



Fenologia da Nosemose tipo C (*Nosema ceranae*) em colônias de abelha ibérica (*Apis mellifera iberiensis*): relação com a força da colônia

Milton Dias Ramos Junior

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientado por
Maria Alice Pinto
Ana Rita Lopes
Instituto Politécnico de Bragança
Lucas Da Silva Domingues
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Bragança
2019

*“A satisfação reside no esforço, não no resultado obtido. O esforço total é a plena
satisfação”*

Mahatma Gandhi

*“A única forma de conseguirmos enxergar um bom futuro é nos apoiando sobre os
ombros de quem se levantou antes da gente. Se ser uma pessoa melhor é importante
para si, escolha o caminho da reflexão do estudo. Ele não é o caminho mais fácil, é o
mais seguro*

Nilce Moretto

Este estudo foi desenvolvido no âmbito do projeto “BEEHEAL: Promoting bee health for sustainable agriculture”. BEEHEAL é financiado pelo programa ARIMNet2 2016 através das seguintes agências: INIA (Espanha), MOARD (Israel), ANR (França), e Fundação para a Ciência e a Tecnologia, FCT (Portugal). O programa ARIMNet2 (ERA-NET) é financiado através do Sétimo Programa Quadro para a Investigação, Desenvolvimento Tecnológico e Demonstração da União Europeia sob o “grant agreement no. 618127”.



Centro de
Investigação
de Montanha



IRIAF

Centro de Investigación Apícola y Agroambiental
MARCHAMALO

Agence Nationale de la Recherche

ANR



INIA

Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria



INRA
SCIENCE & IMPACT



Ministry of Agriculture
& Rural Development

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora do IPB Maria Alice Pinto por todo o apoio e conhecimento transmitido.

À minha co-orientadora do IPB Ana Rita Lopes por todo o apoio, paciência e conhecimento transmitido. Ao bom humor e conselhos valiosos que recebi; muito obrigado pela amizade e companheirismo que encontrei na sua orientação.

Ao meu orientador da UTFPR Lucas da Silva Domingues pela amizade e a sua grande disposição em me ajudar em todos os desafios que passaram durante todo esse período. Agradeço também por todos os ensinamentos, conselhos, conhecimentos e opiniões transmitidos espero que pelo próximo sempre.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos/PR, e Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Bragança pelas suas políticas educacionais que me possibilitaram desenvolver minha dupla diplomação.

Ao Instituto Politécnico de Bragança por ter prontamente me recebido e disponibilizado toda a estrutura e servidores.

Ao Centro de Investigação de Montanha (CIMO), IPB, pela disponibilidade do local e dos equipamentos necessários para a execução das análises.

Ao Centro de Apicultura e Pesquisa Agroambiental de Marchamalo (CIAPA), anexo ao Instituto Regional de Pesquisa e Desenvolvimento Agroalimentar e Florestal (IRIAF), Espanha, pela disponibilidade do local e dos equipamentos necessários para a execução das análises referentes a infestação da nosemose.

A todos os docentes do mestrado em Agroecologia e em especial os professores António Castro Ribeiro e João Luis Verdial Andrade pelo companheirismo.

À Dora Henriques pelo tempo e disponibilidade de passar conhecimentos relacionados ao processamento dos dados genéticos.

À minha mãe Clari Fontanella Ramos que sempre esteve me dando apoio incondicional em todos os projetos que desenvolvi ao longo da minha vida.

À minha família Irmã Tatiana F. Ramos, meu pai Milton Dias Ramos, meu cunhado Heverson Junior Peron e meus Sobrinhos Bernardo e Enzo por todo o amor e apoio durante esse período.

A Valkiria, pela ajuda, companheirismo, ensinamentos, força e conselhos serei eternamente grato a você.

A todas as pessoas que fazem parte da minha vida pôs cada bom dia cada sorriso cada puxão de orelha cada momento que passamos juntos é o que faz a vida valer a pena.

E para finalizar quero registrar meus sentimentos de alegria e entusiasmo de concluir mais uma fase da minha vida, essa grande jornada que foi executar esse projeto e apenas espero ser alguém melhor do que ontem.

RESUMO

A abelha melífera (*Apis mellifera L.*) é um importante inseto para o equilíbrio dos ecossistemas, uma vez que promove a polinização de inúmeras espécies vegetais. Porém, as abelhas melíferas nas últimas décadas têm sofrido um grande declínio por diversos fatores, sendo um deles as doenças como Nosemose do tipo C (*Nosema ceranae*) e a Varroose (*Varroa destructor*) que têm vindo a propagar-se muito devido ao mercado apícola. Com isso, o principal objetivo do presente trabalho é investigar a relação entre a *N. ceranae* e a força da colônia, incluindo também avaliação das condições ambientais. Adicionalmente caracterizou-se molecularmente as colônias com o uso do marcador molecular, DNA mitocondrial (mtDNA), através da sequenciação da região intrergénica tRNA^{leu}-cox2. A coleta de abelhas para a análise das taxas de infecção de Nosemose, tal como a avaliação das variáveis da força da colônia (número de quadros cobertos com abelhas adultas, número de quadros com criação, compactação da criação no quadro central, e taxa de infestação de *V. destructor*), realizou-se com uma periodicidade de dois meses, entre fevereiro a outubro 2018. Parâmetros como peso da colônia e condições ambientais (velocidade do vento, temperatura, precipitação e umidade relativa do ar), bem como monitoramento das condições internas (temperatura e umidade) foram registrados diariamente através de uma estação meteorológica vinculada às balanças automáticas e sensores higrotérmicos, respectivamente. Além disso, foi estimada também a produção de mel das colônias. A correlação entre a força da colônia e taxa de infecção de Nosemose foi estimada através de uma análise de trilha usando um programa estatístico (GENES). Os resultados da caracterização molecular revelaram que 8 das colônias pertencem à linhagem C e 4 pertencem à linhagem M. Em relação à força da colônia, observou-se que, no verão, o número de quadros cobertos com abelhas adultas atingiu uma média de 15 por colônia, e no inverno esse número diminuiu para 7. O mesmo padrão foi observado para as variáveis número de quadros com criação e compactação da criação. Os pesos mostraram um aumento considerável de abril a agosto (estação ativa), com uma média de 37 kg de mel por colmeia. A monitoração interna das colônias mostrou um padrão de estabilidade maior para a temperatura e umidade, de abril a agosto, que coincide com a estação ativa. Em relação às doenças, não foi observado nenhum padrão de infestação de *V. destructor*. Porém, altas taxas de varroose ocorreram mesmo após o tratamento para algumas colônias (6 de 12). A taxa de infecção da Nosemose tipo C apresentou um padrão sazonal, com pico no início da primavera (80%) e outro menor no outono (52%). Os

resultados da análise de trilha explicaram apenas 19% da taxa de infecção por *N. ceranae*. As variáveis da força da colônia, assim como a varroose, não demonstraram alta associação com a taxa de infecção por *N. ceranae*. Este estudo foi útil para compreender e determinar os níveis de infecção de *N. ceranae* nas colônias do nordeste de Portugal, contribuindo para um melhor conhecimento do comportamento deste microsporídeo ao longo de um ano.

Palavras-Chave: abelha melífera, doenças, dinâmica populacional, relações, análise de trilha, produção de mel

ABSTRACT

The honeybee (*Apis mellifera* L.) is an important source of ecosystems balance since it promotes the pollination of several plant species. However, in the last decades, honeybees have suffered a dramatic decline due to several factors. Diseases, such as Nosemosis type C (*Nosema ceranae*) and Varroosis (*Varroa destructor*), have been widely spread due to commercialization of honeybees. Thus, the main goal of this work was to evaluate the relationship between *N. ceranae* and colony strength, including the evaluation of environmental conditions. Additionally, the colonies were characterized molecularly using mitochondrial DNA as a molecular marker. The variables, colony strength, number of frames with brood, brood solidness of central frame, infestation rate of *V. destructor* and collection of honeybees for the Nosemosis analysis was performed every two months between february to october 2018. Parameters such as colony weight and environmental conditions (wind velocity, temperature, precipitation, and relative air humidity), as well as, monitoring of internal conditions (temperature and humidity) were recorded daily through a weather station linked to the automatic balances and hydrothermal sensors, respectively. Additionally, the annual honey production of the colonies under study was estimated. The correlation between colony strength and Nosemosis infection rate was estimated with a path analysis using a statistical program (GENES). The results showed that the colonies studied were 8 colonies of the lineage A and 4 of the lineage M. Regarding colony strength, it was observed that, in the summer, the number of frames covered with adult bees reached an average of 15 frames per colony, and in the winter that number decreased to 7. The same pattern was observed for the variables number of frames with brood and brood solidness. The variable weights showed a considerable increase from April to August (active season), ended up with an average of 37 kg of honey per hive. The internal colony monitorization showed a higher stability pattern for the temperature and humidity, from April to August, which coincides with the active season. Regarding the diseases, no pattern of *V. destructor* infestation was observed, however, high rates of varroosis occurred even after treatment for some colonies (6 of 12). The infection rate of Nosemosis type C showed a seasonal pattern, with a peak in early spring (80%) and a smaller one in autumn (52%). The results of the track analysis explained only 19% of the *N. ceranae* infection rate, thus the colony strength variables, as well as, varroosis did not demonstrate high associations with the *N. ceranae* infection rate. This study was helpful to understand and determine the infection levels of *N. ceranae* on the

colonies in the northeast of Portugal, contributing to a better knowledge of the microsporidium *N. ceranae* behaviour over the year.

Keywords: *Apis mellifera*, diseases, population dynamics, path analysis, Honey production

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
Glossário	IX
Índice de figuras	X
Índice de tabelas	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais e morfológicos da <i>Apis mellifera</i>	4
1.2. Distribuição geográfica.....	6
1.3. DNA mitocondrial	7
1.4. <i>Apis mellifera</i> : inimigos.....	9
1.4.1. Varroose	10
1.4.2. Nosemose	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. DNA mitocondrial	13
2.2. Dados meteorológicos.....	14
2.4. Força da colônia.....	15
2.3. Monitoramento interno das colônias.....	17
2.6. Nosemose.....	17
2.7. Análise estatística	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1. DNA mitocondrial	21
3.2. Dados meteorológicos.....	22
3.4. Força da colônia.....	24
3.3. Monitoramento interno das colônias.....	30
3.5. Varroose.....	35
3.6. Nosemose.....	36
3.7. Análise das relações.....	40
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
5. REFERÊNCIAS	46
6. ANEXOS	55

Glossário

- PCR = Polimerase chain reaction (Reação de polimerização em cadeia)
- DNA = Ácido desoxirribonucleico
- RNA = Ácido ribonucleico
- μL = microlitros
- pM = pico molar
- μmol = micromol
- μm = micrometro
- mm = milimetro
- bp = pares de base
- NC = *Nosema ceranae*
- NA = *Nosema apis*
- kg = Kilograma

Índice de figuras

Figura 1: Castas de <i>Apis mellifera</i> : I – operária, II – zângão, III – rainha. (Adaptado de Oliveira M. J., Takahashi, & Nakashima, 2008).	4
Figura 2: Ciclo de desenvolvimento da rainha, operária e zângão de <i>Apis mellifera</i> . (Adaptado de Garófalo, 1977).	5
Figura 3: <i>Apis mellifera iberiensis</i> no apiário de Gimonde. I – em destaque a rainha. II – as operárias.	6
Figura 4: Mapa com a distribuição geográfica das 31 subespécies da <i>A. mellifera</i> . A cor indica a linhagem evolutiva da subespécie: A - África (vermelho); M – Norte e Ocidente da Europa (azul), C – Sudeste da Europa (laranja); O – Médio Oriente (verde). As subespécies <i>A. sossimai</i> , <i>A. m. taurica</i> and <i>A. m. artemisia</i> apresentam pouca informação acerca da linhagem evolutiva (preto). Fonte: (Henriques, 2018).	7
Figura 5: Reconstrução do genoma mitocondrial das abelhas melíferas a partir de <i>A. m. ligustica</i> usando o MITObim (Hahn et al., 2013). Os genes de tRNAs estão representados por barras azuis curtas. O l-rRNA e o s-rRNA estão indicados com barra verde. Genes codificadores de proteínas são denotados por barras vermelhas, e os ricos em A + T (em preto). Fonte: (Henriques, 2018)	8
Figura 6: O ácaro <i>V. destructor</i> . I – a aderida a uma larva de operária com 8 dias; II – Parte ventral do ácaro; III (A) – Ovo do dia de <i>A. mellifera</i> ; III (B) – Ovo de varroa na mesma célula.	11
Figura 7: I – Estação meteorológica e II – Balança automática instalada no apiário na aldeia de Gimonde.	15
Figura 8: Quadros cobertos de abelhas adultas visto de cima.	16
Figura 9: Compactação da criação do quadro central avaliado com nível 4 (>75% de ocupação).	16
Figura 10: Teste do açúcar em pó. I – recipiente com as abelhas e o açúcar; II – devolução das abelhas ao ninho.	17
Figura 11: I – Equipamento automático de eletroforese QIAxcel Advanced; II – Exemplo do resultado obtido.	19
Figura 12: Esquema para a detecção molecular da <i>Nosema ssp.</i> em <i>A. mellifera</i> . As setas em cinza se referem à análise individual das colónias positivas detectadas pela análise das 60 abelhas (setas em preto).	20

Figura 13: Precipitação semanal acumulada durante o período de abril a outubro de 2018, onde de 1 a 5 representam a semana de cada mês.	22
Figura 14: Variação da temperatura no período de abril a outubro de 2018, onde a linha azul regista as temperaturas mínimas e a linha laranja as temperaturas máximas fornecidas pela estação meteorológica do apiário de Gimonde, Bragança.	23
Figura 15: Médias diárias da velocidade do vento (km/h), temperatura (°C), e umidade relativa (%), registadas na estação meteorológica do apiário de Gimonde, Bragança...	24
Figura 16: Número de quadros cobertos com abelhas adultas nas datas de cada avaliação. Barra a vermelho com padrão representa média \pm desvio-padrão. * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.	25
Figura 17: Número de quadros com criação nas datas de cada uma das avaliações no ano de 2018; Barra a vermelho com padrão representa média \pm desvio-padrão. * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.	25
Figura 18: Compactação da criação no quadro central nas datas de cada uma das avaliações no ano de 2018; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019...	26
Figura 19: Estimativa da quantidade de mel produzida por cada colmeia; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.	27
Figura 20: Evolução temporal dos pesos (média diária) de cada uma das 12 colônias de abril a outubro de 2018; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.	29
Figura 21. Média diária da temperatura interna das 12 colônias em estudo; ibutton A - centro da criação; ibutton B e C – extremidades da criação; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.	31
Figura 22: Umidade média diária interna das 12 colmeias em estudo onde o ibutton A estava posicionado no centro da criação e os ibutton B e C nas extremidades; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.	34
Figura 23: Porcentagem de infestação de <i>V. destructor</i> ; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.	36
Figura 24: Taxa de infeção de <i>N. ceranae</i> e <i>N. apis</i> ao longo do período de avaliação; onde NC = <i>N. ceranae</i> ; NA = <i>N. apis</i> ; NC+NA = co-ocorrência das duas espécies; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.	39
Figura 25: Diagrama de trilha em cadeia, demonstrando as relações diretas entre as variáveis; “ \leftrightarrow ” Relações entre as variáveis dependentes; “ \leftarrow ” Relação direta com a variável de interesse.	40

Índice de tabelas

Tabela 1: Sequências oligonucleotídicas dos primers (F: <i>forward</i> ; R: <i>reverse</i>) e tamanho esperado dos fragmentos amplificados por PCR.....	18
Tabela 2: Distribuição dos haplótipos das colmeias em estudo do apiário de Gimonde.	22
Tabela 3: Presença de <i>N. ceranae</i> (+) e ausência (-) de <i>N. ceranae</i> e <i>N. apis</i> para cada uma das avaliações.	36
Tabela 4: Estimativas dos efeitos diretos e indiretos na variável taxa de infecção de <i>N. ceranae</i> , através da compactação da criação no quadro central, número de quadros cobertos com abelhas adultas, taxa de infestação <i>V. destructor</i> , e peso colônia.	41
Tabela 5: Coeficientes de correlação entre as variáveis explicativas da taxa de infecção de <i>N. ceranae</i> . Os valores em negrito apresentaram $P \leq 0,05$ (teste t-student).....	42

1. INTRODUÇÃO

A abelha melífera (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) desempenha um papel fundamental para o ser humano devido aos seus serviços de polinização que garantem a qualidade e quantidade de alimentos (frutas e hortícolas) (Magalhães & Silva, 2015).

Este inseto social, teve origem à cerca de 5 a 2 milhões de anos atrás no Sudeste Asiático tendo-se mais tarde propagado pelos outros continentes. Devido a vários processos adaptativos e demográficos estão descritas pelo menos 31 subespécies, as quais se agrupam em quatro linhagens evolutivas (A, M, C e O) (Ruttner, 1988; Engel, 1999; Sheppard & Meixner 2003, Meixner et al., 2011; Chen et al., 2016). Estas linhagens foram primeiramente classificadas com base em caracteres morfológicos e posteriormente confirmadas com uso de marcadores moleculares, dos quais o mais popular o DNA mitocondrial (mtDNA), por ser passado de forma integral via materna e por não existir recombinação, facultando-nos informação de eventos evolutivos menos recentes. Este inseto social apresenta diferentes morfologias que também estão relacionadas com a sua distribuição geográfica (Michener, 2007). Sendo que a subespécie presente em Portugal é conhecida por abelha ibérica (*Apis mellifera iberiensis*), caracterizada por uma coloração âmbar-negro com pouca pilosidade.

Na última década, tem se observado perdas de colônias em larga escala por todo o mundo quer através de um recente predador oriundo da Ásia, a vespa (*Vespa velutina nigrithorax*) quer pelo fenómeno conhecido por *Colony Collapse Disorder* (vanEngelsdorp et al., 2009). Estas perdas podem estar relacionadas com vários fatores, que eventualmente atuam sozinhos ou em combinação, incluindo propagação de parasitas e agentes patógenos exóticos, como por exemplo o ácaro *Varroa destructor*, que é também um vetor de transmissão de vários vírus, o fungo microsporídeo *Nosema ceranae*, exposição das colônias a agro-químicos, má nutrição, alterações climáticas, entre outros (Potts et al., 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2011).

O ácaro *V. destructor* é considerado um dos agentes patógenos com maior impacto do declínio da abelha melífera por toda a Europa, provocando inevitavelmente um impacto económico direto negativo na apicultura. Este ácaro tinha como hospedeiro original a abelha asiática (*Apis cerana*) no entanto conseguiu-se expandir e infetar a *A. mellifera* no século XX (Oldroyd, 1999). Desde então, está presente por toda a Europa provavelmente devido à crescente comercialização da abelha.

Outra doença que afeta de forma expressiva a abelha melífera é a Nosemose do tipo C provocada pela *Nosema ceranae*, uma variante recente e mais virulenta que a já relatada *Nosema apis* (Higes et al, 2007; 2008; 2010; Martín-hernández, et al, 2011). Tal como a *V. destructor*, é possível que esta variante também tenha tido origem na abelha asiática que posteriormente conseguiu infetar a *A. mellifera*.

Ter uma ampla compreensão das características ecológicas e genéticas das abelhas é um fator que pode auxiliar a compreender e/ou melhorar as estratégias de manejo das colônias. Assim gera-se a necessidade de acompanhamento das colônias com o objetivo de desenvolver estratégias que possam melhor/evitar doenças. A construção desse conhecimento depende de um amplo número de variáveis, desde a carga genética de cada colônia, acompanhamento do crescimento da colônia durante a estação de maior atividade, acompanhamento das condições internas da colmeia, monitoramento das doenças. O desenvolvimento de uma colônia é o resultado de uma ampla gama de mudanças fisiológicas e comportamentais, que partem a nível individual da abelha e que ao longo do tempo podem-se refletir sobre a colônia. Uma abelha operária inicia sua existência como um ovo passando por uma serie estágios até emergir como um adulto após 21 dias (Winston, 1987).

A vida de uma abelha operária é influenciada por fatores como a doenças, temperatura, nutrição e estação do ano. De modo geral, em climas temperados, as abelhas operárias têm um período de vida curto no verão (15 a 38 dias) e uma maior longevidade no inverno (140 a 320 dias) (Farrar, 1936; Sakagam & Hiromi, 1968; Stoner, Wilson, & Harvey, 1985). Essa longevidade a nível individual é um dos fatores que afetam o tamanho da colônia (a quantidade de cria e a número de abelhas adultas). A sua interação com o ambiente determina a quantidade de alimento (néctar e pólen) que é coletado e consumido. Por outro lado, a quantidade de pólen coletado também influencia o arranque no desenvolvimento da criação no início da primavera. Assim, a capacidade das colônias aproveitarem ao máximo os recursos florais disponíveis está relacionado com a força da colônia, sendo que a incidência de doenças, como a varroose e a noseemose, podem impor limites nesse desenvolvimento e encurtar a longevidade das colônias (Kritsky, 2010; Le Conte et al., 2007).

