

No quadro XXVII são apresentados os resultados obtidos na avaliação molecular, por instituição e por distrito, relativos ao segundo período de estudo (re-amostragem efetuada no ano de 2012).

Quadro XXV. Avaliação molecular por Instituição e distrito

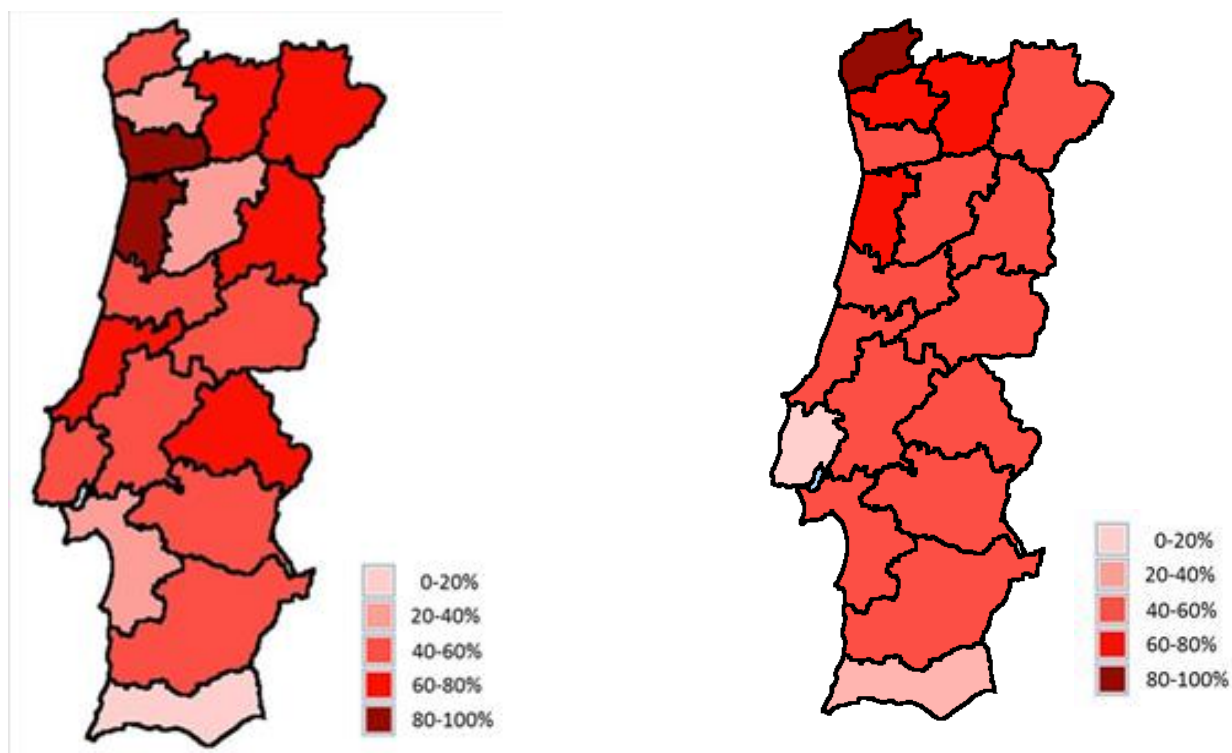
Distritos	Nº de amostras	Positivas <i>N. ceranae</i>	% Positivas <i>N. ceranae</i>
IPB			
Bragança	15	8	53%
Castelo Branco	14	8	57%
Guarda	9	5	56%
Vila Real	13	8	62%
Viseu	13	6	46%
UTAD			
Aveiro	8	5	63%
Braga	12	8	67%
Coimbra	13	6	46%
Leiria	14	5	36%
Lisboa	17	2	12%
Porto	14	6	43%
Santarém	12	9	75%
Viana do Castelo	12	10	83%
UÉVORA			
Beja	21	11	52%
Évora	22	11	50%
Faro	23	8	35%
Portalegre	20	11	40%
Setúbal	22	11	50%
Média global	15	8	51%

Da análise do quadro XXVII destaca-se o facto de também neste segundo ano de estudo, ter sido apenas identificada a espécie *N. ceranae*. Este dado corrobora os estudos realizados noutros países que apontaram no sentido do *N. ceranae* ter, por mecanismo ainda não esclarecido, deslocado ou substituído o *N. apis*. Verifica-se também que o *N. ceranae* foi detetado em apiários de todos os distritos de Portugal Continental confirmando a sua elevada capacidade de adaptação às diferentes condições geográficas e climáticas.

Os resultados médios da identificação da espécie de nosema obtidos neste ano foram semelhantes aos do ano anterior, ou seja, cerca de 50% de amostras positivas. Observou-se, contudo, algumas alterações nos valores extremos. O distrito

de Lisboa e Faro foram os que apresentaram menores valores de prevalência, com 12% 34%, respetivamente. Por outro lado Santarém e Viana do Castelo foram os que apresentaram os maiores valores, ou seja 75% e 83% de apiários positivos, respetivamente.

Para melhor visualização de como se distribui geograficamente a prevalência do *N. ceranae* e a comparação dos resultados entre ambos os períodos, representou-se, na figura 7, essa informação, dispondo por gradação de cor, os correspondentes intervalos de prevalência. Da sua análise, aparentemente não parece ser possível vislumbrar qualquer padrão geográfico de distribuição, numa lógica norte/sul ou interior/litoral, como na comparação de zonas com diferente altitude.



Ano 2011/2012

Ano 2012/2013

Figura 7. Distribuição do microsporídeo N. ceranae, por classes de prevalência e distrito.

4.2.3.1 Resultados obtidos pela sequenciação

Os resultados da sequenciação na região IGS do gene rRNA (cerca de 600 pb) em 10 amostras de prospeção confirmaram um polimorfismo elevado. Contudo, a qualidade dos cromatogramas foi baixa devido provavelmente à presença de mais que um variante genética do *N. ceranae* em cada amostra, o que tornou a leitura da sequência muito subjetiva e por conseguinte pouco precisa. Para ilustrar o que acabamos de referir assinalamos as posições 154, 158, 167, 193 na Figura 8, as quais apresentaram praticamente igual intensidade para as bases “T” e “A” o que inviabiliza uma leitura credível, atendendo que este fenómeno foi frequente ao longo de todo o cronograma.