Com o propósito de colaborar na obtenção de novas informações sobre a noseemose, este trabalho tem como objetivo identificar a presença de *N. ceranae* durante o ano de 2018 e investigar possíveis relações dessa com a força da colônia e infestação de *V. destructor*. O trabalho foi desenvolvido em paralelo a um projeto de investigação a

nível internacional designado “BEEHEAL: promoting bee health for sustainable agriculture”. BEEHEAL é financiado por ARIMNet2 (2016) através das agências nacionais: INIA (Espanha), ANR (França), MOARD (Israel), e FCT (Portugal). ARIMNet2 (ERA-NET) é financiado pelo programa Union’s Seventh Framework para investigação, desenvolvimento e demonstração tecnológica ao abrigo do contrato nº 618127.

Com o intuito de fornecer o embasamento sobre o a temática, nos tópicos seguintes serão abordados as características da *Apis mellifera* (subcapítulo 1.1), a sua distribuição geografia (subcapítulo 1.2), diversidade e estrutura populacional através do DNA mitocondrial (subcapítulo 1.3) e por último os diversos fatores que afetam a sanidade da *Apis mellifera* (subcapítulo 1.4).

1.1. Aspectos gerais e morfológicos da *Apis mellifera*

Dos insetos polinizadores, a abelha melífera (*Apis mellifera*) desempenha um papel essencial no equilíbrio dos ecossistemas e na manutenção da biodiversidade, prestando vários serviços à comunidade, desde a produção de mel, cera, própolis, geleia real, veneno (apitoxina), até à polinização. Estima-se que mais de 3/4 das espécies utilizadas pelos humanos na produção de alimentos dependem da polinização para uma produção de qualidade e quantidade (Delaplane & Mayer, 2000; Magalhães & Silva, 2015). Assim, a diminuição deste inseto tem um impacto direto e negativo tanto na agricultura como na segurança alimentar e sustentabilidade dos recursos.

A abelha melífera pertence à ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea, família Apidae, género *Apis*, espécie *Apis mellifera* (Ruttner & Milner 1990). É um inseto social que é caracterizado por viver organizado em classes/castas (Figura 1), interagindo entre si, e possuindo tarefas bem definidas sempre em prol da manutenção e sobrevivência da colônia (Michener, 2007) .

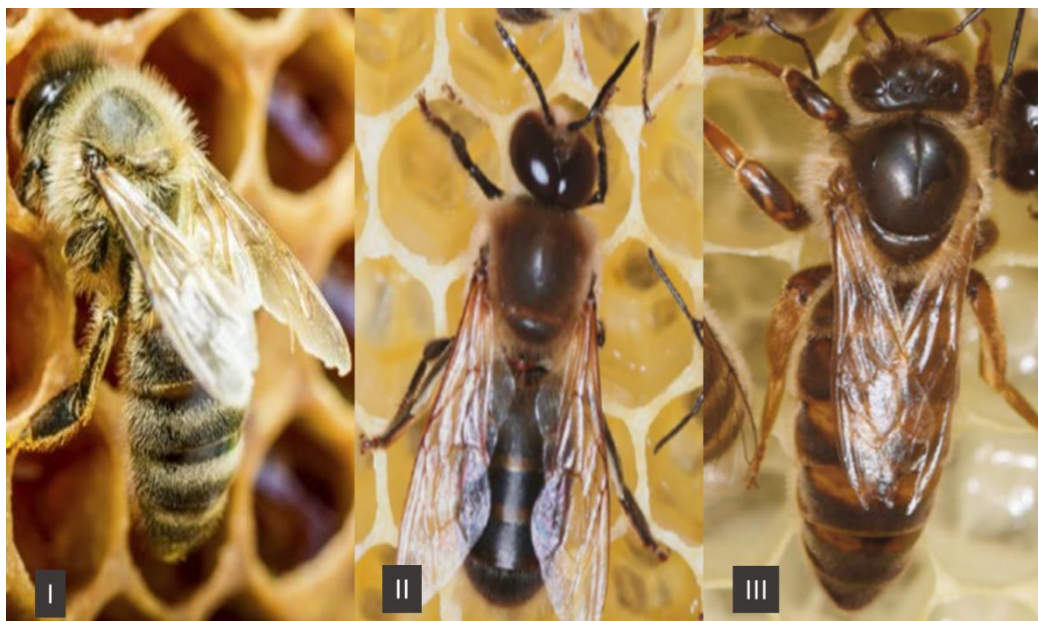


Figura 1: Castas de *Apis mellifera*: I – operária, II – zângão, III – rainha. (Adaptado de Oliveira M. J., Takahashi, & Nakashima, 2008).

Dentro da colônia existem duas castas do género feminino: as operárias estéreis, que são menores (10-15 mm de comprimento) e desempenham funções na colônia desde a limpeza até a de forrageamento; a rainha, única fértil, é a maior (18-20 mm) e a suas funções passam por postura de ovos e libertação de feromônios. Já os machos, chamados

zângãos, têm 15 a 17 mm de comprimento e desempenham apenas funções reprodutivas. Embora menores, as operárias têm asas mais longas que os zângãos. As duas castas de fêmeas têm um ferrão que é formado a partir de estruturas ovopositoras modificadas. Nas operárias, o ferrão tem um formato farpado, assim ao ferroar, o abdômen se desprende do corpo, causando a morte da abelha (Ruttner, 1987).

Em ambas as castas, o ferrão é fornecido com veneno pelas glândulas do abdômen. Já os machos não possuem ferrão e têm olhos muito maiores do que as fêmeas, para ajudar a localizar as rainhas durante os voos de acasalamento (Winston, 1987). São insetos holometábolos e possuem quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e adulto. O tempo de desenvolvimento depende da casta, sendo a rainha a que demora menos tempo a se desenvolver, seguido das operárias e por último os zângãos com 16, 21, e 24 dias, respectivamente (Figura 2). A velocidade do crescimento posterior das larvas é fortemente afetada pela temperatura com um valor ideal entre os 33°C aos 36°C (Fahrenholz, et al, 1989).

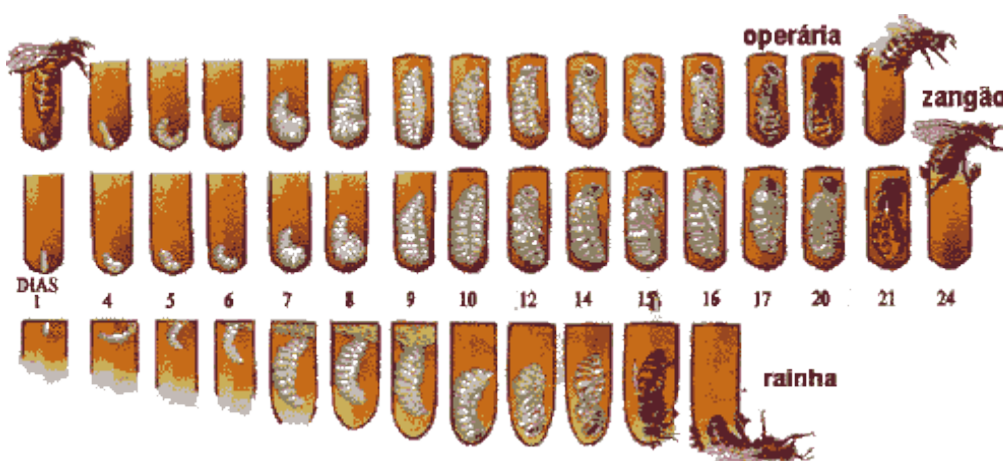


Figura 2: Ciclo de desenvolvimento da rainha, operária e zângão de *Apis mellifera*. (Adaptado de Garófalo, 1977).

A abelha melífera é um inseto endotérmico, tendo por isso a capacidade de aquecer seus corpos e a temperatura em suas colônias usando os músculos do voo (Clarke et al., 2001; Seeley, 1995). As operárias forrageiam o mais próximo possível da colônia, aproximadamente num raio de 3 quilômetros (km). Se necessário, podem voar até 13 km para alcançar comida ou água (Percival, 1947; Sammataro, 1998).

Existe uma grande diversidade morfológica na *A. mellifera*, apresentando coloração escura, com pêlos escurecidos no tórax sem segmentos amarelos (conhecida por abelha negra – *Apis mellifera mellifera*) até bandas pretas e anéis amarelos alaranjados no

abdómen (conhecida por abelha italiana – *Apis mellifera ligustica*). De modo geral, têm uma maior quantidade de pelos no tórax do que no abdómen. Nas operárias, as patas posteriores são especializadas para a coleta de pólen possuindo um reservatório designado por corbícula. Essas normalmente apresentam a coloração castanho-escuro/preto (Ruttner & Tassencourt 1978; Ruttner 1987).

Neste trabalho a subespécie em estudo é a abelha ibérica, *Apis mellifera iberiensis*. Esta foi descrita pelo Brother Adam que foi recolhendo as suas primeiras impressões em uma viagem na data de 1959 pela Península Ibérica (Ruttner, 1987). Adam descreve a abelha ibérica da seguinte forma: com a coloração em sua maioria com um âmbar-negro e pouca pilosidade (Figura 3). As rainhas têm aspeto mais escuro e de cor uniforme, os seus movimentos são ágeis e bastante nervosos, possuindo uma alta taxa de fecundidade, sendo essa muito influenciada pelas condições ambientais.

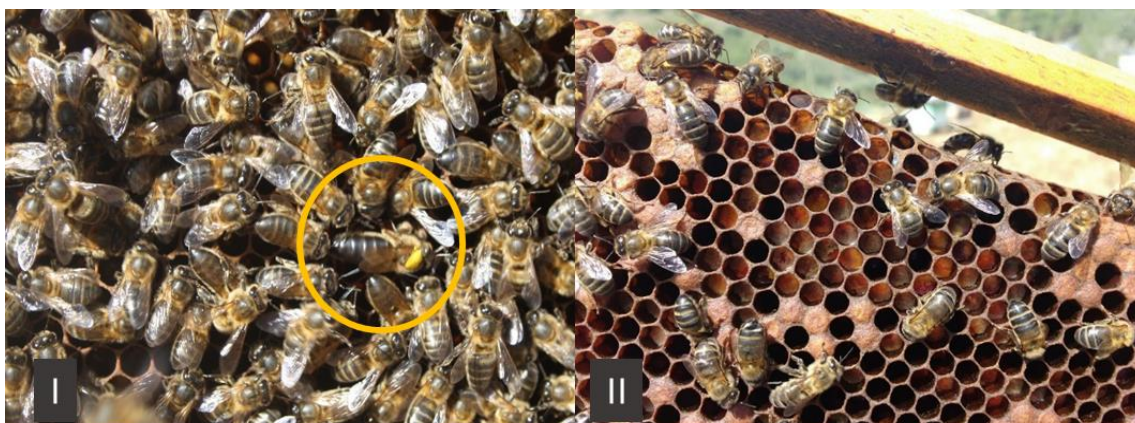


Figura 3: *Apis mellifera iberiensis* no apiário de Gimonde. I – em destaque a rainha. II – as operárias.

1.2. Distribuição geográfica

A *A. mellifera* teve origem cerca de 5 a 2 milhões de anos atrás no Sudeste Asiático e mais tarde se propagou por outros continentes, como África, Europa e Ásia Ocidental (Ruttner, 1987). No século XVII, a abelha melífera foi levada pelos humanos para diversas regiões do globo, sendo que atualmente pode ser encontrada em todo o mundo, incluindo o leste da Ásia, Austrália, Nova Zelândia, e América do Norte e do Sul (Diana & Alphonse, 1978; Winston & Dropkin, 1981).

Devido a processos adaptativos e demográficos, a *A. mellifera* evoluiu ao longo de milhares de anos estando atualmente descritas 31 subespécies naturalmente distribuídas pela África, Ásia Ocidental, Médio Oriente e Europa. Com base em caracteres morfológicos, e mais tarde confirmado pelo DNA mitocondrial, esta diversidade tem sido

agrupada em quatro linhagens evolutivas: a de África (A), a do Norte e Ocidente da Europa (M), a do Sudeste da Europa (C), e a do Médio Oriente (O) (Ruttner, 1988; Engel, 1999; Sheppard & Meixner 2003, Meixner et al., 2011; Chen et al., 2016). A distribuição das diferentes subespécies da abelha melífera está representada na Figura 4.



Figura 4: Mapa com a distribuição geográfica das 31 subespécies da *A. mellifera*. A cor indica a linhagem evolutiva da subespécie: A – África (vermelho); M – Norte e Ocidente da Europa (azul), C – Sudeste da Europa (laranja); O – Médio Oriente (verde). As subespécies *A. sossimai*, *A. m. taurica* and *A. m. artemisia* apresentam pouca informação acerca da linhagem evolutiva (preto). Fonte: (Henriques, 2018).

1.3. DNA mitocondrial

Um dos marcadores mais utilizados para estudar a diversidade e estrutura populacional da abelha é o DNA mitocondrial (mtDNA) (Figura 5). Este DNA está localizado em uma organela denominada mitocôndria que está presente em todas as células eucariotas. O mtDNA é um cromossomo circular com 16343pb que é passado na sua totalidade via materna (Crozier, 1993). Inicialmente, os métodos utilizados no estudo dos vários tipos de mtDNA acabavam por digerir a molécula por completo com uma vasta gama de enzimas de restrição, técnica designada por RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (Garnery & Solignac, 1992; Hall & Smith, 1991). No entanto, este processo tinha como desvantagem a necessidade de uma quantidade grande de DNA não degradado. Mais tarde com o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase chain*

reaction – reação em cadeia da polimerase), as enzimas de restrição eram aplicadas em regiões específicas do mtDNA, passando a combinar-se as duas técnicas (PCR-RFLP). Dos vários métodos desenvolvidos de identificação do mtDNA da abelha melífera, o mais popular é o teste *DraI*. Este método consiste na amplificação por PCR do fragmento intergênico tRNA^{leu}-cox2 posteriormente digerido com a enzima de restrição *DraI* (Garnery et al., 1993).

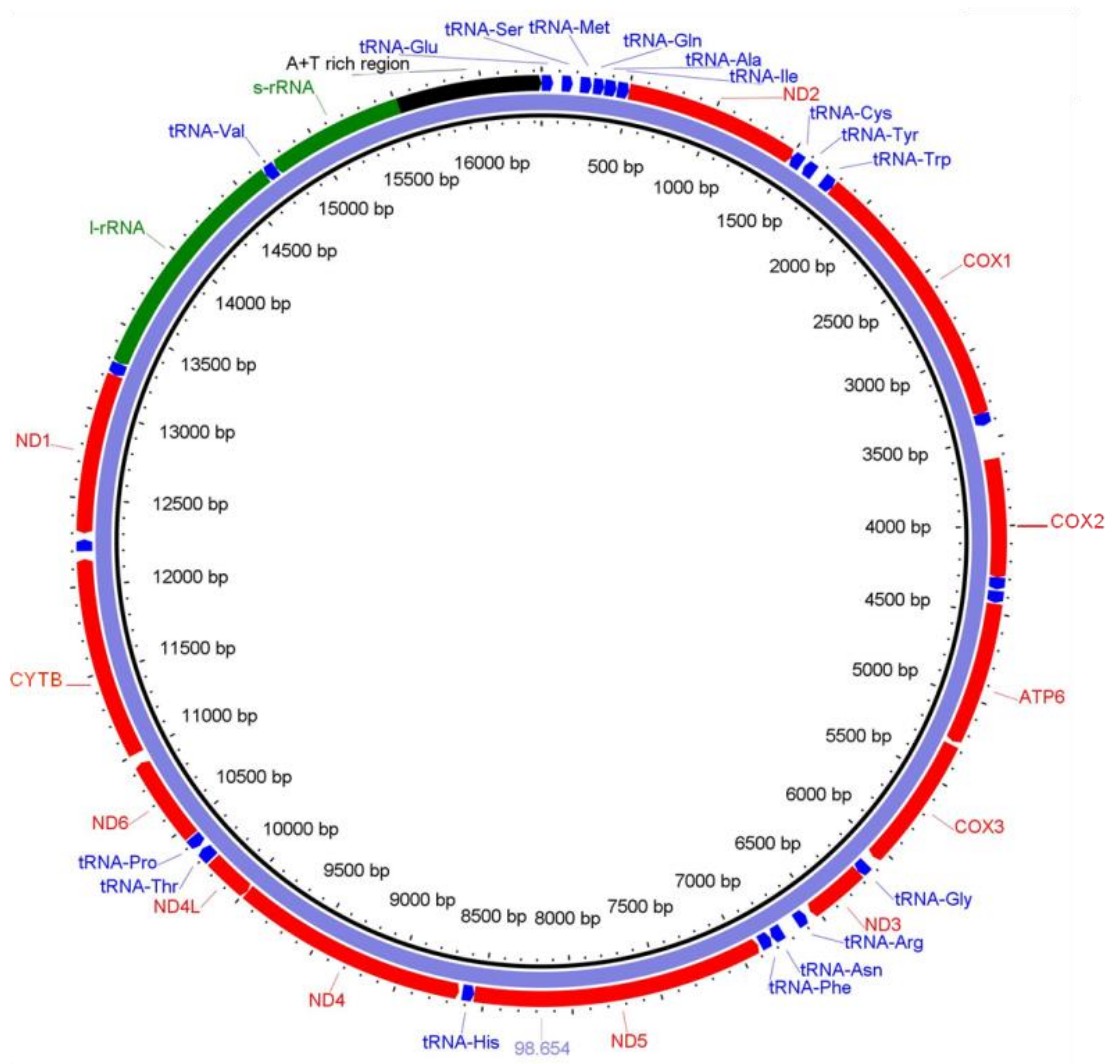


Figura 5: Reconstrução do genoma mitocondrial das abelhas melíferas a partir de *A. m. ligustica* usando o MITObim (Hahn et al., 2013). Os genes de tRNAs estão representados por barras azuis curtas. O I-rRNA e o s-rRNA estão indicados com barra verde. Genes codificadores de proteínas são denotados por barras vermelhas, e os ricos em A + T (em preto). Fonte: (Henriques, 2018)

Atualmente, com a diminuição do custo do sequenciamento e desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas, em que apenas é necessário amplificar a região tRNA^{leu}-cox2 por PCR e posteriormente sequenciar esse produto usando o método de Sanger (Galarza et al., 2017). Usando essas ferramentas bioinformáticas (por exemplo, *Blast* – *NCBI*) (Saito et al., 2005), é possível identificar de forma rápida qual é o tipo de mtDNA

(haplótipo) de um indivíduo. Um exemplo da identificação do haplótipo por sequenciamento é dado por Galarza et al., (2017) que analisou o mtDNA de 711 colônias geograficamente distribuídas por toda a Península Ibérica e observou 182 novos haplótipos.

1.4. *Apis mellifera*: inimigos

A abelha melífera tem uma infinidade de inimigos naturais, como por exemplo ratos, pássaros, vespas, entre muitos outros. Dentro de esses a vespa asiática (*Vespa velutina nigrithorax*), a qual foi introduzida na Europa em 2004 (Villemant et al., 2006), é uma preocupação na apicultura Europeia. Entre os parasitas, um dos mais notáveis é o ácaro Varroa (*V. destructor*). Este foi trazido da Ásia por volta de 1980, e marcou um ponto de virada para a apicultura na América do Norte e na Europa por causar um enfraquecimento das colônias (vanEngelsdorp et al., 2009).

Outro grupo de patógenos que parasitam a abelha melífera, são os fungos que infetam as colônias (Fries, 2010). Dentro dos fungos microsporídeo, o gênero *Nosema* possui 150 espécies, sendo que inúmeras atacam diversos invertebrados. A *Nosema* tem sido observada em Lepidoptera e Himenoptera, causando algumas doenças como pebrina em bichos da seda (*Nosema bombycis*) e disenteria em abelhas (*N. apis*). Recentemente, observou-se uma segunda espécie de microscopídeo (*N. ceranae*) atacando a *A. mellifera* (Higes et al., 2005, 2006; Huang et al., 2007), tal como a Varroa oriunda da Ásia.

Os estudos com as abelhas do gênero *Apis* tem tomado uma maior importância no cenário da pesquisa mundial, esse aumento se dá pela ocorrência do fenômeno chamado distúrbio do colapso das colônias (CCD). Esse distúrbio se caracteriza pelo desaparecimento de populações de abelhas que estão ocorrendo em diversas partes do mundo. O termo foi citado primeiramente nos Estados Unidos em 2006 como *colony collapse disorder* (CCD) após observado a morte de abelhas em massa (Watson & Stallins, 2016). Juntamente com *V. destructor*, a *N. ceranae* também foi associada ao CCD (Antúnez et al., 2009; Higes, 2007; Mcmenamin et al.; 2015). O CCD tem a possibilidade de também ser agravado pelo surgimento de variantes da *V. destructor*, mais invasivos (Roberts, 2015). Essa pressão gerada pelo surgimento dessas variantes pode levar a mudanças nas abelhas ao longo do tempo (Desai & Currie, 2015; Locke et al., 2012).

O CCD gerou um alarme dentro da comunidade científica, da mídia e do público em geral, devido à velocidade e tamanho das perdas (VanEngelsdorp et al., 2010). Nos

últimos dez anos, têm sido apontados dois fatores principais de CCD: uso de pesticidas na agricultura e incidência de pragas e patógenos.

Outras doenças como a Septicemia causada por *Pseudomonas aspiseptica*, ascosferiose causada pelo fungo *Ascophaera apis*, a loque americana e europeia causadas pelas bactérias *Paenibacillus larvae* e *Melissococcus pluton*, respectivamente, e os vários vírus de RNA (por exemplo, o vírus das asas deformadas) transportados pela *V. destructor* também afetam as abelhas.

1.4.1. Varroose

A *Varroa destructor* é um ácaro ectoparasita que ataca as abelhas do gênero *Apis*. Na sua fase adulta os ácaros se aderem ao corpo das abelhas sugando a hemolinfa para o seu próprio sustento (Hu et al., 2016). Como parasita obrigatório, apenas tem sua capacidade de reprodução dentro de uma colônia de abelhas, onde encontra as melhores condições para realizar seu ciclo. Com esse contato acaba por ser ainda um vetor de vírus de RNA, como o vírus das asas deformadas (DWV) e o *Israeli acute paralysis vírus* (IAPV) (Goulson et al., 2015). Quando a taxa de infestação da colônia é muito elevada provoca a morte da mesma, geralmente ocorrendo no final do outono até o início da primavera. O ácaro *V. destructor* é o parasita com um grande impacto econômico na apicultura por causar o declínio nas colônias afetadas (Cox-Foster et al., 2007; Goulson et al., 2015).

Relativamente à morfologia da *V. destructor*, a fêmea do ácaro adulto tem o aspeto castanho avermelhado enquanto que o macho é branco. Os ácaros são planos e em forma de botão. Medem de 1 a 1,8 mm de comprimento, 1,5 a 2 mm de largura e possuem oito patas (Donzé & Guerin, 1994; Dietemann, 2008). A sua reprodução ocorre num período de 10 dias. O ácaro fêmea aloja-se nas células de criação e realiza a oviposição no mesmo (Figura 6). Dessa forma, a abelha passa por toda a sua fase juvenil com o ácaro alojado em seu corpo, e assim que eclodir, já estará parasitada, por esse motivo e por serem muito mais fêmeas que machos o ácaro se prolifera pela colmeia toda.

De modo geral, a *V. destructor* prefere infestar as células dos zângões por esses terem um maior período de desenvolvimento, o que permite que o mesmo se reproduza mais uma vez com os três dias extra que leva para a sua formação ao comparar com a abelha operária (Donzé & Guerin, 1994; Dietemann, 2008).

As abelhas adultas que já foram atacadas em seus estágios anteriores acabam por ser mais propensas a infecções. Recentemente, a sobrevivência de colônias tem sido observada em populações de abelhas não tratadas contra *V. destructor* com foi relatado na França por Le Conte et al., (2007). Outro relato de uma linhagem com uma maior tolerância a *V. destructor* são as designadas abelhas "russas" observadas por De Guzman et al., (2007). Por último, existem ainda as populações de abelha Africanizada que tem revelado a uma maior tolerância do que as abelhas Europeias (Kraus et al., 2007).

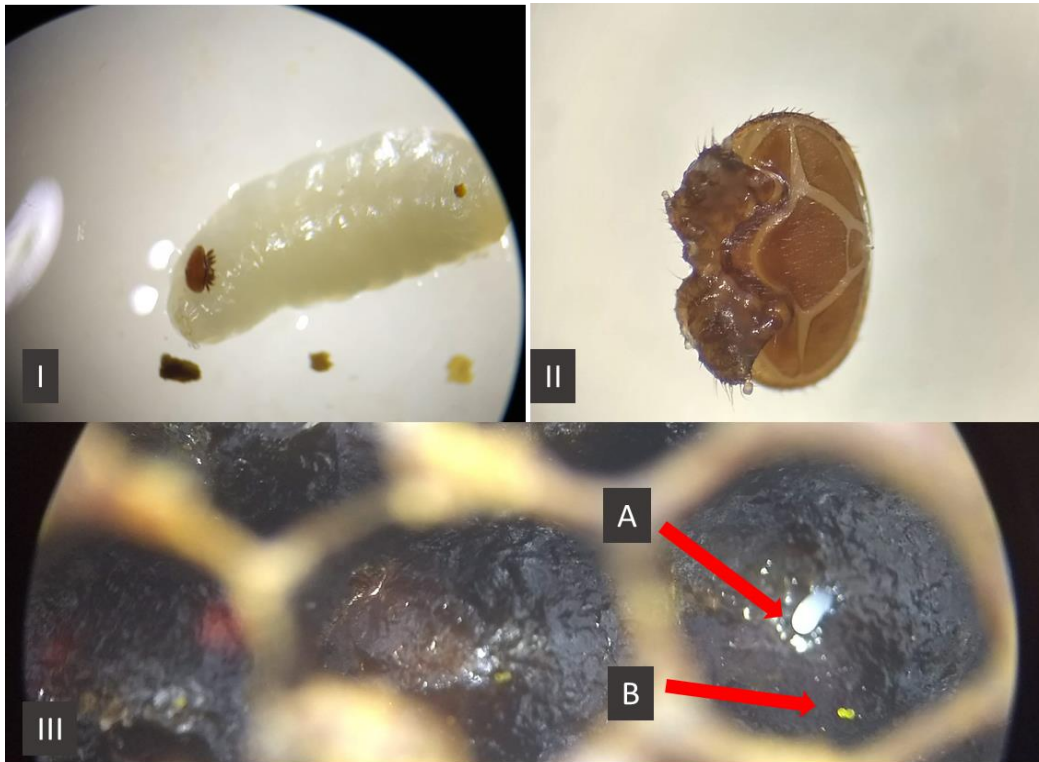


Figura 6: O ácaro *V. destructor*. I – varroa em uma larva de operária com 8 dias; II – parte ventral do ácaro; III (A) – ovo do dia de *A. mellifera*; III (B) – ovo de varroa na mesma célula.

1.4.2. Nosemose

A noseemose causada por *N. ceranae* (também conhecida por noseemose tipo C) pertence ao grupo dos microsporídios, de forma geral, são parasitas obrigatórios intracelulares, e necessitam de retirar a energia do hospedeiro para se desenvolver e reproduzir. A contaminação é feita por meio de esporos, a qual ocorre por ingestão dos mesmos pelas abelhas, possivelmente durante a limpeza da colônia, consumo de pólen contaminado ou através de trofalaxia (Forsgren & Fries, 2010). Assim, os esporos acabam por entrar através da alimentação e germinam no intestino médio, nas células epiteliais,

onde ocorre a reprodução do parasita e em seguida a produção de novos esporos (Forsgren & Fries, 2010).

Nosema spp. tem esporos com uma estrutura especializada para a invasão das células. O mecanismo de infecção baseia-se na injeção mecânica de um filamento polar proeminente a partir da germinação do esporo. Com a força física, o filamento penetra na membrana da célula epitelial e o esporoplasma infeccioso é injetado no citoplasma da célula hospedeira, através da emissão do tubo polar. Em seguida, se reproduz ao injetar seu material genético em células da parede do intestino formando novos esporos dentro das células hospedeiras da abelha (Budge, 2008). O desenvolvimento intracelular da *N. ceranae* no ventrículo celular parece ser semelhante ao da *N. apis*. No entanto, a *N. ceranae* completa o seu ciclo de vida 3 dias antes que a *N. apis* (Fries, 2010).

De forma geral, Martín-Hernández et al., (2007) mostrou que a sobrevivência das abelhas atacadas pela *N. ceranae*. é menor, uma vez que as funções metabólicas ficam diminuídas. A abelha infetada sente mais necessidade de consumir alimento. Porém devido à infecção, a abelha não consegue absorver adequadamente os nutrientes, e também não consome o oxigênio de forma apropriada. Essa dificuldade nutricional conduz a uma certa deficiência na alimentação e, tal como foi relatado por Kurze et al., (2016), o aumento do consumo de alimento é diretamente proporcional ao aumento do número de esporos presentes no intestino médio.

N. ceranae foi descrita pela primeira vez em 1996 (Fries et al., 1996) pertencendo a uma classe relativamente recente e sendo considerada generalizada na abelha *A. mellifera*, provocando uma forma diferente de nosemose. Comparada a *N. apis*, que já há muito tempo é estudada, a *N. ceranae* tem uma mais recente co-evolução com o seu novo hospedeiro (Martín-Hernández et al., 2012). Em colônias afetadas com a *N. ceranae*, se não forem tratadas acabam por morrer em 1,5 a 2 anos, sendo mais virulenta que a *N. apis* (Higes et al., 2008).

Como observado por Fries (2010), as infecções de *N. ceranae* demonstram ter um efeito variável sobre as colônias em diferentes regiões geográficas. Na Andaluzia (Espanha), a *N. ceranae* foi detetada nas colmeias durante dois anos sem provocar o colapso da colônia (Martín-Hernández et al., 2012), dessa forma demonstrando a necessidade de um maior número de observações em diferentes locais e condições.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em Bragança, na região de Trás-os-Montes, no Nordeste de Portugal, nas proximidades da aldeia de Gimonde, nas coordenadas geográficas 41°48'31.83"N, 6°42'42.74"W. Segundo a classificação de Köppen o clima, onde o apiário está localizado, é classificado como temperado, com inverno chuvoso e verão seco e pouco quente (Csb) (IPMA, 2018a).

Foram utilizadas 12 colônias de abelhas *Apis mellifera iberiensis* pertencentes ao apiário experimental formado em 2015 com colônias oriundas de Bragança, Algarve e País Basco (Espanha) com os seguintes códigos de identificação A35, A4, B16, B27, B35, B43, B44, B52, BL6, BR5, CB4 e PT1. As colônias estavam alojadas no modelo de colmeia *Langstroth*. Durante todo o período de avaliação as colônias tiveram o acompanhamento do peso com o uso de balanças automáticas do modelo XLOG bee SMS/GPRS. Os dados climáticos, tais como a temperatura, umidade relativa do ar e precipitação, foram obtidos através da estação meteorológica instalada no apiário.

Com o objetivo de caracterização das colônias em estudo se realizou a identificação dos haplótipos com a utilização do DNA mitocondrial (mtDNA). Foi realizado também a coleta das variáveis climáticas ambientais e de dentro do ninho com o uso de sensores distintos. As colmeias foram ainda submetidas a avaliações realizadas com a periodicidade de dois meses (abril, junho, agosto e outubro de 2018) compreendendo as seguintes variáveis: infestação de *V. destructor*, coleta de abelhas para identificação de *Nosema* spp., e avaliação da força da colônia, como detalhado a seguir. As amostras coletadas foram analisadas nos laboratórios do Centro de Investigação de Montanha (CIMO), IPB, e do Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CAR), Espanha.

2.1. DNA mitocondrial

De modo a obter os dados para a análise do mtDNA, procedeu-se à extração de DNA do tórax de uma abelha de cada uma das 12 colônias selecionadas. Para tal, utilizou-se o kit comercial Ron's Tissue DNA Mini Kit (@Bioron). Com o objetivo verificar a qualidade da extração de DNA, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose de 1% (Anexos: Figura S1).

O passo seguinte foi a realização da reação PCR para a amplificação da região intergênica tRNA^{leu}-cox2, com uso dos primers E2 (5'- GGC AGA ATA AGY GCA TTG-3') e H2 (5'-CAA TAT CAT TGA CC-3') (Garnery et al., 1993). A reação foi realizada num volume total de 25 µL composta pelos seguintes reagentes:

- 2 µmol de dNTPs
- 20 µmol de MgCl₂
- 0,75 unidades de Taq DNA polimerase (Bioron)
- 0,2 pM de cada primer
- 2,5 µL de solução tampão (Bioron)
- 1 µL de DNA

A PCR foi realizada no termociclador T100 (Biorad™) com a configuração de 94°C por 5 minutos seguida de 35 ciclos a 92°C por 45 segundos, 48°C por 45 segundos e 62°C por 2 minutos. Após os 35 ciclos, procedeu-se a uma etapa final de 65°C por 20 minutos. Com o objetivo de verificar se houve amplificação, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose de 1% dos produtos PCR (Anexos: Figura S2). Os produtos PCR foram enviados para a STABVIDA Inc. (Portugal) para a realização do sequenciamento direto pelo método de Sanger. As sequências do mtDNA foram verificadas manualmente usando o software MEGA X (Anexos: Figura S3) (Kumar et al., 2018).

Para a identificação dos haplótipos, foi utilizada a ferramenta BLAST (NCBI-blastn) da base de dados *The National Center for Biotechnology* (NCBI), considerando sempre o resultado com maior similaridade (Morgulis et al., 2008).

2.2. Dados meteorológicos

A obtenção das variáveis climáticas foi feita através de uma estação meteorológica instalada no apiário composta por um pluviômetro, anemômetro (Figura 7). Os dados meteorológicos eram enviados diariamente, juntamente com os dados das balanças automáticas (XLOG bee SMS/GPRS Beehive Scale – Micro EL®), por meio de mensagem de texto para um telemóvel, com quatro leituras: às 2:00, 8:00, 14:00 e 20:00 horas.



Figura 7: I – Estação meteorológica e II – balança automática instalada no apiário na aldeia de Gimonde.

2.4. Força da colônia

Para a avaliação da força da colônia foram adotados alguns dos protocolos propostos por Büchler et al., (2013) no âmbito do projeto Europeu H2020 designado *Sustainable Management of Resilient Bee Populations – SMARTBEES*. Para a avaliação do número de quadros cobertos de abelhas adultas visto de cima, considerou-se que um grau de cobertura no topo do quadro de 70% correspondendo a um quadro de abelhas adultas (Figura 8). O número de quadros com criação foram contabilizados tendo em conta a ausência ou presença da mesma (ovos, larvas e criação operculada). O quadro central teve sua avaliação quanto à quantidade de criação, designada por compactação, numa uma escala de 1 a 4, sendo as taxas de ocupação de <25% (classe 1), 25-50% (classe 2), 50-75% (classe 3) e > 75% (classe 4) (Figura 9). Para realizar a padronização do tamanho dos quadros considerou-se que dois quadros de meia alça são equivalentes a um quadro de ninho no modelo de colmeia *Langstroth*.

A produção de mel por colmeia foi calculada pela diferença do peso antes e depois da cresta em 6 de setembro de 2018.

A evolução diária do peso das colmeias foi obtida através de balanças automáticas anteriormente citadas. Para uma melhor visualização dos dados foi realizada a subtração do menor peso de cada colmeia durante o inverno anterior e das meias alças vazias colocadas ao longo do período ativo.



Figura 8: Quadros cobertos de abelhas adultas visto de cima.



Figura 9: Compactação da criação do quadro central avaliado com nível 4 (>75% de ocupação).

2.5. Varroose

Para o monitoramento da infestação das colmeias pelo ácaro *V. destructor* foi utilizado o teste do açúcar, de acordo com o protocolo do SMARTBEES (Büchler et al., 2013, Dietemann et al., 2013). Para a execução do teste do açúcar foram colhidas aproximadamente 50g de abelhas para um recipiente com tampa de rede fina que deixava apenas passar o açúcar e a *V. destructor* (Figura 10). No mesmo foram adicionados 30g

de açúcar em pó o qual era deixado a repousar por alguns minutos de modo que o açúcar permitisse a libertação da *V. destructor* forética. O recipiente era agitado e invertido para uma folha de papel branco de forma a permitir a passagem do açúcar e dos ácaros. Os ácaros caídos na superfície branca eram contados. A taxa de infestação foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de infestação (\%)} = \frac{(\text{Número total de ácaros} \times 10)}{(\text{Peso líquido das abelhas})}$$

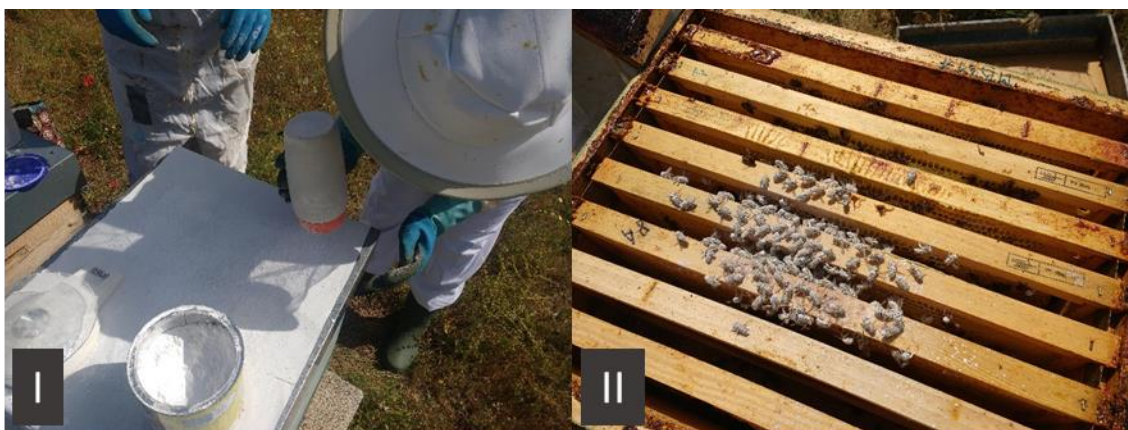


Figura 10: Teste do açúcar em pó. I – recipiente com as abelhas e o açúcar; II – devolução das abelhas ao ninho.

2.3. Monitoramento interno das colônias

O acompanhamento interno das colônias foi feito através da utilização de sensores higrotérmicos (*ibuttons*- Plug&Track by Proges Plus®) para medir a temperatura e umidade interna das colmeias. Devido a limitações em relação a disponibilidade de *ibuttons* foram acompanhadas apenas 10 das 12 colmeias em estudo. Para representação destes dados foram realizadas médias diárias.

2.6. Nosemose

A identificação molecular da Nosemose foi realizada no laboratório do Centro de Investigação Apícola y Agroambiental de Marchamalo, Espanha. O DNA foi extraído a

partir de um conjunto de 60 abelhas, de cada uma das colônias, colocadas num saco estéril (c/ filtro) com a adição de 6 mL de água de PCR, para posterior maceração num equipamento apropriado (Stomacher 80). O macerado foi transferido para tubos de 5 mL, e daqui para uma placa 96 poços com esferas de vidro. Esta placa foi colocada posteriormente um agitador mecânico a uma frequência de 30 Hz durante 1 minuto e 30 segundos com uma pausa de 30 segundos após o primeiro minuto (Tissuelyser). A etapa final da extração é a preparação das amostras para a PCR, que consiste na transferência de 50 µL do macerado para uma placa (96 poços) previamente preparada com 50 µL de TE (99 mL de água de PCR + 1 mL Tris-EDTA (10 µmol Tris-HCL pH 8.0; 1 µmol EDTA)). A placa com as amostras é posteriormente colocada a 95°C durante 20 minutos. Este último passo e o passo do Tissuelyser têm a função de romper os tecidos de modo a que fique disponível uma maior quantidade de DNA. A PCR foi preparada com três pares de primers de modo a amplificar simultaneamente um fragmento de 119 pb do gene COI da *A. mellifera*, o qual funciona como controlo interno, um fragmento de 218-219 pb específico da *N. ceranae* e outro de 321 pb de *N. apis* (Tabela 1), tal como descrito por Martín-Hernández et al., (2012).

Tabela 1: Sequências oligonucleotídicas dos primers (F: *forward*; R: *reverse*) e tamanho esperado dos fragmentos amplificados por PCR.

Nome do primer	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
218 CER-F	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218-219	Martín-Hernández et al., (2007b)
218 CER-R	5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG		
321 APIS-F	5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTAATATGTA-3'	321	Martín-Hernández et al., (2007b)
321 APIS-R	5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACATATG-3'		
COI-F	5'-GGGCCAAGACCAGGAACCTGGAT-3'	119	Meeus et al., (2010)
COI-R	5'-GCCGCGAAATTCCTGATATATGAAGAAAA-3'		

Foram usadas placas de PCR de 96 poços específicas para a deteção de *Nosema* spp.. Estas placas vêm preparadas com os primers e restantes reagentes da PCR gelificados (Biotools Biotechnological & Medical Laboratories SA). Assim, as reações foram preparadas pela simples adição de 22,5 µL de água de PCR e 2,5 µL de DNA. Os produtos PCR foram amplificados no termociclador Mastercycler® ep gradient S apparatus (Eppendorf) usando o seguinte perfil de temperaturas: 6 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 61,8°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos com uma extensão final de a 72°C por 7 minutos.

Após a PCR, a análise de fragmentos foi realizada no equipamento automático de eletroforese QIAxcel Advanced da Qiagen® (Figura 11).