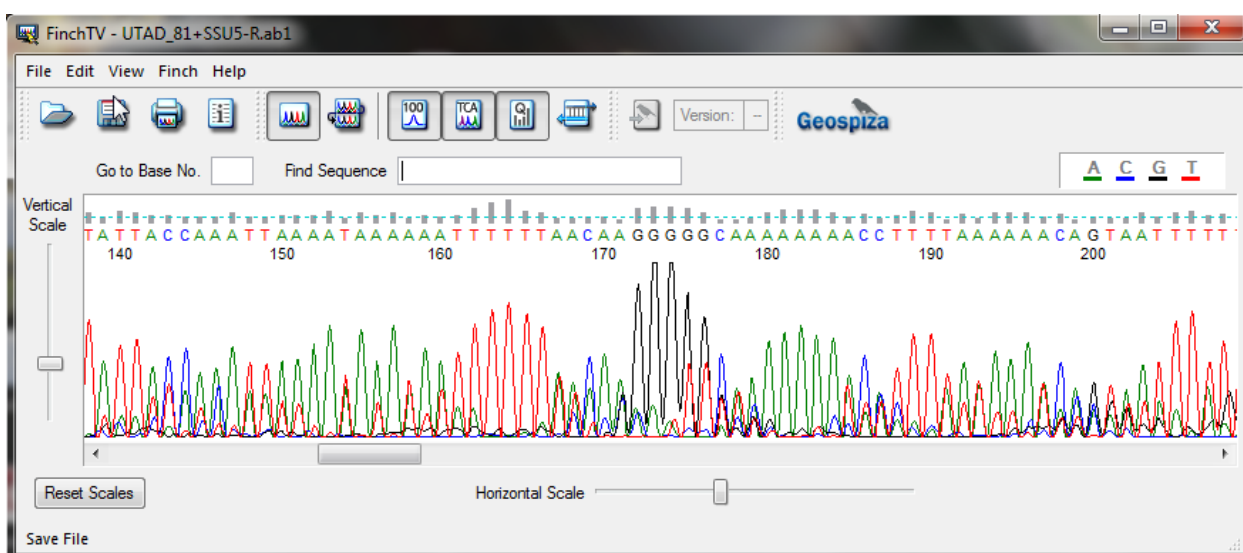


Figura 8 Cromatograma de uma amostra para um fragmento da região IGS do gene rRNA do microsporídeo *N. ceranae*

Perante esta dificuldade, tentou-se reproduzir a informação apresentada num trabalho recente (HATJINA et al., 2011). Estes autores descreveram o polimorfismo de um gene de uma proteína do tubo polar do *N. ceranae*. Atendendo ao papel desta estrutura na patologia deste microsporídeo pareceu interessante o seu estudo. À semelhança do gene anterior foram desenhados *primers* para amplificar um fragmento de aproximadamente 600 pb.

Das 72 amostras selecionadas para sequenciar, não foi possível obter resultados em 15, mesmo após repetição. As restantes apresentaram cromatogramas com elevada qualidade, como pode ser observado na Figura 9 na qual é patente uma ótima definição dos picos e uma linha base residual.

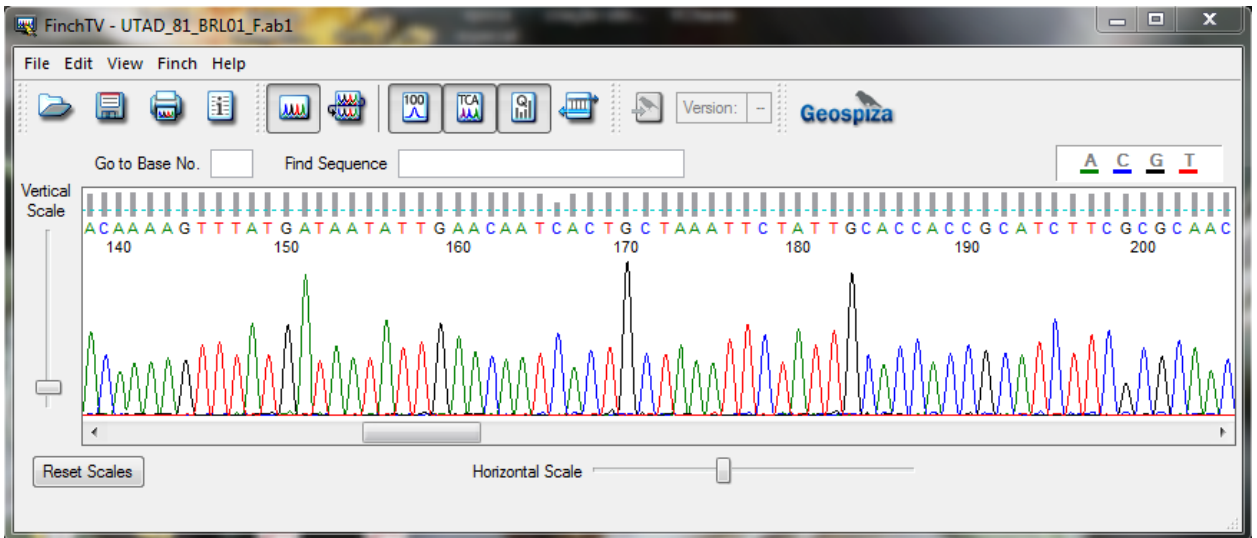


Figura 9 Cromatograma de uma amostra para um fragmento do gene da proteína do tubo polar do microsporídeo *N. ceranae*.

Na figura 10 apresenta-se uma parte ilustrativa do alinhamento das sequências no programa MEGA5, na qual é patente a ausência de polimorfismo, o que inviabilizou o estabelecimento de qualquer relação com o conteúdo de esporos das amostras.