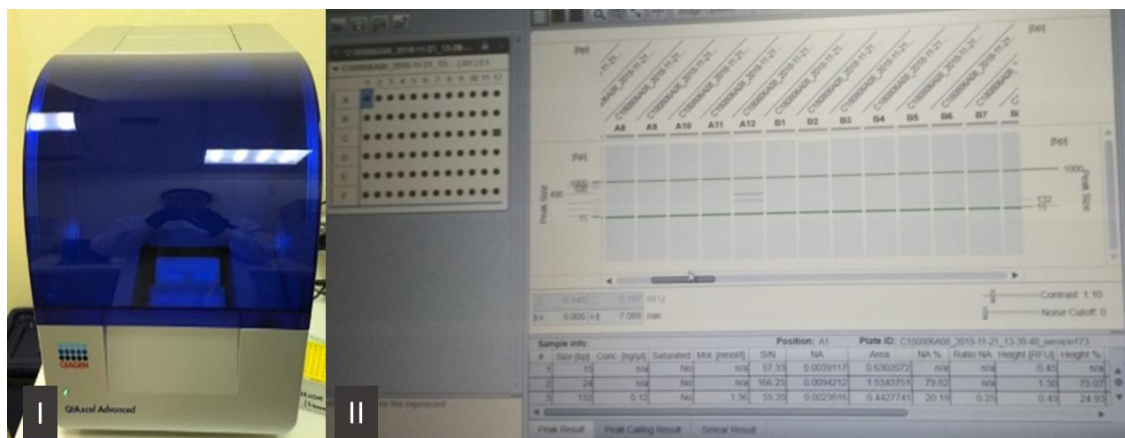


Figura 11: I – equipamento automático de eletroforese QIAxcel Advanced; II – exemplo do resultado obtido.

Para as colônias em que o resultado da análise coletiva das 60 abelhas demonstrou ser positivo para *Nosema* spp., foram escolhidas 25 abelhas para detecção individual de modo a determinar-se a taxa de infecção de cada uma das colônias (Figura 12). Para tal, o DNA foi extraído e amplificado para as 25 abelhas individualmente usando os métodos descritos anteriormente.

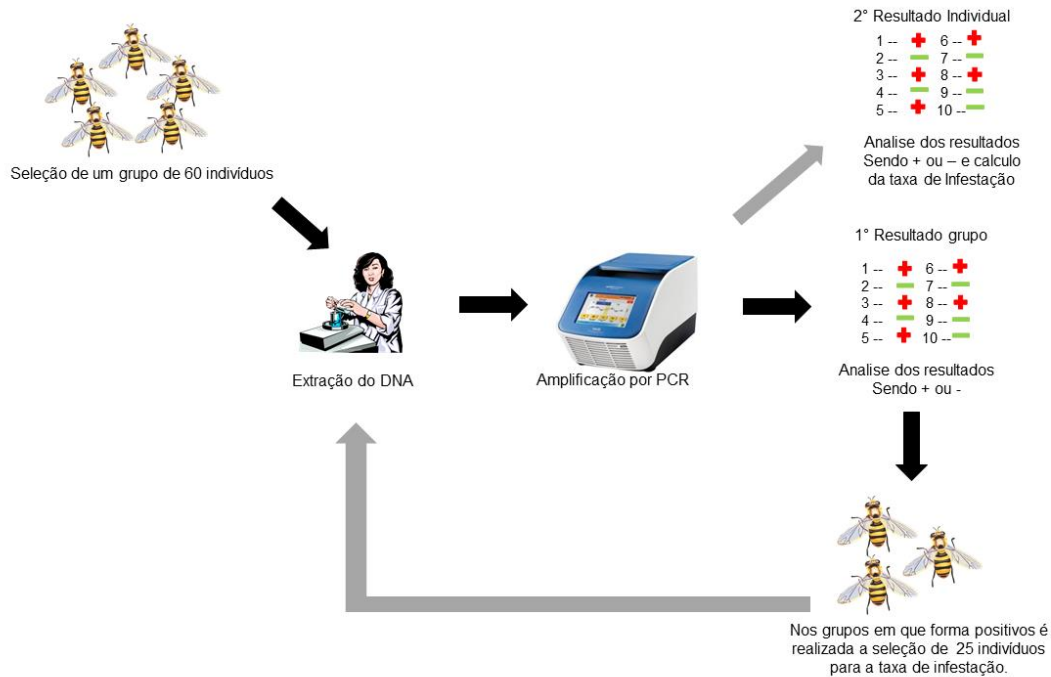


Figura 12: Esquema para a detecção molecular da *Nosema* ssp. em *A. mellifera*. As setas em cinza se referem à análise individual das colônias positivas detectadas pela análise das 60 abelhas (setas em preto).

2.7. Análise das relações

Os dados após agrupados por colmeias e variáveis foram submetidos a uma análise de trilha seguindo o modelo de Cruz e Regazzi (2012), com o uso do software estatístico GENES (Cruz, 2013). Este procedimento teve como objetivo o estudo de relações de causa e efeito, que utilizam uma análise de correlação envolvendo variáveis dependentes e independentes num modelo de regressão múltipla, e medindo os efeitos diretos e indiretos de cada uma das variáveis de interesse.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DNA mitocondrial

A análise das sequências da região intergênica tRNA^{leu}-cox2 das 12 colônias em estudo revelaram a presença de 9 haplótipos diferentes (Tabela 2), dos quais 8 (67%) pertenciam à linhagem Africana (A) e 4 (33%) à linhagem do Norte e Ocidente da Europa (M).

Vários estudos demonstraram a coexistência das duas linhagens na Península Ibérica, sendo que a linhagem A é característica da metade sudoeste, englobando Portugal, e a linhagem M está presente principalmente na metade nordeste (Franck et al., 1998; Miguel et al., 2007; Cánovas et al., 2008; Pinto et al., 2012, 2013; Chávez-Galarza et al., 2015, 2017). A coexistência de duas linhagens no apiário de Gimonde pode ser explicada pela sua origem geográfica. O apiário experimental do IPB foi montado em 2015 com colônias compradas em diferentes locais. As colônias que foram compradas no País Basco apresentaram ser da linhagem M (B27, B43 e B44) enquanto as colônias que foram compradas no Algarve ou Gimonde expressaram ser da linhagem A. Com a exceção da B16 que têm como origem inicial Bragança e demonstrou pertencer à linhagem M (M69) e a B52 que têm como origem País Basco e apresentou linhagem A (A41). A presença das mesmas linhagens ao longo de gerações deve-se à forma de transmissão do mtDNA, totalmente via materna, sendo que não existiu interferência humana nos processos de substituição de rainhas, isto é, substituição e/ou enxameamento ocorreu de forma natural.

Ao longo do tempo tem-se verificado um aumento da comercialização de rainhas de linhagem C (*Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera ligustica*), pois essas colônias são preferidas por muitos apicultores devido às suas características produtivas e comportamentais. Esta interferência humana tem levado à substituição das subespécies nativas e à perda diversidade genética localmente adaptada em muitos países Europeus (Pinto et al., 2014, Henriques, 2018a; 2018b). É de realçar que no apiário em estudo não se observou a existência da linhagem C. A inexistência de linhagem C está de acordo com os diversos trabalhos realizados com a abelha ibérica que mostram que esta abelha tem mantido a sua integridade genética (Pinto et al., 2013; Chávez-Galarza et al., 2015, 2017a).

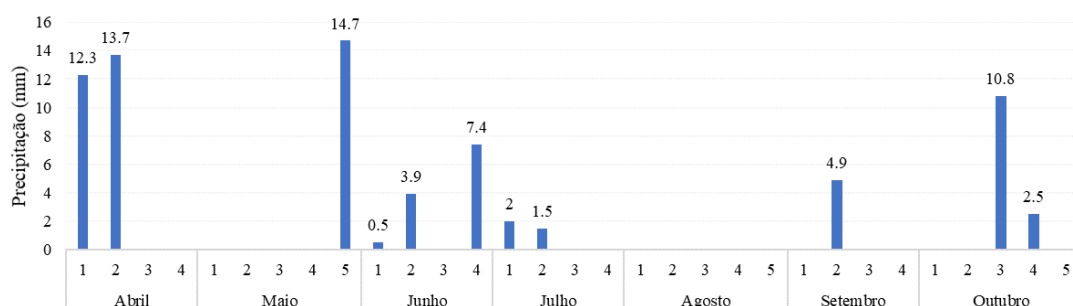
Tabela 2: Distribuição dos haplótipos das colmeias em estudo do apiário de Gimonde.

Nome da Colônia	Haplótipo
A35	A1
A4	A1
B16	M69
B27	M8
B35	A29
B43	M8
B44	M4
B52	A41
BL6	A1
BR5	A8
CB4	A9
PT1	A20

3.2. Dados meteorológicos

O clima do distrito de Bragança é caracterizado por verões secos e invernos rigorosos e húmidos (IPMA, 2018b). Na Figura 13 encontra-se graficamente representado a distribuição das chuvas ao longo do período em estudo. Nas duas primeiras semanas de abril observou-se um acumulado de 12,3 mm e 13,7 mm respetivamente, seguido de um período de seis semanas sem precipitação. A partir do final de maio e até às primeiras semanas de julho ocorreram precipitações com alguma regularidade. Após a segunda semana de julho ocorreu novamente um longo período de estiagem (oito semanas) tendo sido interrompida por uma precipitação de 4,9 mm na segunda semana de setembro. De seguida ocorreram mais quatro semanas sem precipitação onde apenas na terceira e quarta semana de outubro voltou a ocorrer precipitação.

Figura 13: Precipitação semanal acumulada durante o período de abril a outubro de 2018, onde de 1 a 5 representam a semana de cada mês.



Em relação à temperatura, pode-se observar na Figura 14 que o local em que o apiário se encontra possui uma extensa amplitude térmica saindo de mínimas de 0,5°C no mês de abril e outubro e máximas de 42,8 °C durante o mês de agosto. Essa variação ao longo do período em estudo acabara por afetar o forrageamento das abelhas que é otimizado para temperaturas entre os 12-14°C e 30°C (Moreira & Farinha, 2011). Pode-se observar na Figura 14 que entre julho e setembro existem pontos que superam os 30°C com ressalte para o início de agosto que teve temperaturas superando os 40°C acabando por demandar um maior esforço para o controle térmico da colmeia (Ellis, 2008) bem como a diminuição no forrageamento.

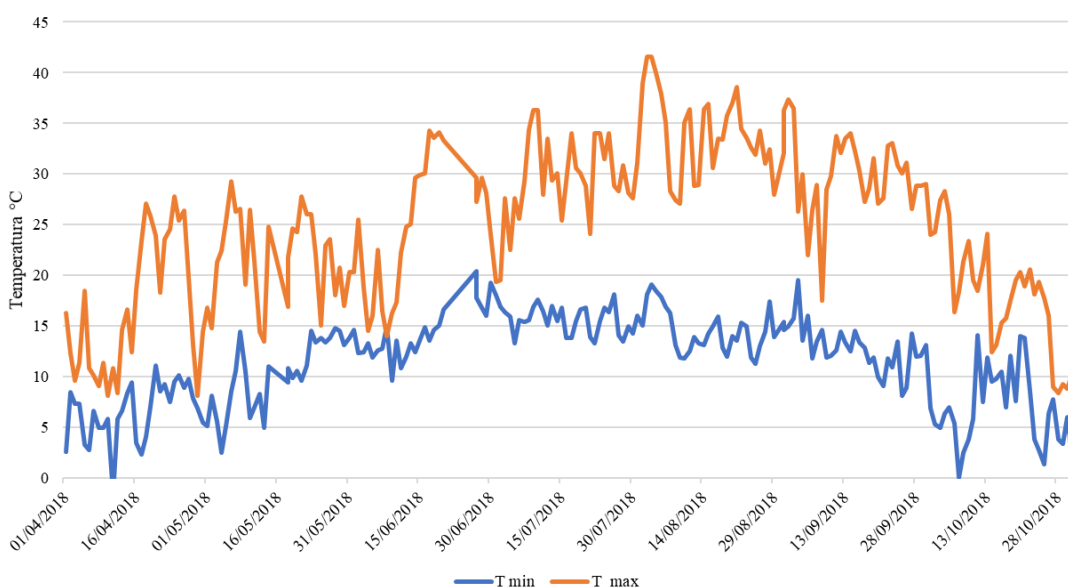


Figura 14: Variação da temperatura no período de abril a outubro de 2018, onde a linha azul regista as temperaturas mínimas e a linha laranja as temperaturas máximas fornecidas pela estação meteorológica do apiário de Gimonde, Bragança.

Na Figura 15 encontra-se graficamente representado as médias diárias da umidade relativa, velocidade do vento e temperatura ao longo do período. A umidade relativa demonstrou ter uma grande variação ao longo do período em estudo sendo afetada pelo vento e a chuva mas em nenhum momento ficou abaixo de 22% que seria um ponto crítico para as colônias como apontado por Mattos & Souza, (2018). A velocidade do vento teve uma variação de 1,5 km/h a 78 km/h nos meses de julho e de abril, respetivamente. Este valor máximo é caracterizado como grau 9 na escala de Beaufort (Lindau, 1995). Essa variação na velocidade do vento é causada pelo posicionamento geográfico do norte de Portugal, esse que se torna rota de correntes de ar vindas tanto do norte da África como das regiões mais próximas ao polo norte (IPMA, 2018b). As condições climáticas afetam

as colônias de *A. mellifera* pois mediam o forrageamento e controle térmico dentro da colmeia além da incidência de inimigos naturais e doenças (Le Conte, 2008).

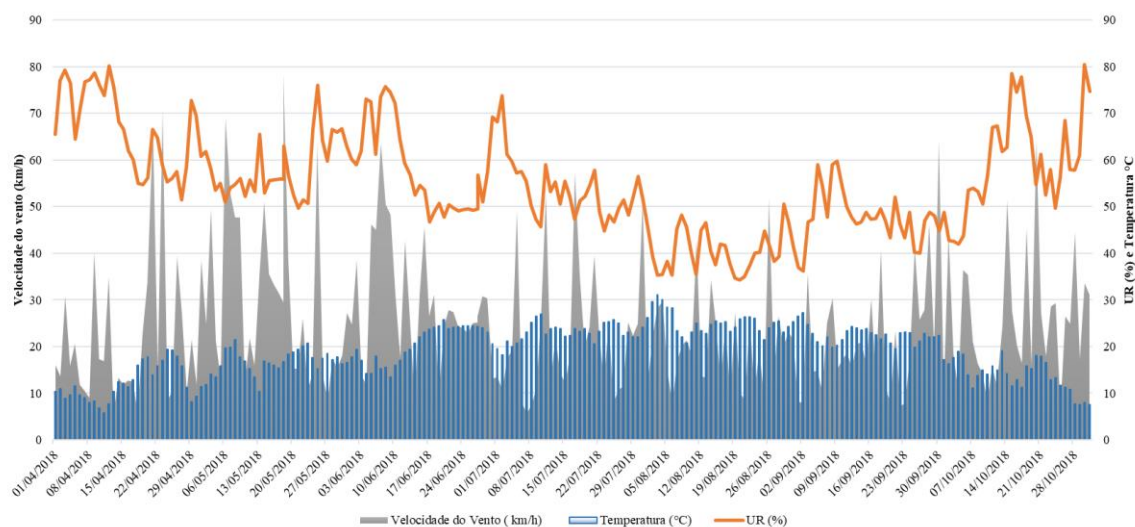


Figura 15: Médias diárias da velocidade do vento (km/h), temperatura (°C), e umidade relativa (%), registadas na estação meteorológica do apiário de Gimonde, Bragança.

3.4. Força da colônia

Os resultados da avaliação do número de quadros cobertos com abelhas adultas estão representados na Figura 16 e nos Anexos (Tabela S5). O tamanho da população adulta atingiu valores máximos no verão (agosto na maioria das colônias), com um decréscimo com a aproximação do inverno. Na avaliação de 23 de agosto de 2018 observou-se que 3 das 12 colônias se destacaram, nomeadamente a colônia B43, que atingiu uma ocupação de 25 quadros com abelhas, PT1 e A4 que ocuparam cada uma 20 quadros, demonstrando ser as colônias com maior população.

Na última avaliação (outubro), 7 das 12 colônias demonstraram uma ocupação do ninho entre 7 a 10 quadros. A colônia B52 demonstrou uma ocupação menor de 6 quadros de população adulta. Os estudos realizados por Louveaux et al. (1966) apontaram um comportamento semelhante com aumento da população durante a época com

temperaturas mais elevadas (verão) e um declínio na população com a diminuição da temperatura (inverno).

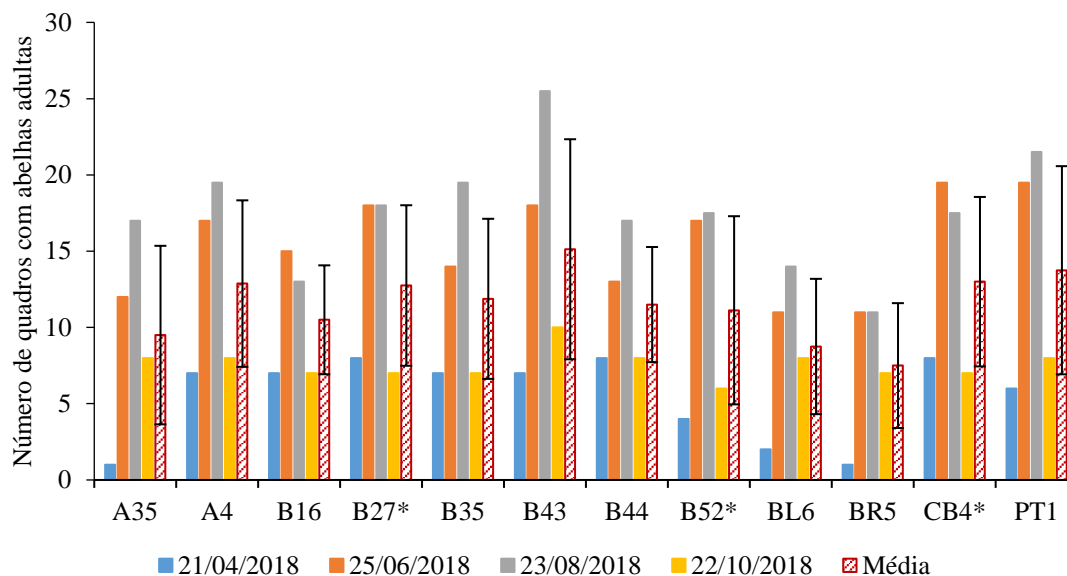


Figura 16: Número de quadros cobertos com abelhas adultas nas datas de cada avaliação. Barra a vermelho com padrão representa média \pm desvio-padrão. * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

Relativamente ao número de quadros com criação (Figura 17), as colônias A35, BR5 e A4 apresentaram 3 quadros com criação e a BL6 continha apenas 2 quadros de criação no mês de abril, sendo as colmeias com menor quantidade neste período. Na avaliação seguinte (junho) pode-se observar os valores mais elevados de criação na maioria das colmeias, algumas com uma ocupação de 10 (B52) e 9 (A4) quadros. As restantes nesse período mostraram uma variação entre 6 a 8 quadros com criação.

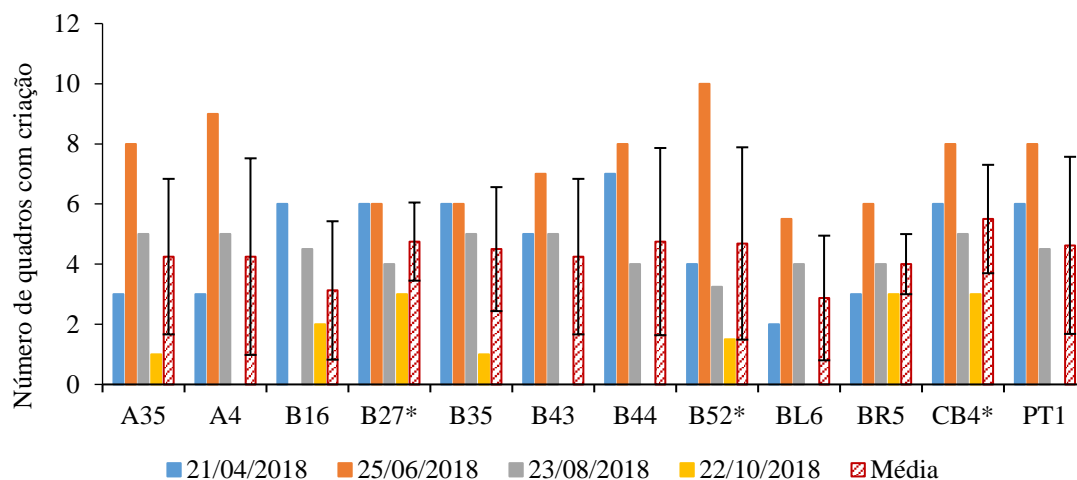


Figura 17: Número de quadros com criação nas datas de cada uma das avaliações no ano de 2018; Barra a vermelho com padrão representa média \pm desvio-padrão. * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

Em agosto, é possível observar uma diminuição no número de quadros com criação, em que a colônia A35 diminuiu de 8 para 5, A4 de 9 para 5, B44 e PT1 8 para 4 quadros. Esta diminuição deve essencialmente à possível paragem da postura da rainha devido às temperaturas elevadas registadas nesta altura do ano (>30°C, Figura 14).

Na última avaliação em outubro observa-se de forma mais acentuada a redução do ninho como medida de preparação para o inverno, assim vemos que as colônias A4, B43, B44, BL6, e PT1 já não apresentaram quadros com criação e todas as demais variaram entre 2 a 3 quadros. Uma peculiaridade que pode ser observada é que a colônia B16 em abril possuía 6 quadros com criação e em junho não apresentou nenhum devido à ocorrência natural de substituição da rainha. No entanto em agosto volta a existir postura (4,5 quadros de criação).

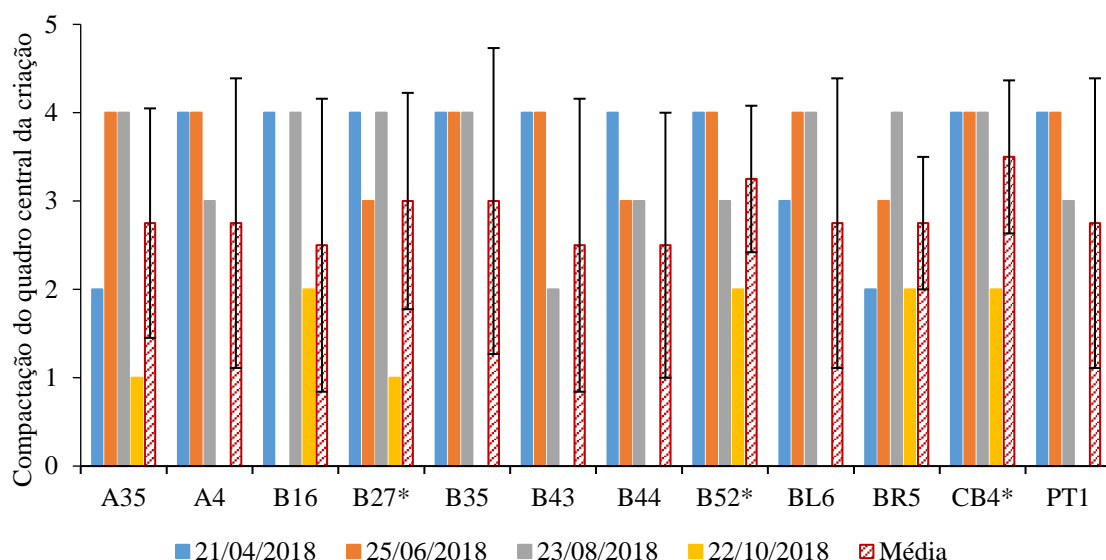


Figura 18: Compactação da criação no quadro central nas datas de cada uma das avaliações no ano de 2018; Barra em vermelho com padrão representa média \pm desvio-padrão. * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

A ocupação quadro central de criação foi observada através da escala de compactação da mesma (Figura 18). Na avaliação de abril, 2 das 12 colônias (A35 e BR5) foram classificadas com nível 2 de compactação (25-50% do quadro coberto com criação), uma (BL6) avaliado com 3 (50-75%), já as demais foram classificadas com o nível 4 (> 75%). Nesta avaliação não foi registada nenhuma colônia com o nível de compactação mínimo, 1 (< 25%).

Na avaliação seguinte, a maioria das colônias foram classificadas com o nível 4 de compactação da criação, à exceção da B16 porque não apresentava criação, B27 e B44 que demonstrou uma redução de 4 para 3 e a BR5 que apenas aumentou de 2 para 3.

Embora em agosto o número de quadros de criação tenha diminuído, a compactação da criação manteve-se ao nível da avaliação anterior para 5 das 12 colônias (A35, B35, B44, BL6 e CB4). À exceção da BR5 que aumentou o nível de compactação de 3 para 4, as demais diminuíram um a dois níveis de compactação. Na avaliação de outubro as colônias que mantinham quadros de criação foram classificadas entre o nível um (A35 e B27) e dois (B16, B52, BR5 e CB4) de compactação da criação.

Assim relativamente à dinâmica de crescimento de uma colônia, tal como descrito em Hatjina et al., (2014), observa-se que a população de abelhas adulta tende a ser maior no outono (outubro) do que na primavera (abril), atingindo o seu valor máximo no verão. No que diz respeito à quantidade de criação, observa-se o oposto, a quantidade de criação tende a ser maior na primavera do que no outono, sendo o valor máximo também registado no verão.

A produção total de mel foi de 454,13 kg, destacando-se as colônias CB4, B35 e A4 com uma produção superior a 50 kg de mel (Figura 19 e Anexos: Tabela S4). O menor desempenho na produção de mel foi observado para as colônias BR5 e BL6 que produziram 15,37 kg e 16,76 kg, respetivamente. Esses valores ainda assim ficam próximos da média nacional de produção de mel (\cong 17kg/colmeia, reportado pelo relatório do programa apícola nacional 2016-2019 (Ministério da Agricultura Floresta e do Desenvolvimento Rural, 2016)).

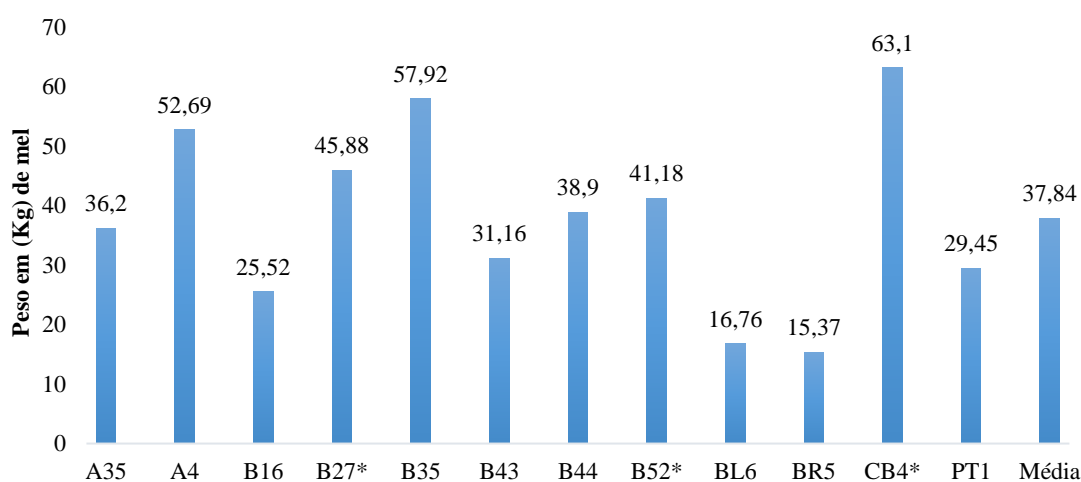


Figura 19: Estimativa da quantidade de mel produzida por cada colmeia; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

Com base nas informações recolhidas pelas balanças sobre a evolução dos pesos de cada colônia verifica-se que a partir de 12 de maio houve um aumento expressivo dos pesos (Figura 20 e Anexos: Tabela S2). Pode-se ainda observar o maior ganho de peso

nas três semanas seguintes nas colônias B35 e CB4, esse aumento pode estar relacionado com a precipitação que ocorreu nesse período influenciando a qualidade e quantidade da florada nesse momento tal como apresentado por Silva et al., (2013) num estudo que abrangeu abelhas de 3 famílias diferentes (Apidae, Andrenidae e Halictidae) numa floresta secundária constituída por mata atlântica no Brasil. As colônias B35 e CB4 revelaram um crescimento mais acentuado que as demais. Esse aumento é confirmado com a produção de mel, sendo duas das colônias que superaram os 50 kg (Figura 19).

As colônias A35, BL6 e BR5 demonstraram um desenvolvimento mais gradual de abril até julho. Após esse período apenas a A35 passou por um período de aumento de peso mais acentuado que é explicado também pelo número de quadro com abelhas adultas (Figura 18), uma vez que em abril a colônia possuía apenas 2 quadros cobertos de abelhas adultas, a menor população observada, e em junho e agosto teve um aumento para 12 e 17 quadros com abelhas adultas, respetivamente.

Na avaliação de 25 de junho verificou-se que a colônia B16 não tinha rainha, no entanto a mesma já estava a criar uma nova rainha de substituição. A partir dessa data notou-se que o peso não aumentou até o momento da cresta, pois ocorre naturalmente um atrasado no desenvolvimento da colônia quando a rainha é substituída

Ainda em relação à evolução dos pesos durante o período em estudo, nota-se alguns pontos com ruído, esses possivelmente ocorreram devido ao acumulo de chuva na parte superior das caixas, ou alguma fonte de variação que pode ter sido acrescentada durante as avaliações como no caso da CB4 na avaliação de 23 de agosto.

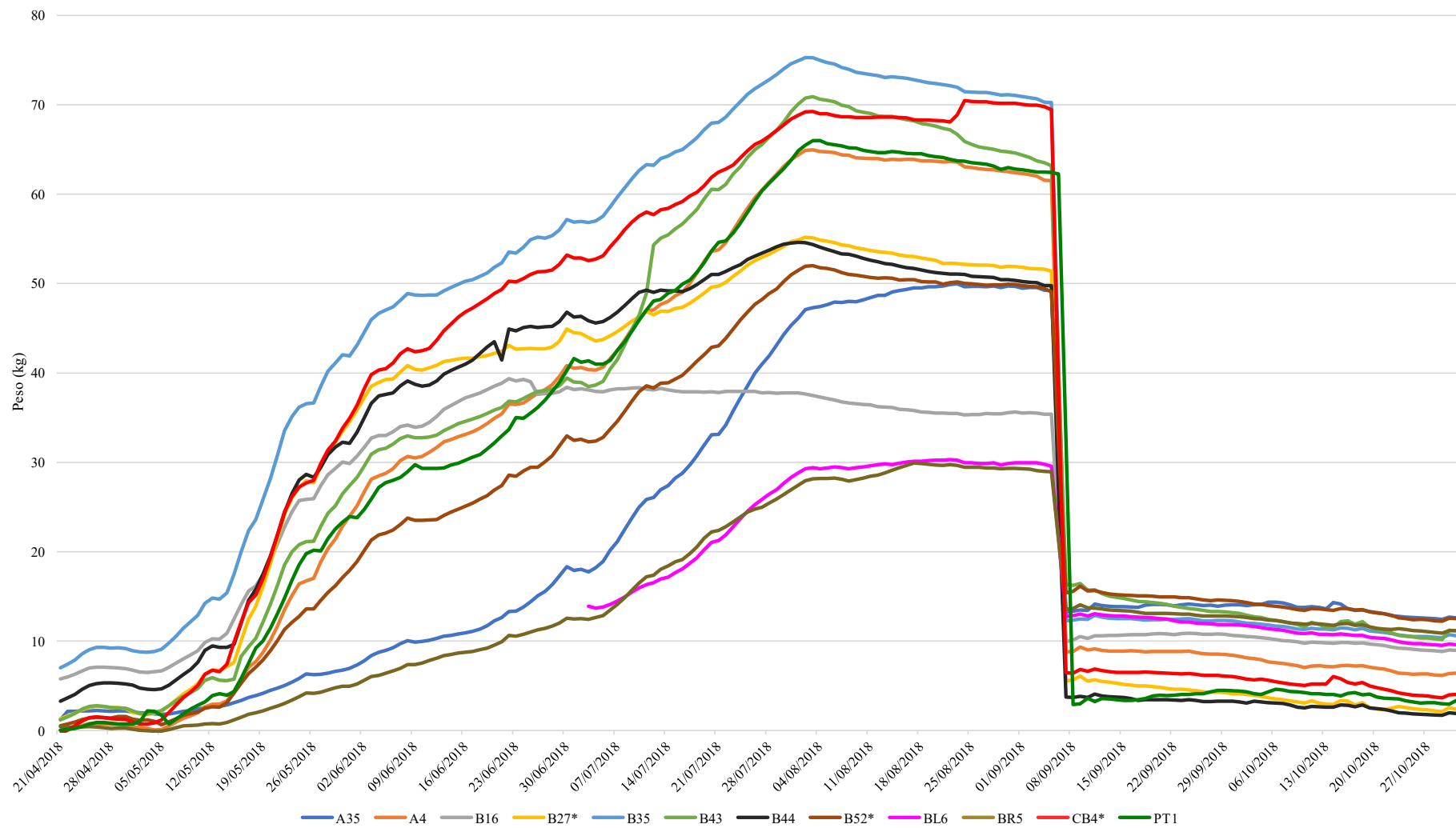


Figura 20: Evolução temporal dos pesos (média diária) de cada uma das 12 colônias de abril a outubro de 2018; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

3.3. Monitoramento interno das colônias

A análise da temperatura interna das colmeias revelou alguns pontos que saem do padrão esperado de menor variação da temperatura e da umidade relativa durante a época do ano com maior quantidade de criação (Figura 21). Pode-se observar que os sensores laterais B e C apresentaram maiores amplitudes ao longo do período em estudo, as quais podem ter sido causadas pela deslocação da criação no ninho para alguma das laterais assim os sensores passavam a uma parte da colmeia com reserva. Zacepins & Karasha (2013) reportaram um padrão semelhante, apontando que extremidades das colmeias têm um menor controle da temperatura por estarem ocupadas com reservas. As colônias B44, B35, BR5 e PT1 apresentaram maiores amplitudes térmicas no período de julho a outubro em todos os sensores. Este resultado pode ser devido à diminuição da criação que ocorre após o mês de junho de 7 quadros para 3 quadros no geral (Figura 17), o que leva as abelhas a diminuírem o controle da temperatura junto dos sensores das extremidades (Figura 21).

Um padrão que se pode observar é a estabilidade no *ibutton* central (A) durante período de maior oviposição que se iniciou em abril e se estendeu até agosto. Durante o período de desenvolvimento da criação, a temperatura se manteve entre 34°C e 35°C, próximo ao ideal descrito por Dunham (1926) e Fahrenholz et al., (1989). No entanto, no início do período de avaliação de abril a maio, observou-se uma variação considerável no *ibutton* central de 5°C, 8°C, 12°C para as colônias CB4, A35 e BR5, respectivamente, isso podendo ter ocorrido devido à quantidade reduzida de criação. Uma vez que a localização dos *ibuttons* depende desse número de quadros, então nas colônias com 3 a 5 quadros de criação, a colocação desses podem não ser completamente centrada com a criação e pode ocorrer que a criação se desenvolva mais no sentido de um dos *ibuttons* laterais no arranque do crescimento da colônia. Assim, para estas colônias onde se observou uma variação maior no *ibutton* central, a temperatura medida pelo *ibutton* B demonstrou ter um pouco mais de estabilidade e mais próxima dos valores anteriormente referidos como ideais. A movimentação dos quadros durante a avaliação da colônia também pode introduzir alguns erros na medição. Outra ocasionalidade que ocorreu foi na colônia CB4, em que o *ibutton* B apresentou defeito e a partir de 28 de junho não recolhendo dados.

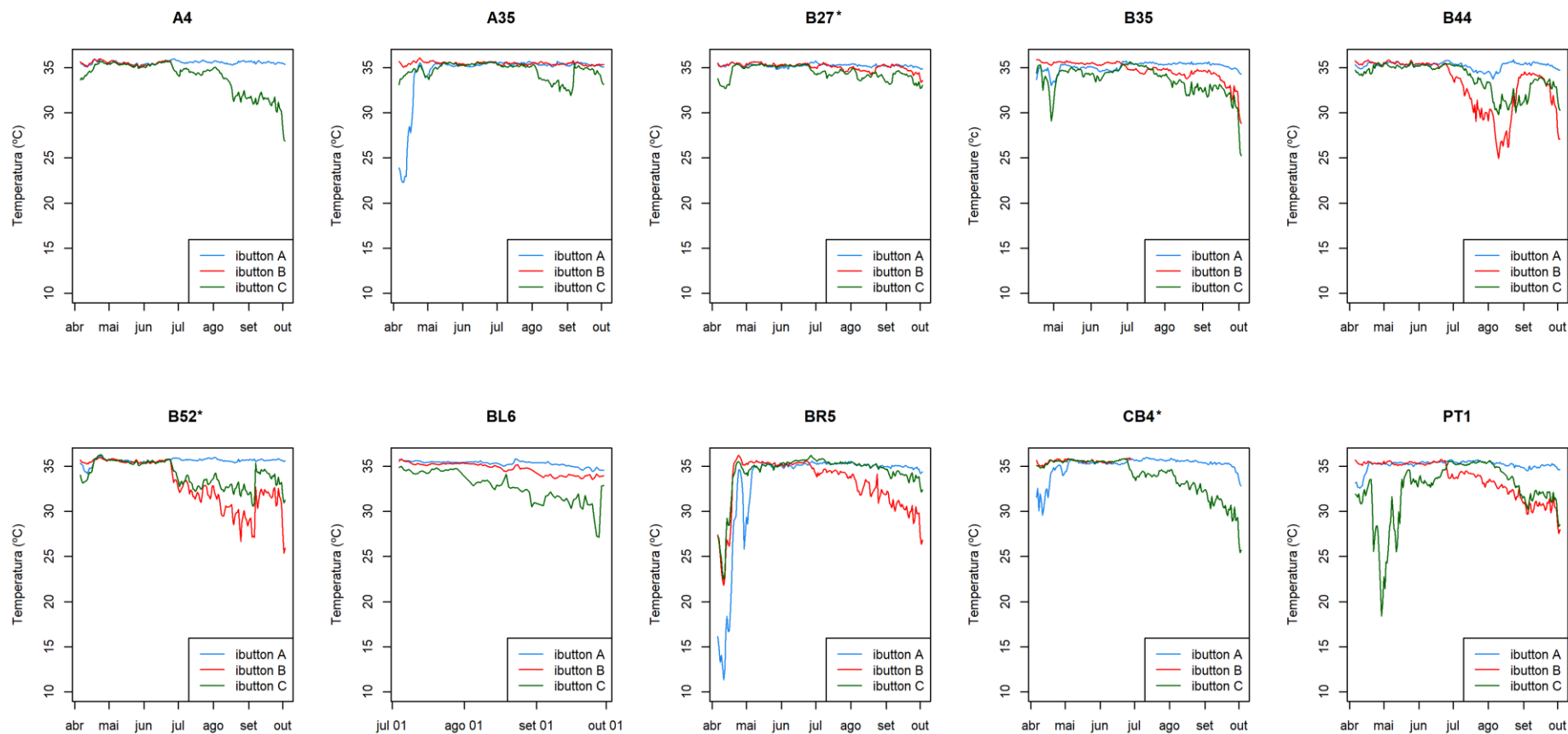


Figura 21. Média diária da temperatura interna das 10 colônias em estudo; *ibutton A* - centro da criação; *ibutton B* e *C* – extremidades da criação; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

A umidade relativa dentro da colmeia é fundamental para a sobrevivência e desenvolvimento da colônia, tendo influencia em seu estado sanitário (Doull, 1976).

A umidade registada pelo *ibutton* central (A) nas colônias A4, B35 e CB4 apresentou maiores amplitudes tendo variado entre 8% e 20%. Tal como para a temperatura, os *ibuttons* laterais também demonstraram uma maior variação de umidade nomeadamente de 15% a 25%, nas colônias BL6 e BR5, respetivamente. A colônia B27 foi a única apresentou um pico de umidade relativa de 80,2% em junho coincidindo com a data próxima de umas das avaliações ao qual possivelmente se deve a limitações do sensor uma vez que nenhuma outra colônia apresentou algum padrão similar. Essas flutuações nos *ibuttons* laterais podem estar também relacionadas com o amadurecimento do mel, ou ainda ter sido causadas pela ventilação necessária para evacuar o excedente de vapor de água gerado pela concentração de néctar tal como proposto por (Human et al., 2006) no estudo sobre a regulação da umidade dentro do ninho em *Apis mellifera scutellata*.

Como os sensores foram colocados nos quadros de criação não se esperava uma flutuação tão grande e um padrão tão diverso, em que cada colônia se comportou de forma única. Apenas as colônias A35, B44, B27, BL6 e PT1 mantiveram o *ibuttons* A e B estáveis, próximos ao 50% a 60% (Ellis, 2008).

Podemos ainda observar uma semelhança no comportamento das colônias BR5, B27 e B44 que de abril a julho apresentaram uma grande variação na umidade e após o mês de julho, essa variação se equilibra e se mantém estável até o final do período. Os sensores B e C demonstraram comportamentos específicos para cada colônia, podendo isso estar relacionado com a população.