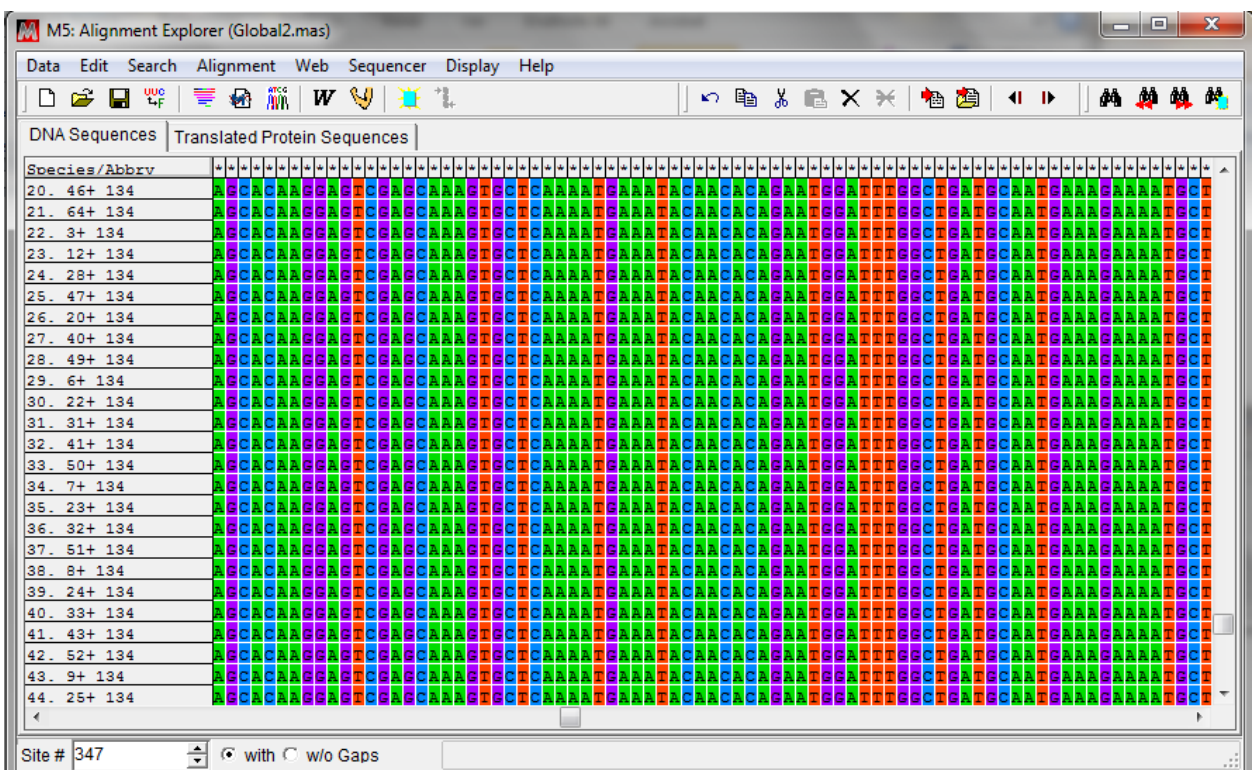


Figura 10 Exemplo ilustrativo do alinhamento de sequências do gene que codifica para uma proteína do tubo polar do *N. ceranae*.

5 Conviver com a Nosemose

5.1 Avaliação da eficácia de campo de dois produtos comercialmente disponíveis em Portugal para mitigação de impacto do *Nosema ceranae*

5.1.1 Introdução

Duas espécies de um fungo microsporídea altamente especializadas, o *Nosema apis* (Na) e o *Nosema ceranae* (Nc), têm sido repetidamente identificados em colónias de abelhas nas mais variadas geografias do planeta. Em Portugal, este projeto demonstrou que só a última espécie de *Nosema* deverá atualmente ser uma preocupação para a apicultura nacional.

Ambas as espécies invadem o epitélio ventricular (células de revestimento do principal órgão com função digestiva) de abelhas adultas, onde se multiplicam rapidamente, 'entupindo' as células 'parasitadas' com esporos e impedindo a sua capacidade funcional normal. Quando as células hospedeiras são destruídas e sofrem rotura, os esporos são vertidos para o lúmen intestinal e posteriormente excretados pelas obreiras afetadas. Se os esporos excretados vierem a ser ingeridos por outras obreiras, por exemplo durante as suas atividades de limpeza na colónia, poderão germinar no sistema digestivo, 'infetarem' uma nova célula epitelial ventricular e iniciar um novo ciclo de 'infeção' e multiplicação.

Apesar de o seu impacto específico sobre as colónias não estar ainda suficientemente determinado, o *N. ceranae* tem sido associado ao aumento de perdas anuais de colónias também na Europa, independentemente do papel determinante que um insuficiente controlo de *Varroa* ou decisões/maneios inadequados possam também ter. De facto, não raramente se considera que o *N. ceranae* é a 'gota de stress' final para a morte de colónias já debilitadas por outros motivos. Independentemente das vias de atuação e da contribuição relativa que tem na mortalidade/morbilidade das colónias, o *Nosema* tenderá a reduzir consideravelmente a produção de mel (e outras produções apícolas).

Em várias partes do mundo, o *N. ceranae* tendo vindo a ser frequentemente "controlado" pela aplicação de fumagilina. Até recentemente (2012), esta substância vinha sendo utilizada com resultados favoráveis nalguns países da Europa (por exemplo, no Reino Unido), sendo a única oficialmente aprovada para combater o *Nosema* (*apis* e *ceranae*).

Todavia, relatos fundamentados de possíveis efeitos tóxicos deste agente sobre o compartimento genético levaram à proibição da sua utilização no contexto da União Europeia e sublinharam a conveniência em se encontrar modos alternativos (incluindo alguns agentes 'terapêuticos' ou 'paliativos') que permitam uma mais fácil convivência com a noseemose.

5.1.2 Objetivos

O objetivo definido para esta tarefa do projeto foi o de avaliar preliminarmente, no contexto específico da apicultura nacional, algumas das poucas 'alternativas' atualmente disponíveis para mitigar o impacto da nosemose.

Identificaram-se então, como possibilidades que poderiam ajudar a reduzir o nível de presença de Nosema nas colónias e nas circunstâncias nacionais, dois produtos comercialmente disponíveis no país: - o VitaFeedGold (<http://www.vita-europe.com/products/vita-feed-gold/>) e o ApiHerb (http://www.chemicals-laif.it/page/02_prod_dett.asp?sottogru=NUT&Cod_prod=06AG). Estes dois produtos foram assim testados com vista a determinar as suas eficácias de campo no contexto apícola nacional, como potenciais 'tratamentos químicos alternativos' para o controle de infeções por Nc em abelhas melíferas.

5.1.3. Materiais e Métodos

Contrariamente à abordagem proposta na fase de candidatura do projeto, e em consequência das sucessivas reduções orçamentais que foram sendo impostas, esta tarefa foi apenas implementada pela UÉvora, em três apiários de teste (localizados em Nisa, Évora e Cabanas) em que foi previamente diagnosticada a presença de Nc por métodos moleculares.

O ensaio foi efetuado durante o inverno do corrente ano, utilizando-se 44 colónias, em estado de desenvolvimento semelhante, que tinham sido criadas na primavera de 2012 e pela última vez tratadas com acaricidas homologados no Outono de 2012. Em cada apiário, as colónias tinham rainhas de idade e origem semelhantes. Não lhe foram diagnosticadas, nas breves inspeções iniciais/finais (dada as baixas temperaturas observadas durante o período invernal em que decorreu o ensaio) a que foram submetidas, doenças (micose, loques americana / europeia, Varroa) ou padrões anormais de disposição/tipo de criação. As colónias foram testadas em colmeias de modelo reversível (Nisa) ou Langstroth (Évora e Cabanas), marcadas com numeração indicativa do número único de colónia, de apiário e de grupo de tratamento experimental a que pertenciam. Os níveis de Nc encontrados nas colónias, bem como a evolução destas em termos de dinâmica populacional, foram inicialmente avaliados quantitativamente, continuando a ser monitorizados quantitativamente durante todo o ensaio. Em cada apiário, as colónias foram aleatoriamente afetadas a 4 grupos experimentais:

1. sem tratamento (controlo negativo, 10 colónias);
2. tratamento com sacarose (em substituição do controlo positivo inicialmente previsto, a fumagilina, mas cujo uso foi entretanto interdito, 10 colónias);
3. tratamento com VitaFeedGold (12 colónias);
4. tratamento com ApiHerb (12 colónias).

Todos os tratamentos foram efetuados de acordo com os termos de aplicação definidos pelos respetivos fabricantes, no caso do VitaFeedGold, tendo-se optado por aplicações diretas do produto sobre os quadros das colónias com ele tratadas.

A população adulta das colónias foi sucessivamente sendo comparada (pelo número de espaços entre quadros ocupados com abelhas) durante o ensaio e de modo sincronizado com a recolha de cerca de 30 obreiras adultas de cada uma das colónias.

Posteriormente, estas foram eutanaziadas, conservadas e enviadas para o laboratório de sanidade apícola da ESAB, onde estão presentemente a ser avaliadas para determinação dos níveis individuais de infeção com esporos de Nc. A quantidade de esporos presente em cada uma das cerca de 4000 obreiras a estudar individualmente está a ser efetuada por microscopia ótica.

A informação de campo foi recolhida sem desvios face ao que estava planeado. Está presentemente sistematizada em matriz única de dados que permitirá posteriormente (ie, quando toda a informação pertinente estiver disponível) a análise estatística da evolução dos níveis de infeção nas colónias experimentais (e desenvolvimento populacional destas). Adequada consideração será dada a possíveis interações destas variáveis com o tempo e o tratamento experimental aplicado.

O procedimento laboratorial para quantificação do número de esporos de Nc utiliza um método direto de observação (contagem em câmara de Neubauer) e a preparação das amostras (obreiras) segue o protocolo elaborado pelo laboratório de sanidade apícola da ESAB/AAPNM. Aguarda-se presentemente a conclusão da quantificação laboratorial das infeções com Nc (25 obreiras x 44 colónias x 4 observações). Sabia-se a anteriori que seria um processo demorado, mas exequível na janela temporal do projeto. Prevê-se a conclusão deste processo antes da data efetiva da conclusão do projeto (Setembro 2013), sendo então possível avaliar e relatar a eficácia de campo dos dois tratamentos alternativos testados (VitaFeedGold e ApiHerb).

Dependendo da distribuição (ainda desconhecida) dos dados finais originados na quantificação de esporos, poderá ou não haver a necessidade de se tentar encontrar uma 'transformação' dos dados, de modo a se cumprir o pressuposto de normalidade de distribuição associado a métodos estatísticos paramétricos. Assumindo, nesta fase, que este tipo de ferramentas estatísticas poderá ser de razoável adoção neste estudo, antecipa-se que a testagem das principais 'hipóteses nulas' deste ensaio recorra a testes de análise de variância por medidas repetidas (vulgo MANOVA) e dependa maioritariamente no uso do pacote de software estatístico SPSS.

5.1.4. Resultados, Conclusões e Recomendações

O processo de avaliação individual de obreiras para determinação das cargas de esporos que albergam é, reconhecidamente, extremamente moroso. O Laboratório de Sanidade Apícola da ESAB está a trabalhar neste compartimento do projeto à cerca de dois meses, tendo já processado cerca de 60% do volume total das amostras (incluindo todas as obreiras recolhidas nos momentos inicial e final do ensaio de campo, conforme informação sistematizada em anexo). Assim sendo, o trabalho neste segmento do projeto prossegue sem atrasos, mas, como desde o início se previa, só estará concluído na segunda metade do próximo mês de Agosto. Assim, serão apenas

disponibilizados os elementos pertinentes para esta secção quando for possível integrar toda a informação deste ensaio num único ficheiro. Como inicialmente previsto, tal deverá ocorrer ainda durante o período de vida deste projeto (que prosseguirá até finais de Setembro próximo).

A informação de campo (dados e amostras) relativa ao ensaio de avaliação da eficácia de possíveis métodos de redução de impactos causados pela nosemose foi atempadamente recolhida, processada e está já sistematizada em base de dados (de modo a permitir a extração de resultados e seus significados). Todavia, o desenho experimental usado e as variáveis consideradas recomendam que se proceda apenas à análise estatística dos dados quando toda a informação pertinente tiver sido recolhida. Neste domínio, e sem desvios à calendarização inicialmente pré-estabelecida, aguarda-se ainda pela conclusão da quantificação laboratorial dos níveis de infeção individual (ie, de cada obreira) com esporos de *Nosema ceranae*. Este trabalho, que se sabia *a priori* ser um processo muito demorado (por implicar cerca de 4400 obreiras), será previsivelmente concluído durante a segunda metade de Agosto, pelo que os resultados deste compartimento do projeto serão conhecidos ainda durante a sua janela temporal de implementação.