Uma vez que a umidade no interior do ninho depende de vários fatores como por exemplo a disponibilidade de água que dificulta essa regulação ou existência de um compromisso entre a regulação da temperatura e a troca de gases respiratórios que podem influenciar o nível ótimo de umidade 40% como relatado por Ellis, (2008) Esta, ao contrário da temperatura, não é controlada de forma tão restrita, sendo as abelhas apenas capazes de ajustar a umidade dentro de limites considerado sub-ótimos tal como foi observado também por Human et al., (2006).

Para essa variável os sensores em questão apresentaram a limitação por demonstrarem ter alguns pontos que saem do padrão. Esses coincidindo com as datas das avaliações e da cresta, além da data de 24 de junho de 2018 em que foi necessário realizar a retirada dos *ibuttons* para descarregar os dados e liberar a memória. Ao serem inseridos

nos quadros com criação e acabam sendo molhados por geleia real e pelos fluidos das larvas. Dessa forma, têm um maior tempo para a estabilização dos dados até que as próprias abelhas o fixem no local. De modo a minimizar o erro associado à colocação dos *ibuttons* bem como interferências causadas pelos momentos de avaliação da colônia, foram eliminados os dados relativos a esses momentos.

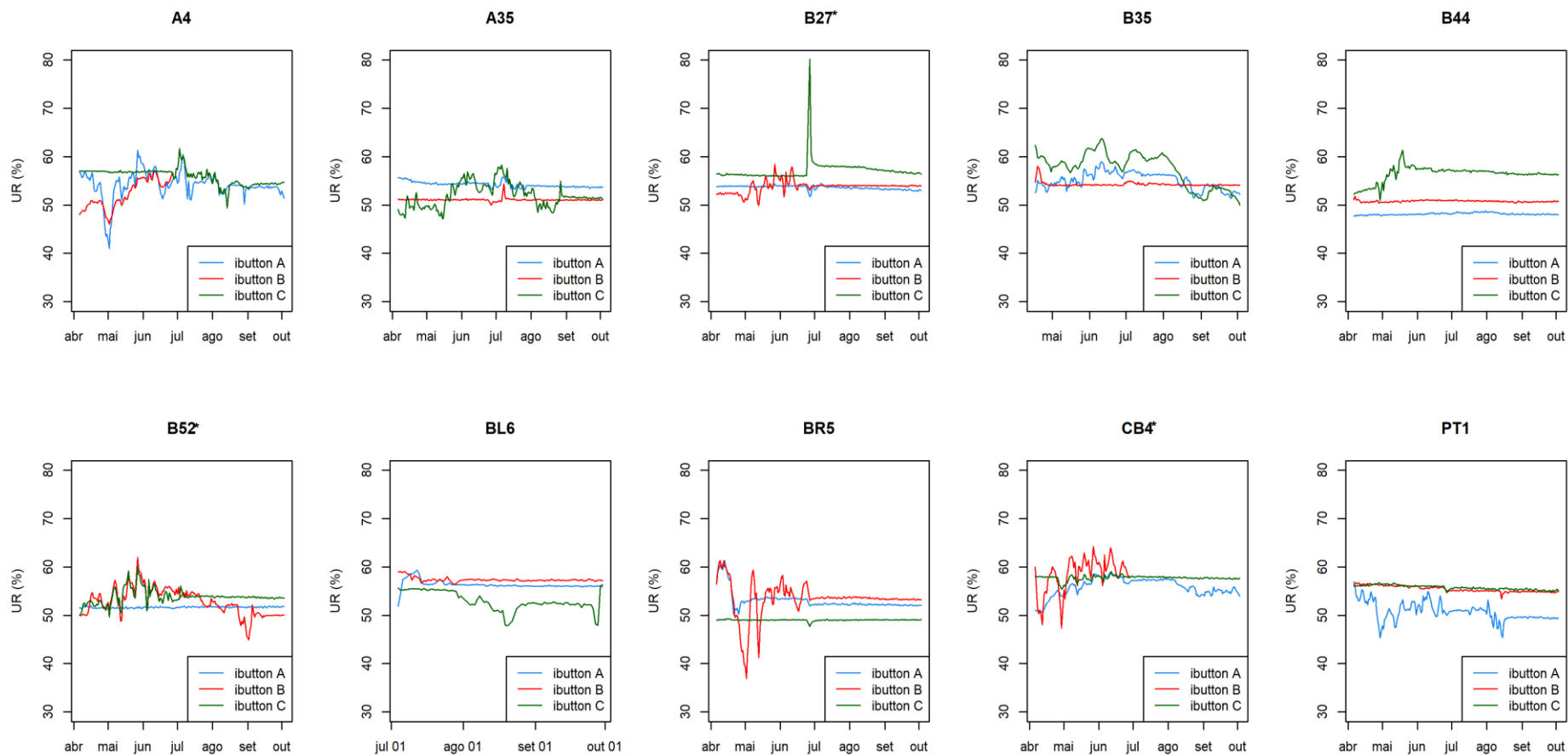


Figura 22: Umidade média diária interna das 10 colônias em estudo onde o *ibutton A* estava posicionado no centro da criação e os *ibutton B* e *C* nas extremidades; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

3.5. Varroose

O nível de infestação de *V. destructor* teve a sua primeira avaliação apenas em 25 de junho, onde o método proposto por Büchler et al., (2013) propõe que esse seja avaliado a partir desse período pois é a partir desse ponto que os níveis de infestação tendem a ser mais elevados. Conforme se pode observar na Figura 23 e em Anexos: Tabela S3, a presença de *V. destructor* foi detectada nas 12 colônias, apesar de apenas 5 apresentarem taxas superiores a 2% em pelo menos uma das avaliações. A colônia B52 apresentou a maior taxa de infestação (9,6%) na avaliação de outubro, esse nível de infestação requeria tratamento imediato pela recomendação de Honey Bee Health Coalition (2015) e Columbia (2015), que considera que no decréscimo da população (outubro) valores superiores a 3% indicam uma grande probabilidade de se perder a colônia. Em outubro observou-se ainda 4 colônias com valores preocupantes, a B52 com 9,6% seguida da B27 com 6,2%, BR5 com 4,44%, B35 com 3,77% e PT1 com 3,07%. Destas a B27 e a B52 acabaram por morrer. No entanto, em seu estudo com tratamentos sanitários Gregorc et al., (2018) encontrou maiores níveis de infestação nesse período do ano com diferentes níveis de mortalidade.

Para além disso, observa-se um desfasamento entre o pico de população que ocorre em agosto (Figura 18) e pico de infestação de Varroa para a maioria das colônias em outubro. Tal seria de esperar uma vez que o ciclo da Varroa está atrasado relativamente ao pico de população entre um a dois meses (Honey Bee Health Coalition (2015)). No entanto, foi aplicado tratamento a 6 de setembro de 2018 com tiras de Apitraz®, o que nos leva a poder considerar que o tratamento aplicado não se mostrou eficaz no combate a esta doença uma vez que em outubro continuamos com taxas extremamente elevadas. Segundo outros autores Donzé & Guerin (1994) níveis superiores a 2% já podem afetar de forma grave a colônia, podendo comprometer a sua sobrevivência. Um ponto que se tem que levar em consideração que a *V. destructor* é vector de um conjunto de vírus além de estar relacionada com o CCD (Le Conte et al., 2010). Dessa forma uma possível causa do colapso de duas das colônias durante o inverno (B27 e B52) poderá estar relacionado com os elevados níveis de infestação observados na avaliação de outubro. Relativamente à colônia CB4 que também não sobreviveu ao inverno, não se observou taxas de infestação de Varroa consideradas preocupantes durante o período em estudo, sendo o maior valor observado inferior a 1%.

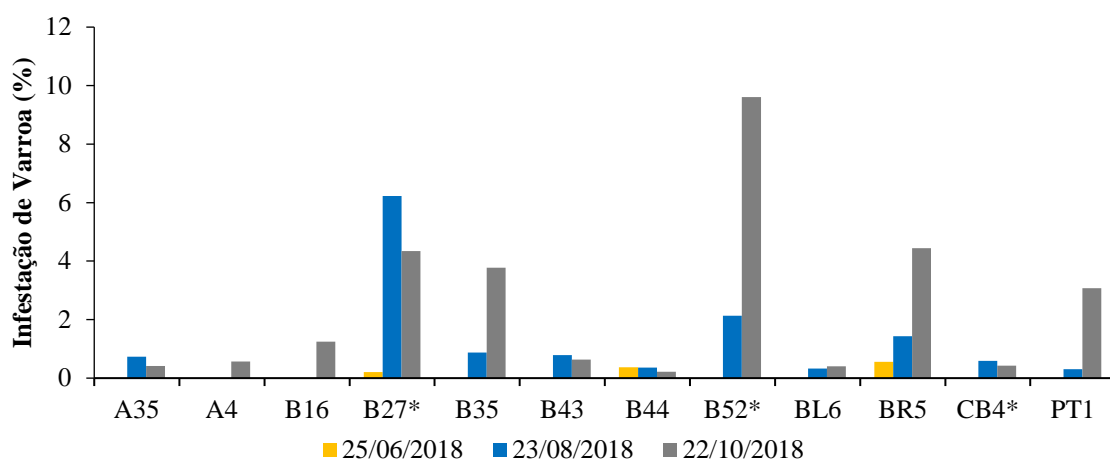


Figura 23: Porcentagem de infestação de *V. destructor*; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

3.6. Nosemose

Os resultados da detecção molecular da *Nosema* spp. no conjunto das 60 abelhas por colônia demonstrou que a maioria das colônias são positivas para a infecção de *N. ceranae*, à exceção de 5 colônias em dois períodos, nomeadamente a B27 e CB4 (23 de agosto) e A4, B16 e B44 (22 de outubro de 2018) (Tabela 3). Assim, estas 5 colônias nessas datas não foram submetidas à análise individual para a estimativa da taxa de infecção.

Tabela 3: Presença de *N. ceranae* (+) e ausência (-) de *N. ceranae* e *N. apis* para cada uma das avaliações.

Identificação Colônia	20/02/2018	21/04/2018	25/06/2018	23/08/2018	22/10/2018
A35	+	+	+	+	+
A4	+	+	+	+	-
B16	+	+	+	+	-
B27	+	+	+	-	+
B35	+	+	+	+	+
B43	+	+	+	+	+
B44	+	+	+	+	-
B52	+	+	+	+	+
BL6	+	+	+	+	+
BR5	+	+	+	+	+
CB4	+	+	+	-	+
PT1	+	+	+	+	+

A taxa de infecção de *N. ceranae* de cada colônia, apresentou dois momentos em que os valores de infecção se destacaram: (i) em abril, infecção foi superior a 40% para 8 das 12 colônias e de 79% para a colônia B16 (Figura 24; Anexos:Tabela S6); (ii) em outubro também ocorreu um ligeiro aumento para 7 das 12 colônias (sendo o maior valor observado para a

B43 de 52% de taxa de infecção). Com um índice elevado como esse, a tendência para o próximo período é de aumento na contaminação das demais abelhas, visto que as baixas temperaturas obrigam as abelhas a permanecerem dentro da colmeia por mais tempo obrigando-as a defecar no interior da colmeia, o que acaba por se tornar fonte de inóculo (Higes et al., 2009).

Vários estudos realizados (Martín-Hernández et al., 2007, Higes et al., 2008; Giersch, et al., 2009, Martín-Hernández et al., 2012) apontam para a falta de existência de um padrão de sazonalidade no aumento da infecção de *N. ceranae* em contraste com o padrão já conhecido para a *N. apis* (taxas de infecção elevadas na primavera e aumento em outubro embora em menor escala). No entanto, os resultados apresentados neste estudo sugerem a existência de um padrão de sazonalidade corroborando outros dois estudos (Gisder et al., 2010 e Stevanovic et al., 2013) que observaram também os valores mais elevados de infecção de *N. ceranae* na primavera e um ligeiro aumento novamente no outono.

Contudo, é ainda de realçar que ao contrário do que é conhecido para *N. apis*, que praticamente desaparece no verão (Bailey, 1955; Hornitzky, 2005), a *N. ceranae* permaneceu detectável em todas colônias sujeitas à análise individual ao longo de todo o período tal como relatado por Martín-Hernández et al., (2007).

A presença de *N. apis* foi detetada em apenas 4 colônias ao longo das avaliações tendo uma taxa de infecção abaixo dos 4%. Níveis baixos como esse de *N. apis* também foram relatados por Hedtke (2011), Huang et al., (2015) e Gregorc et al., (2016). A baixa incidência de *N. apis* pode ser devido as condições climáticas locais que não a favorecem, pois tem uma maior tendência de aparecimento em regiões com o clima mais ameno, como relatado por Martín-Hernández et al., (2012). A presença de *N. apis* em colônias tem decaído de 2005 até os dias atuais, em contraponto os índices de *N. ceranae* tem demonstrado ser mais acentuados (Gisder, 2017). Podemos observar ainda que as colônias B27, B44, B52 e BR5 apresentaram um co-parasitismo de *N. apis* e *N. ceranae* em pelo menos umas das avaliações, sendo que não se verificou nenhum padrão e essa taxa em média foi inferior a 10% (Figura 24).

Assim, em diversas regiões do mundo, observa-se uma prevalência de *N. ceranae* em relação à *N. apis*, indicando que *N. ceranae* tem se tornado a espécie dominante nas populações mundiais de abelhas (Chen et al., 2012; Martín-Hernández et al., 2012). No entanto, na Europa ainda se observa um gradiente sul-norte, onde a *N. ceranae* tem maiores índices de infecção em diferentes regiões da Europa, nomeadamente Dinamarca, Grécia, Itália

e Espanha. Por outro lado, *N. apis* continua a ter uma maior prevalência na parte norte da Europa, como por exemplo na Inglaterra e na Suécia (Klee et al., 2007).

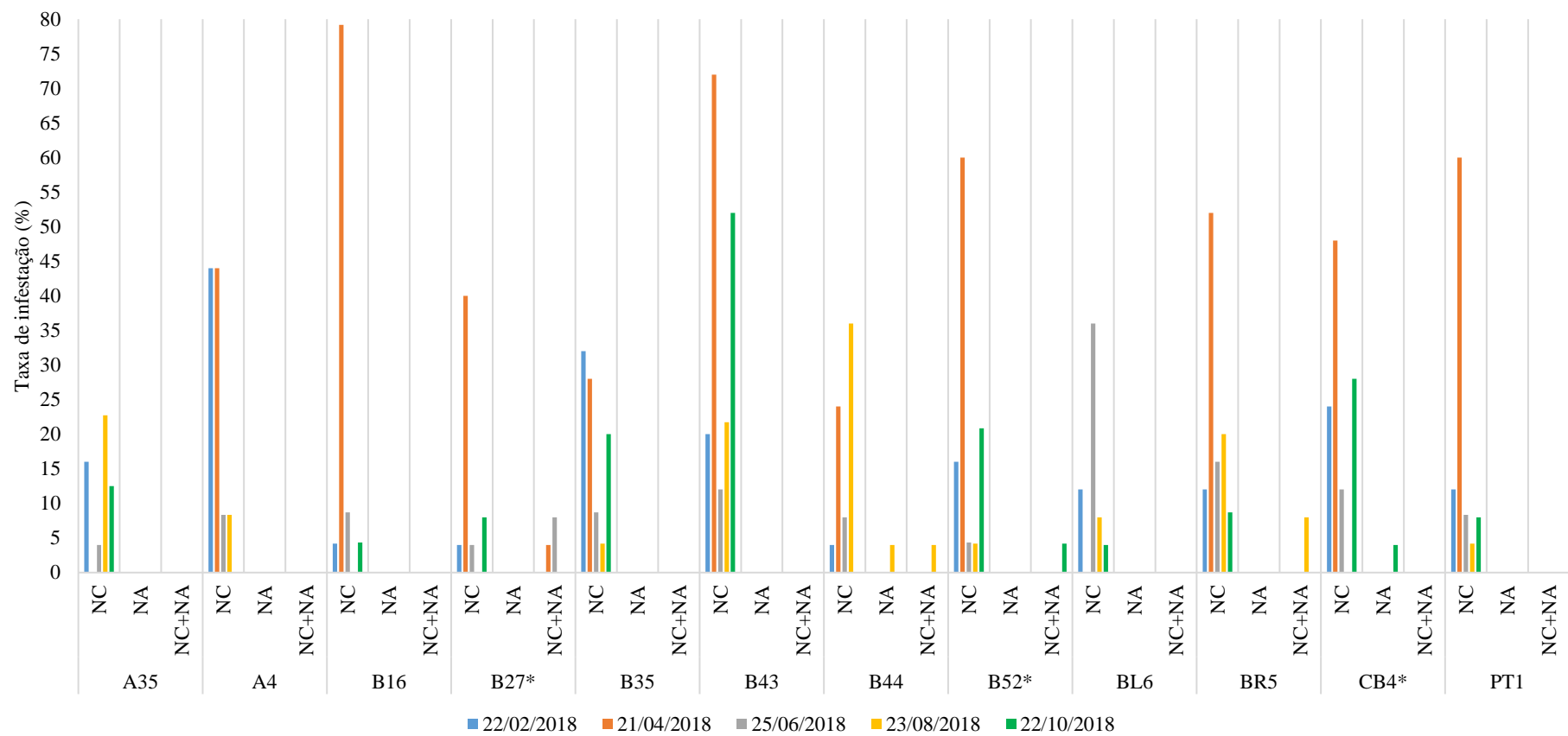


Figura 24: Taxa de infecção de *N. ceranae* e *N. apis* ao longo do período de avaliação; onde NC = *N. ceranae*; NA = *N. apis*; NC+NA = co-ocorrência das duas espécies; * colônias que não sobreviveram ao inverno 2018/2019.

3.7. Análise das relações

Os resultados na análise de relação com o uso da análise de trilha estão representados na Figura 25 e Tabela 4. Esta análise de dados apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 19%, isto é, as variáveis dependentes explicam apenas 19% da variação da variável independente (taxa de infecção de *N. ceranae*). Para além disso, apenas as variáveis que tiverem um coeficiente de trilha superior à variável residual calculada pelo modelo podem ser consideradas que têm uma contribuição significativa para a variação da variável independente. No conjunto de dados nenhuma variável superou o valor da variável residual (0,898), apenas as variáveis, número de quadros com abelhas adultas (0,539) e o peso da colônia via número de quadros com abelhas adultas (0,446) demonstraram ter efeito mais expressivos sobre a taxa de infestação de *N. ceranae*.

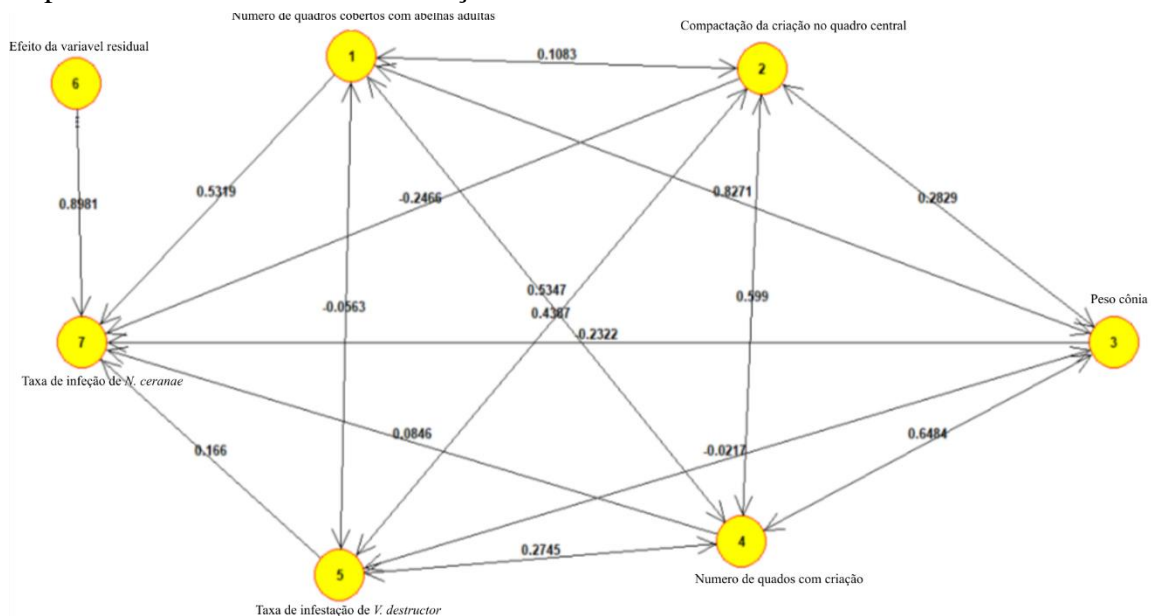


Figura 25: Diagrama de trilha em cadeia, demonstrando as relações diretas entre as variáveis; “↔” Relações entre as variáveis dependentes; “←” Relação direta com a variável de interesse.