5.1.5. Referências Bibliográficas

Serão disponibilizadas após conclusão do projeto (que prosseguirá até finais de Setembro próximo, como previamente acordado).

I I I - DIVULGAÇÃO DE RESULTADOS

As acções de demonstração e divulgação do projecto são, maioritariamente, da responsabilidade da FNAP, embora todos os parceiros estejam envolvidos. Tal decisão prende-se com a necessidade, identificada pelos parceiros, de tornar visível os resultados, na medida em que este está bastante orientado para a apresentação de soluções aplicáveis pelo sector apícola nacional numa perspectiva de curto/médio prazo.

Pretende-se assegurar que a comunidade apícola (mas também o grande público) acompanhe o desenrolar do projecto, ou seja, conheça os seus resultados, quer intermédios (os que agora se apresentam neste relatório), quer os finais, que apenas serão conhecidos no final do projecto. Os resultados finais, que consideramos os mais relevantes e significativos para o sector apícola nacional, serão concentrados no último ano de execução do projecto.

Materiais produzidos

A divulgação do projecto foi realizada através dos seguintes meios/materiais:

1. Internet
2. Imprensa
3. Participação em encontros técnicos de divulgação em apicultura (reuniões/jornadas/seminários/fóruns)
4. Folheto de divulgação

Para a comunicação de informação geral do projecto, foi criado no **site da FNAP**, uma página exclusivamente dedicada ao projecto (<http://www.fnap.pt/projectos.php?m=16>), onde são divulgados os objectivos, as actividades ou os resultados. A **newsletter electrónica da FNAP - NEWSFNAP**, meio de comunicação com grande penetração no universo dos operadores da fileira (apicultores, técnicos, comerciantes e outros) e que conta actualmente com cerca de 1.967 assinantes foi também utilizada para comunicar e divulgar o projecto.

Numa parceria com a empresa Publicações Directas e com o Semanário "SOL", a FNAP participou na concepção de uma revista **PAIS POSITIVO** distribuída com este jornal, dedicada ao tema à Apicultura nacional, tendo sido publicado um artigo de divulgação generalista.

Investigação em apicultura em Portugal Uma aposta da FNAP

A crescente concorrência no sector apícola europeu obriga a uma constante procura de soluções para aumentar a produtividade e a rentabilidade das explorações, mantendo os elevados parâmetros de qualidade actualmente exigidos pelos mercados. A FNAP aposta forte neste domínio, nomeadamente nas áreas da qualidade e segurança alimentar, diversificação das produções, da sanidade e do melhoramento genético do efectivo apícola, pois considera que progressos nestes domínios podem trazer ineqüívocas mais-valias para os apicultores nacionais. Assim, através de parcerias com os principais centros de investigação, a FNAP encontram-se actualmente a desenvolver seis projectos em áreas tão diferenciadas como o melhoramento genético da abelha autóctone, a padronização de Geleia Real e Pólen, ou a caracterização da Água-Mel.

PROGRAMA APÍCOLA NACIONAL

Regulamento (CE) n.º 1234/2007, do Conselho, de 22 de Outubro
Regulamento (CE) n.º 917/2004, da Comissão, de 29 de Abril

PROJETOS NACIONAIS ÁGUA-MEL

Caracterização qualitativa da água-mel para a sua valorização a nível nacional

Apesar da globalização, a indústria alimentar não deixa de estar interessada na redescoberta e na proteção de alimentos tradicionais. A produção de água-mel em Portugal, muito em especial na região sul, é já muito antiga, a maioria dos apicultores ainda há bem pouco tempo procedia ao seu fabrico, este subproduto do mel tem vindo a ser menos produzido com a inexistência de estudos que assegurem a sua segurança alimentar nos padrões atuais de exigências. É a partir dos restos de mel, pólen e própolis que ficam na cera de opérculos que se obtém a água-mel após fervura em água. Existem inúmeras formas de a produzir ainda não totalmente inventariadas, os apicultores produzem-na recorrendo a saberes ancestrais, por vezes sem conhecimentos adequados que proporcionem ao produto a duração desejada.

A água-mel é desde tempos remotos utilizada como alimento por exemplo ao pequeno-almoço, molhado o pão e adoçando leite ou chá, na confeitaria de doces e bolos, e muito recentemente a ser utilizada por chefes de cozinha para dar alguns toques de requinte a inúmeros pratos, está a ser descoberta por muitos turistas estrangeiros que depois de a provarem a adquirem em quantidades significativas para a levarem e divulgarem nos seus países de origem, também alguns apicultores estrangeiros que nos visitam ficam maravilhados com o seu gosto e tentam levar o conhecimento para eles próprios a fazerem.

Para além de produto alimentar a água-mel tem sido também usada no tratamento de algumas doenças menores (constipações, doenças das vias respiratórias, entre outras) pelas populações motivadas pela crença e saberes antigos que elevam a água-mel a um estatuto de predileção para a sua utilização na elaboração de preparados caseiros de eficácia popularmente comprovada. Apesar destas aplicações, estudos detalhados sobre as características físicas, químicas e biológicas são escassas ou mesmo nulas, ao contrário do mel. Para este produto existe já um padrão de normalidade cujos valores garantem a sua qualidade alimentar. Assim e em média, o mel tem um teor em humidade de 16-19%, teor em prótidos, ácidos, vitaminas aromas, pigmentos e sais minerais de 1 a 3,5%, e um teor em açúcares redutores de cerca de 70-79% distribuídos do seguinte modo: 38% de frutose, 31% de glucose, 75% de maltose e 1,5% de outros açúcares redutores; e um teor do açúcar não redutor sacarose de 1,5 a 5%.

OBJETIVOS DO PROJETO

Durante os três anos de execução deste projeto serão desenvolvidas várias atividades tendo em vista a caracterização da água-mel produzida pelos apicultores em Portugal. Dentro destas destacam-se: Inventariação e identificação dos produtores e da forma como atualmente é produzida.