Ainda que abaixo do efeito da variável residual, as características número de quadros com abelhas adultas (0,539) e o peso da colônia via número de quadros com abelhas adultas (0,446) podem fornecer uma indicação sobre a sua relação da taxa de infecção de *N. ceranae* na medida em que a alteração na quantidade de abelhas nas colônias durante o verão e posterior retração com a aproximação do inverno poderia afetar a taxa de infecção de *N. ceranae* (DeGrandi-Hoffman et al, 1989; Russell, Barron, & Harris, 2013)

Tabela 4: Estimativas dos efeitos diretos e indiretos na variável taxa de infecção de *N. ceranae*, através da compactação da criação no quadro central, número de quadros cobertos com abelhas adultas, taxa de infestação *V. destructor*, e peso colônia.

Número de quadros cobertos com abelhas adultas		
Efeito direto sobre	Taxa de infecção de <i>N. ceranae</i>	0,531
Efeito indireto via	Compactação da criação no quadro central	-0,026
Efeito indireto via	Peso colônia	-0,192
Efeito indireto via	Número de quadros com criação	0,045
Efeito indireto via	Taxa de infestação <i>V. destructor</i>	-0.009
Total:		0.349
Peso da colônia		
Efeito direto sobre	Taxa de infecção de <i>N. ceranae</i>	-0.232
Efeito indireto via	Número de quadros cobertos com abelhas adultas	0.440
Efeito indireto via	Compactação da criação no quadro central	-0.069
Efeito indireto via	Número de quadros com criação	0.054
Efeito indireto via	Taxa de infestação <i>V. destructor</i>	-0.004
Total:		0.189
Compactação da criação no quadro central		
Efeito direto sobre	Taxa de infecção de <i>N. ceranae</i>	-0.246
Efeito indireto via	Número de quadros cobertos com abelhas adultas	0.057
Efeito indireto via	Peso colônia	-0.065
Efeito indireto via	Número de quadros com criação	0.050
Efeito indireto via	Taxa de infestação <i>V. destructor</i>	0.072
Total:		-0.131
Número de quadros com criação		
Efeito direto sobre	Taxa de infecção de <i>N. ceranae</i>	0.085
Efeito indireto via	Número de quadros cobertos com abelhas adultas	0.284
Efeito indireto via	Compactação da criação no quadro central	-0.147
Efeito indireto via	Número de quadros com criação	-0.150
Efeito indireto via	Peso colônia	0.045
Total:		0.116
Taxa de infestação <i>V. destructor</i>		
Efeito direto sobre	Taxa de infecção de <i>N. ceranae</i>	0.166
Efeito indireto via	Número de quadros cobertos com abelhas adultas	-0.029
Efeito indireto via	Compactação da criação no quadro central	-0.108
Efeito indireto via	Número de quadros com criação	0.005
Efeito indireto via	Peso colônia	0.023
Total:		0.056
Coeficiente de determinação R² = 19%		
Efeito da variável residual = 0,898		

As correlações entre as diferentes variáveis explicativas em estudo são apresentadas na Tabela 5, destacando-se a correlação do peso da colônia com o número de quadros cobertos com abelhas adultas ($r=0.827$, $P \leq 0,05$). Essa relação é considerada forte e facilmente explicada porque o aumento da população das colônias traduz-se em parte no aumento do peso medido (Russell et al., 2013), uma vez que o peso da colônia pode ser considerado como um somatório de várias variáveis, nomeadamente crescimento da população (abelhas adultas e criação), néctar/mel e pólen. Deste modo, peso apresenta ainda uma correlação moderada/forte com o número de quadros com criação (0,648). A variável compactação da criação também apresenta uma correlação moderada com o número de quadros com criação, pois geralmente quantos mais quadros existem de criação na colônia maior é a compactação do quadro central. Adicionalmente ainda se observou uma correlação moderada entre o número de quadros com criação e com o número de quadros cobertos com abelhas adultas (0,534), pois quanto mais criação existe maior será a quantidade de população adulta ao longo do tempo.

A relação entre a taxa de infestação de *V. destructor* e a compactação da criação no quadro central também demonstrou uma correlação moderada/fraca (0,438). Esta relação, embora fraca, pode exprimir de alguma forma a relação íntima que existente entre a criação e a *V. destructor*. Por outras palavras, *V. destructor* reproduz-se tirando proveito da criação abelha melífera (Michener, 2007), quanto maior é a compactação da criação mais alvéolos de criação estão disponíveis para o desenvolvimento da *V. destructor*. No entanto, nenhuma destas correlações demonstrou ser estatisticamente significativa à exceção da correlação entre o peso da colônia e número de quadros cobertos com abelhas adultas.

Tabela 5: Coeficientes de correlação entre as variáveis explicativas da taxa de infeção de *N. ceranae*. Os valores em negrito apresentaram $P \leq 0,05$ (teste t-student).

Variáveis	Número de quadros cobertos com abelhas adultas	Compactação da criação no quadro central	Peso da colônia	Número de quadros com criação	Taxa de infestação <i>V. destructor</i>
Número de quadros cobertos com abelhas adultas		0,108	0,827	0,534	-0,056
Compactação da criação no quadro central			0,283	0,599	0,438
Peso da colônia				0,648	-0,021
Número de quadros com criação					0,274
Taxa de infestação <i>V. destructor</i>					

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada a importância da polinização realizada pela abelha e diversos relatos da diminuição do número de colmeias a nível mundial, este tipo de estudos de avaliação das condições gerais das colmeias, doenças e suas relações, possibilitam o melhor entendimento e desenvolvimento a longo prazo de estratégias de combate a este problema. Aliado a esses estudos, a caracterização molecular das colônias é uma ferramenta essencial na conservação da espécie local, uma vez que a sua composição genética lhes pode conferir vantagem adaptativa neste período em que abelha enfrenta dificuldades devido a diversos fatores tanto ambientais como humanos.

Sendo o objetivo o estudo da fenologia da Nosemose tipo C (*N. ceranae*) e o acompanhamento das condições gerais das colônias para posterior verificação de relações, é de realçar as seguintes considerações:

- Relativamente ao monitoramento da temperatura e umidade no interior das colônias, os dados demonstraram como esperado e de acordo com a posição dos sensores que tanto a temperatura como a umidade são controladas e mantidas nos valores próximos dos considerados ótimos para o desenvolvimento da criação (*ibutton* central). Já os *ibuttons* laterais demonstraram ter uma maior variação, o que pode estar relacionado com a deslocação da criação e condições das reservas nos quadros laterais.
- Sobre a força da colônia foi mensurada através das variáveis, número de quadros cobertos com abelhas adultas, compactação da criação no quadro central, número de quadros com criação, evolução temporal do peso da colônia e produção de mel. Observou-se que a população adulta apresentou o seu crescimento máximo em agosto enquanto que a relativamente à criação esse valor foi em junho. Em termos gerais, as 12 colônias tiveram um bom desenvolvimento, sendo que algumas se destacaram durante o período de maior atividade o que culminou num bom ano de produção de mel. Este método de avaliação é de fácil mensuração e o acompanhamento do desenvolvimento das colônias ao longo do tempo pode nos fornecer informações importantes sobre a sua condição de modo a tomar medidas adequadas ao seu desenvolvimento saudável.

- O estudo das condições climáticas do apiário em conjunto com o monitoramento da evolução do peso das colmeias oferece uma forma não invasiva de acompanhamento das mesmas (ao contrário da avaliação através da força da colônia) fornecendo dados que podem contribuir para melhorar o manejo das colmeias por parte do apicultor, como por exemplo na altura mais ativa das abelhas, perceber quando se devem colocar as meias alças. No entanto, a sua implementação em termos práticos é dispendiosa.
- Relativamente às doenças em estudo, tal como esperado, observou-se infestação de *V. destructor* em pelo menos uma das avaliações, sendo que algumas atingiram níveis elevados, especialmente em outubro. *N. ceranae* foi detetada em todos os períodos de avaliação para a maioria das colônias, mas com níveis variáveis, sendo encontrado dois picos de infeção, nomeadamente em abril e outubro. A taxa de infeção e prevalência de *N. apis* foi baixa.
- Sobre as colônias que não sobreviveram ao inverno, nomeadamente B27 e B52, demonstraram ter elevados níveis de infestação de *V. destructor* e relativamente à *N. ceranae* não apresentaram as taxas mais elevadas, sendo plausível o seu colapso ser explicado pela infestação de *V. destructor*. Já em relação à colônia CB4 não apresentou elevados níveis de infestação de *V. destructor* e os níveis de infeção de *N. ceranae* também não foram dos mais elevados. No entanto demonstrou ser a colônia mais forte a nível de criação e produção de mel, o que poderá ter levado a rainha à “exaustão” e a falha na substituição da rainha numa altura em que praticamente não existe zângãos culminando no seu colapso. Assim, nem sempre as colônias mais produtivas e com maior população se tornam sustentáveis, acabam por colapsar durante o inverno, exigindo um maior cuidado por parte do apicultor.
- Quanto ao estudo das relações através da análise de trilha, os resultados não são conclusivos uma vez que o modelo apenas consegue explicar 19% da variação da taxa de infeção de *N. ceranae*. No estudo das correlações entre variáveis, observou-se uma relação moderada do número de quadros com criação com compactação da criação no quadro central, número de quadros

cobertos com abelhas adultas e peso da colônia. Apenas uma das correlações demonstrou ser forte e significativa, sendo ela entre o número de quadros com abelhas e o peso da colônia. Estas correlações são expectáveis tendo em conta as características do desenvolvimento das colônias.

- Por esse estudo ter sido realizado em paralelo ao projeto de investigação “BEEHEAL”, o seu prosseguimento irá fornecer mais informação acerca do modo como a Nosemose tipo C pode afetar a força colônia. Para além disso, seria interessante a busca por métodos de controle para a Nosemose, nomeadamente, controle de esporos, higiene das caixas, métodos de desinfeção, etc.

5. REFERÊNCIAS

- Antúñez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, *11*(9), 2284–2290. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x>
- Büchler, R., Andonov, S., Bienefeld, K., Costa, C., Hatjina, F., Kezic, N., ... Wilde, J. (2013). Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, *52*(1), 1–30. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.07>
- Budge, G. (2008). *Nosema ceranae*. *Bee Craft*, (January), 7–8. <https://doi.org/10.1023/A:1015862603939>
- Chávez-Galarza, J., Garnery, L., Henriques, D., Neves, C. J., Loucif-Ayad, W., Jonhston, J. S., & Pinto, M. . A. (2017a). Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis* : further insights from a large-scale study using sequence data of the tRNA leu -cox2 intergenic region, (1988). <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0498-2>
- Chávez-Galarza, J., Garnery, L., Henriques, D., Neves, C. J., Loucif-Ayad, W., Jonhston, J. S. S. S., & Pinto, M. A. A. (2017b). Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis*: further insights from a large-scale study using sequence data of the tRNAleu-cox2 intergenic region. *Apidologie*, *48*(4), 533–544. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0498-2>
- Chávez-Galarza, J., Henriques, D., Johnston, J. S., Carneiro, M., Rufino, J., Patton, J. C., & Pinto, M. A. (2015). Revisiting the Iberian honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) contact zone: Maternal and genome-wide nuclear variations provide support for secondary contact from historical refugia. *Molecular Ecology*, *24*(12), 2973–2992. <https://doi.org/10.1111/mec.13223>
- Chen, C., Liu, Z., Pan, Q., Chen, X., Wang, H., Guo, H., ... Shi, W. (2016). Genomic Analyses Reveal Demographic History and Temperate Adaptation of the Newly Discovered Honey Bee Subspecies *Apis mellifera sinixinyuan* n. ssp. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(5), 1337–1348. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw017>
- Chen, Y., Chung, W., Wang, C., Solter, L. F., & Huang, W. (2012). *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *Journal of Invertebrate Pathology*, *111*(3), 264–267. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.08.014>
- Clarke, K. E., Oldroyd, B. P., Javier, J., Quezada-Euán, G., & Rinderer, T. E. (2001). Origin of honeybees (*Apis mellifera* L.) from the Yucatan peninsula inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molec Ecol*, *10*.
- Columbia, M. of A.-P. of B. (2015). *Varroa Mite Detection Methods*. Campbell Road Abbotsford. Retrieved from https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/farming-natural-resources-and-industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/animal-production/bee-assets/api_fs222.pdf
- Cox-Foster, D., Conlan, S., Holmes, E., Palacios, G., & Evans, J. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science (Washington)*, *318*.
- Crozier, R. H. (1993). The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*:

- Complete sequence and genome organization. *Genetics*, 133(1), 97–117.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x>
- Cruz, C.D. Regazzi, A. . (2012). *Modelos Biométricos aplicados ao melhoramento genético* (4°).
- Cruz, C. D. (2013). GENES - Software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 35(3), 271–276. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>
- D.Michener, C. (2007). *The Bees of the word*. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0290:FMBLZH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0290:FMBLZH]2.0.CO;2)
- De Guzman, L. I., Rinderer, T. E., & Frake, A. M. (2007). Ecology and population biology: Growth of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) populations in Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Annals of the Entomological Society of America*, 100(2), 187–195. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34047131184&partnerID=40&md5=741588824a2e85c2a572db83f52748f8>
- DeGrandi-Hoffman, G., Roth, S. A., Loper, G. L., & Erickson, E. H. (1989). BEEPOP: A honeybee population dynamics simulation model. *Ecological Modelling*, 45(2), 133–150. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(89\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0304-3800(89)90088-4)
- Delaplane, K. S., & Mayer, D. F. (2000). *Crop pollination by bees*. CABI. Retrieved from https://books.google.pt/books/about/Crop_Pollination_by_Bees.html?id=ZHGZkXa7xE4C&redir_esc=y
- Desai, S. D., & Currie, R. W. (2015). Genetic diversity within honey bee colonies affects pathogen load and relative virus levels in honey bees, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(9), 1527–1541. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-1965-2>
- Diana, S., & Alphonse, A. (1978). *The beekeeper 's Handbook*. Manufactured in the United States of America.
- Dietemann, V. (2008). Standard methods for varroa research © IBRA 2013. *Plant Protection Quarterly*, 23(3), 127–130. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>
- Dietemann, V., Locke, B., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Martin, S. J., Rosenkranz, P., ... Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–54. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.52.1.09>
- Donzé, G., & Guerin, P. M. (1994). Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34(5), 305–319. <https://doi.org/10.1007/BF00197001>
- Doull, K. M. (1976). The Effects Of Different Humidities On The Hatching Of The Eggs Of Honeybees Raw For Excessively High Humidities . A Study Has Been The Results. *Apidologie*, 7, 61 66.
- Dunham, W. E. (1926). Hive Temperatures for Each Hour of a Day. *The Ohio Journal of Science*, 31(3), 181–188.
- Ellis, M. B. (2008). *Homeostasis: Humidity and water relations in honeybee colonies (Apis mellifera)*. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009030300>
- Engel, M. S. (1999). The taxonomy of Recent and Fossil Honey bees (Hymenoptera:

- Apidae; Apis. *American Museum of Natural History*, 8, 165–169.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_18
- F. Canovas, P. De La Rua, Serrano, J., Galian, J. (2007). Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera : Apidae), 46(May 2007), 24–30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2007.00435.x>
- Fahrenholz, L., Lamprecht, I., & Schricker, B. (1989). Thermal investigations of a honey bee colony: thermoregulation of the hive during summer and winter and heat production of members of different bee castes. *Journal of Comparative Physiology B*, 159(5), 551–560. <https://doi.org/10.1007/BF00694379>
- Farrar, D. (1936). Influence of pollen reserves on the surviving populations of overwintered colonies. *Am Bee J*, 76.
- Flora-On., F. de P. I. (2014). *Lavandula pedunculata* subsp. *pedunculata*. Retrieved January 3, 2019, from <https://flora-on.pt/#/1Lavandula+pedunculata>
- Forsgren, E., & Fries, I. (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, 170(3–4), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.010>
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., & Cornuet, J. (1998). The Origin of West European Subspecies of Honeybees (*Apis mellifera*): New Insights from Microsatellite and Mitochondrial Data Published by : Society for the Study of Evolution Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2411242> Accessed : 02-03-2016 13 : 0, 52(4), 1119–1134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01839.x>
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S73–S79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniasek, N. J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32(3), 356–365. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80059-9](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80059-9)
- Garnery, L., & Solignac, J. C. M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis, 145–154.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., & Cornuet, J.-M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*, 49(11), 1016–1021. <https://doi.org/10.1007/BF02125651>
- Garófalo, C. A. (1977). brood viability in normal colonies of *Apis Mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 16(1), 3–13. <https://doi.org/10.1080/00218839.1977.11099854>
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., & Hornitzky, M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia . *Apidologie*, 40(2), 117–123. <https://doi.org/10.1051/apido/2008065>
- Gisder, S., Schüler, V., Horchler, L. L., Groth, D., & Paxton, R. J. (2017). Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp . Infection Prevalence in Northeast Germany : Continuous Spread of *Nosema ceranae* , an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*, 7(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00301>

- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Gregorc, A., Alburaki, M., Sampson, B., Adamczyk, J., & Knight, P. R. (2018). Toxicity of Selected Acaricides to Honey Bees (*Apis mellifera*) and Varroa (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) and Their Use in Controlling Varroa within Honey Bee Colonies. *Insects*, 9(2), 55. <https://doi.org/10.3390/insects9020055>
- Gregorc, A., Silva-Zacarin, E. C. M., Carvalho, S. M., Kramberger, D., Teixeira, E. W., & Malaspina, O. (2016). Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere*, 147, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.030>
- Hahn, C., Bachmann, L., & Chevreux, B. (2013). Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads — a baiting and iterative mapping approach, 41(13). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt371>
- Hall, H. G., & Smith, D. R. (1991). Distinguishing African and European honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA, 88(May), 4548–4552. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4548>
- Hatjina, F., Costa, C., Büchler, R., Uzunov, A., Drazic, M., Filipi, J., ... Kezic, N. (2012). Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. *Journal of Apicultural Research*, 53(2), 233–247. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.05>
- Hedtke, K., Jensen, P. M., Jensen, A. B., & Genersch, E. (2011). Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(3), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.006>
- Henriques, D., Browne, K. A., Barnett, M. W., Parejo, M., Kryger, P., Freeman, T. C., ... Pinto, M. A. (2018). High sample throughput genotyping for estimating C-lineage introgression in the dark honeybee: an accurate and cost-effective SNP-based tool. *Scientific Reports*, 8(1), 8552. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26932-1>
- Henriques, D., Parejo, M., Wragg, D., Pinto, M. A., Vignal, A., Wallberg, A., & Webster, M. T. (2018). Developing reduced SNP assays from whole-genome sequence data to estimate introgression in an organism with complex genetic patterns, the Iberian honeybee (*Apis mellifera iberiensis*). *Evolutionary Applications*, 11(8), 1270–1282. <https://doi.org/10.1111/eva.12623>
- Henriques, D. S. M. (2018). *Employment of whole genome resequencing to reveal the evolutionary history and to develop molecular tools for Western European honey bees (Apis mellifera subspecies)*. <https://doi.org/10.7868/s001667581609006x>
- Higes, M., Palencia G, P., Hernández M, R., Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the Microsporidia *Nosema ceranae*. *Invertebr Pathol*, 94, 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G. E., González-Porto, A. V. A. A. V., Barrios, L., ... Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2659–

2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>

- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., ... Bernal, J. L. (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, *1*(2), 110–113. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe : an emergent type C nosemosis, *41*, 375–392.
- Honey Bee Health Coalition. (2015). *Tools for Varroa Management |A Guide To Effective Varroa Sampling & Control. The Keystone Policy Center on behalf of The Honey Bee Health Coalition* (Vol. 6). Retrieved from https://honeybeehealthcoalition.org/wp-content/uploads/2017/01/HBHC-Guide_Varroa-Mgmt_5thEd_Jan-10-2017.pdf%0Ahttp://honeybeehealthcoalition.org/varroa%5Cnpapers2://publication/uuid/68304B6B-F47B-4981-9C30-4E0210FA7D73
- Hu, H., Bienefeld, K., Wegener, J., Zautke, F., Hao, Y., Feng, M., ... Li, J. (2016). Proteome analysis of the hemolymph, mushroom body, and antenna provides novel insight into honeybee resistance against varroa infestation. *Journal of Proteome Research*, *15*(8), 2841–2854. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00423>
- Huang, W. F., Solter, L., Aronstein, K., & Huang, Z. (2015). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *124*, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.006>
- Human, H., Nicolson, S. W., & Dietemann, V. (2006). Do honeybees, *Apis mellifera scutellata*, regulate humidity in their nest? *Naturwissenschaften*, *93*(8), 397–401. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0117-y>
- IPMA. (2018a). Clima De Portugal Continental. Retrieved from <https://www.ipma.pt/pt/educativa/tempo.clima>
- IPMA. (2018b). Normais Climatológicas. Retrieved October 21, 2018, from <https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/>
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., ... Paxton, R. J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *96*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.014>
- Kraus, F. B., Büchler, R., Siede, R., Berg, S., & Moritz, R. F. A. (2007). Trade-off between survival and male reproduction in varroa destructor infested honeybee colonies (*apis mellifera*). *Ethology Ecology and Evolution*, *19*(4), 263–273. <https://doi.org/10.1080/08927014.2007.9522550>
- Kritsky, G. (2010). *The Quest for the Perfect Hive: A History of Innovation in Bee Culture*. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201703>; [10.1002/emmm.201201703](https://doi.org/10.1002/emmm.201201703)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kurze, C., Mayack, C., Hirche, F., Stangl, G. I., Le Conte, Y., Kryger, P., & Moritz, R. F. A. (2016). *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitology Research*, *115*(6), 2381–2388.