Recolha de amostras dentro do espaço nacional, representativas da globalidade da produção nacional. Desenvolvimento de métodos mais modernos para, sem descaracterizar o produto, melhorar a sua qualidade.

Acompanhamento das várias fases de produção, aconselhando os apicultores tendo em vista a minimização de riscos de contaminação indesejada. Caracterização química da água-mel produzida.

Avaliação da qualidade microbiológica da água-mel.

Avaliação das propriedades biológicas atribuídas à água-mel, nomeadamente propriedades antimicrobianas, antivirais e antioxidantes.

Caracterização química e avaliação das propriedades biológicas das amostras recolhidas em intervalos de tempo pré-determinados, durante o processo de fabrico da água-mel.

Assim, e de forma sucinta, pretende-se com este projeto: Saber se há alterações que ocorrem durante o processo de fabrico da água-mel em termos químicos e consequentemente em termos de propriedades biológicas; Provar, de uma maneira científica, as propriedades biológicas e, consequentemente terapêuticas da água-mel.

Saber se ocorrem alterações químicas na água-mel e, consequentemente, alterações nas propriedades biológicas ao longo do seu armazenamento; Estabelecer uma norma de qualidade para a água-mel de origem portuguesa.

Divulgar os resultados para a comunidade apícola em geral, muito em particular a todos os apicultores participantes no projeto.

PARCEIROS



BIO-IMPACT

Impacto económico e fronteiras comerciais da apicultura em Modo de Produção Biológico em Portugal.

Harmonização dos procedimentos de certificação

A Apicultura Portuguesa é um dos sectores da agricultura que mais resistência e persistência tem demonstrado ao longo da última década. Nos últimos cinco anos os números revelam mesmo um comportamento em contra ciclo, com um aumento do número efetivo de colmeias, apiários e apicultores, elevando a capacidade produtiva anual para 12000 toneladas de mel, o equivalente a uma faturação de 31 milhões de euros.

Não se pode menosprezar que para além deste valor comercial direto há uma quantidade enorme de benefícios indiretos não quantificáveis, resultantes da ação da abelha na polinização e

fertilização das plantas. As razões por detrás desta vitalidade do sector são diversas, começando pela valorização atual do mercado internacional, pela organização do próprio sector, mas muito provavelmente pela dinâmica e investimento efetuado ao longo dos últimos anos na valorização qualitativa dos produtos da apicultura. A aposta continuada em produtos com selo de garantia certificado, tais como as denominações de origem protegida ou o modo de produção biológico são ferramentas que conferem aos produtos nacionais capacidade de se imporem no mercado nacional e internacional através da qualidade em detrimento do preço, combatendo num mercado globalizado contra os produtos apícolas da Ásia ou da América Latina. A nível internacional, Portugal é um país relativamente bem posicionado na agricultura biológica, surgindo na 8ª posição na União Europeia no que se refere à percentagem de área agrícola utilizada, e que corresponde aproximadamente a 6% de área agrícola nacional convertida para este modo de produção. A posição da apicultura no modo de produção biológico é, no entanto, bastante inferior ao esperado, considerando-se em particular a vitalidade atual do sector, mas também as potencialidades do país para esta atividade. Se por um lado o número colmeias e de operadores apícolas no modo de produção biológico tem aumentado de uma forma muito significativa ao longo dos últimos três anos, passando de 6100 colmeias em 2008 para 16000 em 2010, os números correspondem ainda a apenas 2,9% do efetivo apícola nacional. Este valor encontra-se afastado dos 6% acima referidos para a agricultura biológica em Portugal e estão longe dos 8% que representa a apicultura em modo de produção biológica em Itália.

OBJETIVOS DO PROJETO

Para identificar as razões que atualmente limitam a expansão da apicultura Portuguesa em modo de produção biológico, a Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, sob a coordenação técnico-científica do Instituto Politécnico de Bragança lançou o projeto BIOIMPACT – "Impacto económico e fronteiras comerciais da apicultura em modo de produção biológico em Portugal. Harmonização dos procedimentos de certificação". Este projeto funciona desde logo como um promotor da apicultura em modo de produção biológico, pois trás para a discussão as dificuldades

No que respeita à participação em reuniões técnicas, durante esta campanha a FNAP divulgou o projecto nos seguintes eventos:

- i. Encontro de Redes Nacionais promovido pelo AICEP e pela Nestlé, realizado em 5 de dezembro de 2012 em Lisboa.
- ii. II Congresso Ibérico de Apicultura organizado pela Fundación FERIA Apícola de Pastrana, que decorreu de 18 a 20.10.2012 em Guadalajara, Espanha.
- iii. Encontro Regional de Apicultura realizado em Faro no dia 30.10.2012
- iv. XII Fórum Nacional de Apicultura que decorreu de a na Vila do Luso..

- v. **Workshop “As abelhas, os produtos e a apicultura”** em Oeiras no promovido pelo INIAV, realizado em 10 de abril de 2013.
- vi. **III Seminário de Apicultura**, promovido pela Associação de Apicultores do Litoral Centro, realizado em 10 de maio de 2013, na Vila do Luso.
- vii. **“Simpósio Nacional Biodiversidade e Apicultura”**, promovido pela Escola Superior Agrária de Castelo Branco, realizado no dia 17 de maio de 2013.
- viii. **“Apicultura que Futuro”** promovida pela CONFAGRI, realizado em 18 de maio de 2013 em Viseu.

No que se refere à divulgação junto dos apicultores, foi distribuído o folheto informativo relativo ao projecto, informando sobre os seus objetivos, actividades e quais os resultados esperados.

NOSEMA O QUE É

O agente patogénico *Nosema ceranae* é uma das espécies de microsporídios de *Nosema*, juntamente com o *Nosema apis*.

Inicialmente restrito à abelha asiática, espalhou-se devido ao comércio internacional de abelhas e de equipamentos, demonstrando ser altamente virulento e capaz de provocar enormes perdas de colónias. Esta infecção é normalmente assintomática até ao ponto da colónia colapsar, impedindo tratamentos eficazes e o controlo da doença. O correcto diagnóstico de ambas as espécies de *Nosema* é portanto um assunto chave.

Alguns investigadores relacionaram recentemente o Síndrome do Desaparecimento com a infecção das abelhas por ambas as espécies de *Nosema*.

Sr. Apicultor: lembre-se que a utilização de antibióticos em colmeias de abelhas não está autorizada. A presença de resíduos de antibióticos no mel impede a sua comercialização. Caso suspeite da presença de *Nosema* nos seus apiários contacte a sua organização

Rua Pedro Lima de Freitas nº 2
5490-123 LISBOA
E-mail: info@pnap.pt
info@confagri.pt
Fax: 217 500 088
Fax: 217 500 113/3

Financiamento: Programa Nacional de Inovação e Transferência de Tecnologia
MEDIDA GARANTIDA

Editores: FNAP – Tiragem: 500 exemplares

2012

NOSEMA CONTEXTUALIZAÇÃO

A nível nacional, o *Nosema* é um dos agentes etiológicos associados a patologias apícolas que maior incidência tem revelado nos últimos anos. De facto, tem-se observado um número crescente de casos positivos desta doença, muitos deles comprovados por análise anatomopatológica, quer pelo Laboratório Nacional de Investigações Veterinárias, quer pelo Laboratório de Patologia Apícola da Escola Superior Agrária de Bragança e da Associação de Apicultores do Parque Natural de Montesinho.

Importa assim, no contexto específico da nossa apicultura, esclarecer qual o actual perfil epidemiológico do *Nosema*, discriminando os possíveis agentes etiológicos do género *Nosema* no nível específico do, eventualmente, identificando possíveis tipologias intra-específicas. Igualmente relevante é avaliar o seu impacto nos colónias, bem como testar/esclarecer a real eficácia de alguns produtos biológicos actualmente “recomendados” comercialmente como contributos para a mitigação dos impactos destes fungos nas colónias de abelhas (*Apis mellifera* L.) nacionais.

OBJECTIVOS

- Saber qual a distribuição da *Nosema* em Portugal
- Saber mais sobre as espécies de *Nosema* que estão associadas a essa distribuição
- Melhorar as condições com que os apicultores nacionais convivem com a *Nosema*

NOSEMA ACTIVIDADES DO PROJECTO

AMOSTRAGEM

Será feita uma recolha de material por amostragem em apiários de todo o país, em dois anos consecutivos. O material a recolher consistirá em abelhas adultas em pastoreio. De seguida será realizado um primeiro diagnóstico através de microscopia óptica, que apenas indicará a presença ou ausência de esporos *Nosema*, pois esta técnica não permite fazer a sua distinção.

NOSEMA ACTIVIDADES DO PROJECTO

AValiação MOLECULAR

As amostras anteriormente avaliadas (imunologicamente) serão alvo de novo diagnóstico desta vez utilizando técnicas de biologia molecular (OIE 2008), para confirmação e possível caracterização do tipo de *Nosema* presente.

PANosema (QUESTIONÁRIO BÁSICO “COLOSS 2010-11”)

Identificação e controlo de apicultor (OIE2008)

Nome: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Categoria: _____ Colmeias: _____

Tabelação: _____ Melhor hora para ir ao colmeiar: _____

Identificação e dados do colmeiar: _____ Nº Total de colmeias: _____

AValiação IMUNOLÓGICA

As amostras cujo diagnóstico tenha sido positivo para a presença de *Nosema*, serão re-analisadas recorrendo-se para tal a métodos imunológicos, o que permitirá distinguir entre *Nosema apis* e *Nosema ceranae*.

CONTROLO DA DOENÇA

Serão realizados testes de eficácia de soluções comerciais actualmente existentes no mercado para combater a doença.

IV - EXECUÇÃO ORÇAMENTAL

A execução orçamental decorreu sem desvios cronológicos ou substantivos, relativamente à situação de projeto.

Todos os processos de aquisição foram atempadamente encetados, de acordo com o quadro infra.

Contudo, (i) dada a necessidade de declinar uma das atividades propostas inicialmente no projeto (i.e., a anulação da Ação “Avaliação Imunológica de amostras”, laboração correspondente aos parceiros IPB e LNIV, por questões técnico-científicas que ultrapassaram o domínio do supracitado projeto de investigação, antecipou-se a necessidade de reforçar a Ação “Avaliação molecular” (laboração correspondente à UTAD) com a afetação da verba adstrita à Ação agora inexistente, quer no 2º ano quer no 3º ano de funcionamento do mesmo. Consequentemente, alguns dos montantes afetos ao segundo ano de Plano Apícola Nacional 2010-2013 (destinados a atividades claramente iniciadas no ano transacto mas expectavelmente apenas concluídas nos primeiros meses deste terceiro ano) só foram integralmente consumidos, *de facto*, no início do terceiro ano de projeto.

Quadro XXVIII. Execução orçamental do último ano de projeto

AFETAÇÃO		EXECUÇÃO ORÇAMENTAL		
Parceiro	Ano PAN	Despesa (FNAP)	Propósito	Valor SEM IVA
IPB	2012-13	Proj. investigação	Identificação microscópica de Nosema	2.834,17 €
IPB	2012-13	Proj. investigação	Identificação imunológica (espécies de Nosema)	0,00 €
IPB	2012-13	Proj. investigação	Placas de fluxo lateral	0,00 €
IPB	2012-13	Proj. investigação	Despesas de coordenação projeto	450,32 €
IPB	2012-13	Proj. investigação	Overheads	1.485,00 €
IPB	2012-13	Todas	Sub-Total	4.769,49 €
LNIV	2012-13	Proj. investigação	Identificação microscópica de Nosema	1.823,25 €
LNIV	2012-13	Proj. investigação	Identificação imunológica (espécies de Nosema)	0,00 €
LNIV	2012-13	Proj. investigação	Placas de fluxo lateral	0,00 €
LNIV	2012-13	Proj. investigação	Identificação microscópica de Nosema	2.917,20 €
LNIV	2012-13	Todas	Sub-Total	4.740,45 €
Uévora	2012-13	Proj. investigação	VitaFeedGold	181,50 €
Uévora	2012-13	Proj. investigação	ApiHerb	217,80 €
Uévora	2012-13	Proj. investigação	Fumidil B	110,88 €
Uévora	2012-13	Proj. investigação	Colónias	2.178,00 €
Uévora	2012-13	Proj. investigação	Gestão e condução de trabalhos	1.458,60 €
Uévora	2012-13	Proj. investigação	Transportes, consumíveis e envios	607,20 €
Uévora	2012-13	Proj. investigação	Despesas de apoio à coordenação projeto	412,17 €
Uévora	2012-13	Proj. investigação	Overheads	1.565,85 €
Uévora	2012-13	Todas	Sub-Total	6.732,00 €
UTAD	2012-13	Proj. investigação	Identificação de Na / Nc por PCR	7.665,36 €
UTAD	2012-13	Proj. investigação	Identificação de Na / Nc por PCR	729,30 €
UTAD	2012-13	Proj. investigação	Identificação de haplótipos de Nosema	913,28 €
UTAD	2012-13	Proj. investigação	Overheads	1,149,30 €
UTAD	2012-13	Todas	Sub-Total	10.467,24 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Folhetos	1.030,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Deslocações	48,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Deslocações	52,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Deslocações	127,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Representação	29,40 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Representação	220,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Representação	250,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Inscrição	140,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Estadias	174,01 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Estadias	107,70 €
FNAP	2012-13	Divulgação	revista SHARE	246,00 €

FNAP	2012-13	Divulgação	Prestação de serviços		511,61 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Portagens		6,05 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Portagens		6,05 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Refeição		42,45 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Combustível		74,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Combustível		41,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Aluguer de viatura		63,80 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Material de escritório		83,80 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Refeição		83,00 €
FNAP	2012-13	Divulgação	Representação		1.030,00 €
TODAS	2012-13	Todas	Divulgação e demonstração de Resultados	Sub-total	3.300,00 €
TODAS	2012-13	Todas		TOTAL ANUAL	29.999,18 €
TODAS	TODOS	Todas		TOTAL TRIÉNIO	93.000,98 €

V - N O T A F I N A L

Relativamente à pesquisa preliminar de Nosema, utilizando técnicas de microscopia ótica, os resultados obtidos em laboratório indicam, a presença do agente etiológico Nosema spp. em alguns apiários de todos os distritos de Portugal continental, sendo que, 45% do total de apiários estudados apresentavam Nosemose no primeiro período de amostragem e 63% no segundo período. Associado a este perfil epidemiológico, globalmente, o nível médio de infeção encontrado nos apiários distribuídos a nível nacional (continental) é muito variável, ainda que aparentemente, menor na região sul do país. Neste contexto, podemos afirmar que no nosso País (continente) existem indícios de um aumento crescente da incidência desta patologia. Acresce ainda que, os resultados obtidos pela microscopia diferem parcialmente das constatações verificadas no domínio da genética molecular, pelo que, será interessante

realizar estudos futuros para indigar as razões destas discrepâncias.

No domínio da avaliação molecular efetuada com base na metodologia PCR, salienta-se o facto de ter sido apenas identificada uma espécie de Nosema, o *N. ceranae*. A nível nacional, “surpreende” que o agente etiológico *N. apis* não tenha sido identificado em nenhuma das amostras analisadas. O que nos permite sugerir que em Portugal continental, o *N. ceranae* é, atualmente, a única espécie causadora de Nosemose, sugerindo preocupações acrescidas pela sua elevada capacidade de adaptação às diferentes condições geográficas e climáticas. Acresce ainda que, a prevalência do agente patogénico *N. ceranae* mostrou-se mais elevada nos distritos do litoral norte (Aveiro, Porto, Braga e Viana do Castelo) . No outro extremo, encontram-se os distritos de Faro e Lisboa onde a prevalência do *N. ceranae* é consideravelmente inferior tendo, na maior parte dos casos, existido concordância, nesta perspetiva, com as indicações também anteriormente fornecidas pela avaliação microscópica.

Os resultados obtidos no domínio da biologia molecular não sugerem a possível identificação de um padrão na distribuição geográfica de Nosemose, tanto numa lógica norte/sul ou interior/litoral como na comparação entre regiões de diferente altitude. A sequenciação de um fragmento da região IGS do gene rRNA ou do gene de uma proteína do tubo polar do *N. ceranae* não permitiram estabelecer qualquer relação com a prevalência daquele agente, avaliada pela carga de esporos, no primeiro caso em resultado da baixa qualidade dos cromatogramas e no segundo devido à ausência de polimorfismo.

Finalizando, convém contudo alertar que a informação de campo relativa ao domínio de avaliação de possíveis métodos de redução de impactos causados pela noseose está presentemente sistematizados em matriz única de dados que permitirá a análise estatística da evolução dos níveis de infeção nas colónias experimentais (e desenvolvimento destas), considerando as suas interações com o tempo e o tratamento experimental aplicado, quando toda a informação pertinente tiver sido recolhida. Aguarda-se presentemente a conclusão da quantificação laboratorial das infeções com Nc, que se sabia *anteriori* ser um processo demorado por implicar o nível de infeção individual num universo total de 4400 abelhas. Ainda assim, prevê-se a conclusão deste processo antes da data efetiva da conclusão do projeto (Setembro 2013), sendo então possível avaliar a eficácia de campo dos dois tratamentos alternativos testados (VitaFeedGold e ApiHerb).

VI - BIBLIOGRAFIA

- CANTWELL, G.E 1970. Standard methods for counting nosema spores. *American Bee Journal*. 110: 222-223.
- CHEN, Y. P., J. D. EVANS, C. MURPHY, R. GUTELL, M. ZUKER *et al.*, 2009. Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**: 142-147.
- CHEN, Y. P., and Z. Y. HUANG, 2010 *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie* **41**: 364-374.
- HATJINA, F., G. TSOKTOURIDIS, M. BOUGA, L. CHARISTOS, V. EVANGELOU *et al.*, 2011 Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**: 131-134.
- HUANG, W. F., M. BOCQUET, K. C. LEE, I. H. SUNG, J. H. JIANG *et al.*, 2008 The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**: 9-13.
- OIE, Terrestrial Manual 2008. Nosemosis of honey bees. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010*, Chapter 2.2.4., pp. 410-414.

Bragança, 5 de Julho de 2013



CIMO - Centro de
Investigação de Montanha



Instituto Politécnico de
Bragança
Escola Superior Agrária

(Professora Doutora Sância Maria Afonso Pires)
Coordenadora do Projecto