<https://doi.org/10.1007/s00436-016-4988-3>

- Le Conte, Y., Ellis, M., & Ritter, W. (2010). Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, *41*(3), 353–363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>
- Le Conte, Y., & Navaja, M. (2008). Climate change : Impact on honey bee populations and diseases Climate change : impact on honey bee populations and diseases, (September).
- Le Conte, Y., Vaublanc, G. de, Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J.-C., & B´ecard, J.-M. (2007). Original article Honey bee colonies that have survived Varroa destructor *. *Apidologie*, *38*, 566–572. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Lindau, R. (1995). A new Beaufort equivalent scale. In *Proc. Int. COADS Winds Workshop* (pp. 232–252).
- Locke, B., Le Conte, Y., Crauser, D., & Fries, I. (2012). Host adaptations reduce the reproductive success of varroa destructor in two distinct european honey bee populations. *Ecology and Evolution*, *2*(6), 1144–1150. <https://doi.org/10.1002/ece3.248>
- Louveaux, J., Albisetti, M., Delangue, M., Theurkauff, M., Des, L. A., Apis, A., ... Naturel, M. (1966). ' De L ' Adaptation Des Les Modalit Es Abeilles (Apis Mellifica L .) Au Milieu Naturel To Cite This Version :
- Magalhães, B., & Silva, F. (2015). *Agricultura e Polinizadores*. São Paulo - SP.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., & Higes, M. (2012). Microsporidia infecting Apis mellifera: Coexistence or competition. Is Nosema ceranae replacing Nosema apis? *Environmental Microbiology*, *14*(8), 2127–2138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x>
- Martín-hernández, R., Botías, C., & Barrios, L. (2011). Comparison of the energetic stress associated with experimental Nosema ceranae and Nosema apis infection of honeybees (Apis mellifera), 605–612. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2292-9>
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E., & Higes, M. (2007). Outcome of colonization of Apis mellifera by Nosema ceranae. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(20), 6331–6338. <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-07>
- Mattos, I. M. De, & Souza, J. (2018). Analysis of the effects of climate variables on Apis mellifera pollen foraging performance, 1301–1308.
- McMenamin, A. J., & Genersch, E. (2015). Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science*, *8*, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.015>
- Meeus, I., De Graaf, D. C., Jans, K., & Smagghe, G. (2010). Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(1), 107–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04635.x>
- Meixner, M. D., Leta, M. A., Koeniger, N., & Fuchs, S. (2011). The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of Apis mellifera—Apis mellifera simensis n. ssp. *Apidologie*, *42*(3), 425–437. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0007-y>

- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the world. Development* (Vol. 134). London. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0290:FMBLZH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0290:FMBLZH]2.0.CO;2)
- Miguel, I., Iriando, M., Sheppard, W. S., Garnery, L., & Estonba, A. (2007). Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera* : role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial re-colonization routes in the western Europe. *Apidologie*, 38(2), 141–155. <https://doi.org/10.1051/apido:2007007>
- Ministério da Agricultura Floresta e do Desenvolvimento Rural. (2016). *Programa Apícola Nacional 2017-2019*.
- Moreira, L., & Farinha, N. (2011). *Biology of the honeybee an illustrated handbook*. (F.-F. N. dos A. de Portuga, Ed.) (1st ed.). Lisboa. Retrieved from <http://id.bnportugal.gov.pt/bib/bibnacional/1879546>
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24(16), 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
- Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees, 14(8), 312–315.
- Percival, M. (1947). Pollen collection by *Apis mellifera*. *Pollen by Apis Mellifera*, 142–173. Retrieved from <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1469-8137.1947.tb05076.x>
- Pinto, M. A., Henriques, D., Chávez-Galarza, J., Kryger, P., Garnery, L., van der Zee, R., ... Johnston, J. S. (2014). Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNP. *Journal of Apicultural Research*, 53(2), 269–278. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.08>
- Pinto, M. A., Henriques, D., Neto, M., Guedes, H., Muñoz, I., Azevedo, J. C., & Rúa, P. D. La. (2013). Maternal diversity patterns of Ibero-Atlantic populations reveal further complexity of Iberian honeybees. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0192-y>
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines : trends , impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Roberts, J. M. K., Anderson, D. L., & Tay, W. T. (2015). Multiple host shifts by the emerging honeybee parasite, *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology*, 24(10), 2379–2391. <https://doi.org/10.1111/mec.13185>
- Russell, S., Barron, A. B., & Harris, D. (2013). Dynamic modelling of honey bee (*Apis mellifera*) colony growth and failure. *Ecological Modelling*, 265, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.06.005>
- Ruttner, F. (1987). *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. *Zootaxa*. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9778-3>
- Ruttner, F., Milner, E., & Dews, J. E. (1990). *The Dark European Honeybee: Apis Mellifera Mellifera Linnaeus 1758*. (the british isles bee breeders Association, Ed.) (2°).
- Ruttner, F., & Tassencourt, L. (1978). *Biometrical-Statistical Analysis Of The Geographic Variability Of Apis Mellifera L*. *Bienenkunde*. Retrieved from

- https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1978/04/Apidologie_0044-8435_1978_9_4_ART0008.pdf
- Saito, S., Tamura, K., & Aotsuka, T. (2005). Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, *171*(4), 1695–1705.
<https://doi.org/10.1534/genetics.105.046243>
- Sakagam, F., & Hiromi, F. (1968). Life Tables For Worker Honeybees, (45), 127–139.
- Sammataro, D., A. A. (1998). O Manual do Apicultor, 3ª edição. *Comstock Publishing Associates*.
- Seeley, T. D. (1995). *The Wisdom of the Hive*. Harvard University Press.
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.03.003>
- Sheppard, Walter S., Meixner, M. D. (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Espace Geographique*, *45*(2), 103–114.
<https://doi.org/10.1051/apido>
- Silva, K. N. da, Dutra, J. C. S., Nucci, M., & Polatto, L. P. (2013). Influência dos Fatores Ambientais e da Quantidade de Néctar na Atividade de Forrageio de Abelhas em Flores de *Adenocalymma bracteatum* (Cham.) DC. (Bignoniaceae). *EntomoBrasilis*, *6*(3), 193–201. <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v6i3.295>
- Stoner, A., Wilson, W., & Harvey, J. (1985). Honey bee exposure to beeswax foundation impregnated with fenvalerate or carbaryl. *Am Bee J*, *125*.
- Tautz, J. (2008). *The Buzz about Bees*. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* (Vol. 71). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-78729-7>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., ... Pettis, J. S. (2009). Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*, *4*(8), e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- vanEngelsdorp, D., & Meixner, M. D. (2011). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*(2010), S80–S95.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>
- VanEngelsdorp, D., Speybroeck, N., Evans, J. D., Nguyen, B. K., Mullin, C., Frazier, M., ... Saegerman, C. (2010). Weighing Risk Factors Associated With Bee Colony Collapse Disorder by Classification and Regression Tree Analysis. *Journal of Economic Entomology*, *103*(5), 1517–1523. <https://doi.org/10.1603/EC09429>
- Villemant, C., Haxaire, J., & Streito, J.-C. (2006). Premier bilan de l' invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en, *111*(4), 535–538.
- Watson, K., & Stallins, J. A. (2016). Honey Bees and Colony Collapse Disorder: A Pluralistic Reframing. *Geography Compass*, *10*(5), 222–236.
<https://doi.org/10.1111/gec3.12266>
- Winston, M. J., & Dropkin, O. T. (1981). Demografia e história de vida características de duas raças de abelhas (*Apis mellifera*). *Oecologia*, *48*, 407–413.
- Winston, M. L. (1987). *The Biology of the honey bee*. (1º, Ed.). Printed the Uneted States of America.
- Zacepins, A., & Karasha, T. (2013). Application of Temperature Measurements for Bee

Colony. *Proceedings of the 12th International Scientific Conference , Engineering for Rural Development*, 23, 126–131.

6. ANEXOS

Tabela S1: Relação número de identificação extração com identificação colônias.

Identificação extração	Identificação Colônia
1550	B16
1551	A36
1552	B36
1553	B35
1554	B27
1555	B44
1556	A27
1557	B52
1558	CB4
1559	A18
1561	BR5
1562	BL6
1563	B43
1564	A4
1565	PT1
1566	A35
1607	B16

Figura S1: Gel de eletroforese para a verificação da qualidade do DNA extraído.

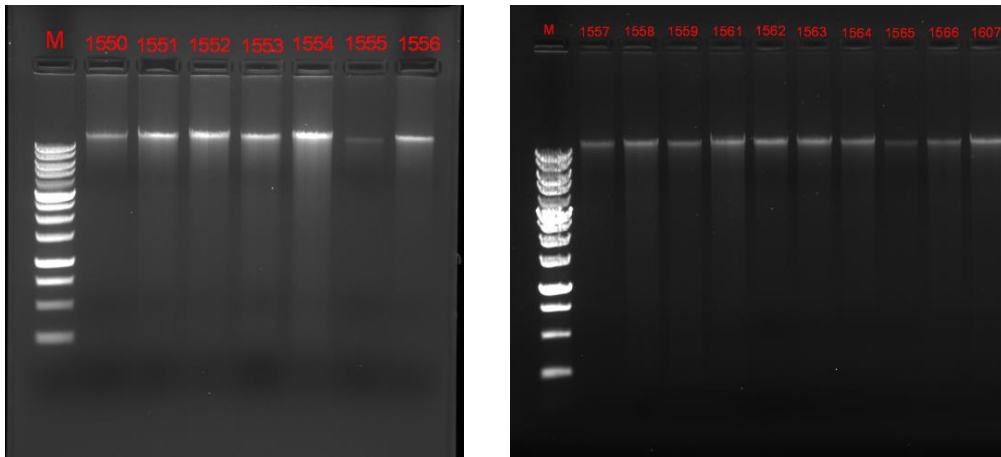


Figura S2: Gel de eletroforese para a verificação da qualidade do produto PCR.

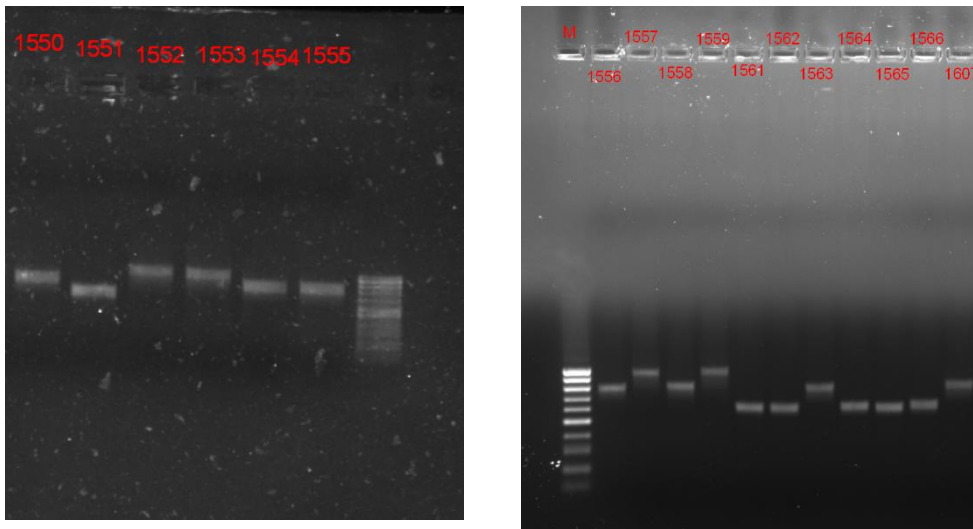


Figura S3: Alinhamento do mtDNA com o uso do software MEGA X.

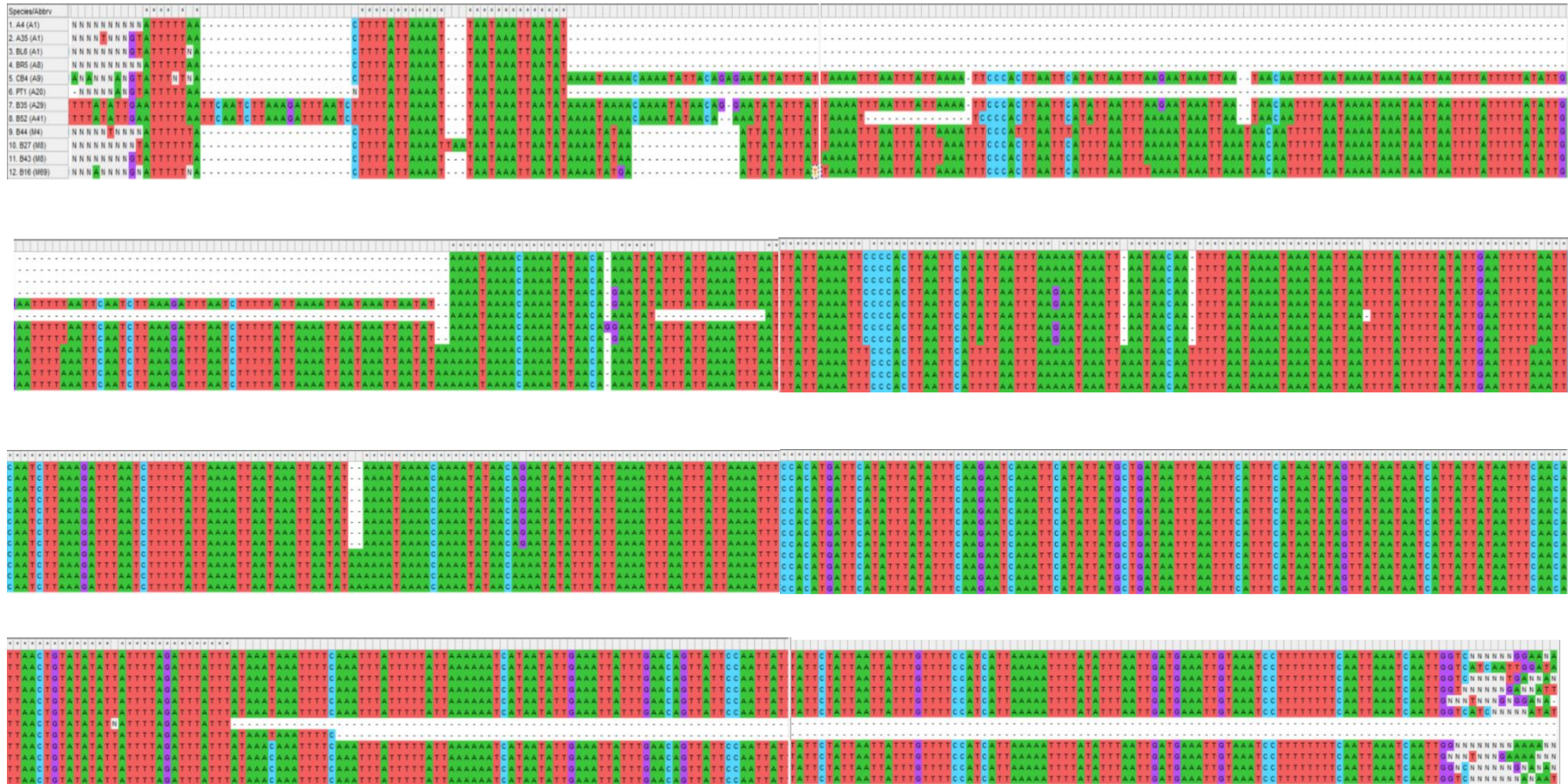


Tabela S2: Evolução dos pesos durante o período em estudo.

Data	PT1	BR5	A4	A35	CB4*	BL6	B16	B52*	B27*	B44	B35	B43
21/04/2018	0.04	0.42	0.01	1.21	-0.38		5.77	0.54	1.31	3.29	7.02	1.20
22/04/2018	0.14	0.35	0.05	2.13	0.04		6.01	0.73	1.64	3.65	7.40	1.50
23/04/2018	0.24	0.38	0.25	2.16	0.52		6.28	0.95	1.93	4.04	7.89	1.91
24/04/2018	0.45	0.41	0.54	2.18	1.07		6.67	1.22	2.32	4.61	8.58	2.41
25/04/2018	0.74	0.42	0.75	2.21	1.42		6.98	1.40	2.57	5.04	9.06	2.69
26/04/2018	0.90	0.39	0.79	2.22	1.51		7.10	1.47	2.69	5.25	9.30	2.78
27/04/2018	0.90	0.32	0.74	2.20	1.45		7.10	1.44	2.66	5.34	9.31	2.71
28/04/2018	0.83	0.23	0.67	2.16	1.33		7.02	1.38	2.57	5.33	9.23	2.56
29/04/2018	0.74	0.27	0.67	2.21	1.25		7.00	1.56	2.58	5.30	9.27	2.52
30/04/2018	0.74	0.29	0.62	2.20	1.22		6.92	1.56	2.44	5.20	9.18	2.47
01/05/2018	0.72	0.13	0.39	2.08	0.93		6.73	1.26	2.04	5.07	8.94	2.20
02/05/2018	0.97	0.01	0.31	1.99	0.72		6.54	1.15	1.84	4.74	8.79	1.90
03/05/2018	2.20	-0.01	0.23	1.95	0.72		6.50	1.20	1.83	4.60	8.75	1.85
04/05/2018	2.14	-0.08	0.07	1.85	0.87		6.57	1.03	1.94	4.57	8.85	2.01
05/05/2018	1.71	-0.05	0.12	1.81	1.20		6.66	0.65	2.16	4.64	9.10	2.24
06/05/2018	0.71	0.11	0.50	1.86	2.01		7.07	0.98	2.80	5.09	9.79	2.80
07/05/2018	1.28	0.31	0.94	1.98	2.84		7.53	1.33	3.44	5.67	10.56	3.31
08/05/2018	1.85	0.53	1.35	2.13	3.64		8.01	1.69	4.07	6.25	11.44	3.82
09/05/2018	2.39	0.58	1.66	2.25	4.31		8.44	1.88	4.62	6.84	12.19	4.24
10/05/2018	2.81	0.61	1.97	2.38	5.02		8.93	2.07	5.26	7.61	12.90	4.71
11/05/2018	3.20	0.74	2.64	2.57	6.28		9.85	2.50	6.30	8.95	14.24	5.62
12/05/2018	3.91	0.76	2.95	2.67	6.75		10.25	2.65	6.75	9.47	14.82	5.90
13/05/2018	4.11	0.71	2.93	2.69	6.58		10.23	2.62	6.77	9.28	14.69	5.62
14/05/2018	3.93	0.89	3.33	2.85	7.43		10.88	3.12	7.10	9.31	15.41	5.58
15/05/2018	4.35	1.17	4.42	3.13	9.89		12.49	4.18	7.61	9.62	17.50	5.76
16/05/2018	5.82	1.48	5.77	3.38	12.15		14.12	5.29	10.04	12.00	20.02	8.31
17/05/2018	7.53	1.81	7.07	3.71	14.32		15.61	6.39	12.48	14.55	22.40	9.37
18/05/2018	9.22	2.00	7.70	3.92	15.16		16.17	7.06	13.90	15.78	23.58	10.29
19/05/2018	10.03	2.18	8.72	4.16	16.96		17.39	7.89	16.05	17.44	25.80	12.09
20/05/2018	11.42	2.47	10.08	4.48	19.32		19.04	8.94	18.64	19.48	28.16	14.11
21/05/2018	13.05	2.74	11.69	4.76	21.90		20.87	10.03	21.42	21.87	30.80	16.25
22/05/2018	14.83	3.04	13.51	5.05	24.49		22.77	11.30	24.20	24.40	33.53	18.53
23/05/2018	16.80	3.42	15.11	5.42	26.19		24.45	12.12	26.00	26.51	35.15	20.01
24/05/2018	18.53	3.77	16.40	5.82	27.24		25.73	12.79	27.18	28.05	36.18	20.81
25/05/2018	19.80	4.19	16.75	6.34	27.71		25.87	13.61	27.95	28.66	36.54	21.12
26/05/2018	20.16	4.15	17.03	6.23	27.98		25.93	13.61	27.73	28.32	36.64	21.18
27/05/2018	20.09	4.27	18.85	6.28	29.87		27.42	14.56	29.48	29.45	38.54	22.86
28/05/2018	21.48	4.53	20.32	6.43	31.38		28.63	15.44	31.11	30.87	40.18	24.29
29/05/2018	22.57	4.80	21.41	6.62	32.39		29.34	16.20	32.24	31.69	41.11	25.16
30/05/2018	23.30	4.95	22.86	6.75	33.78		30.05	17.12	33.47	32.25	42.03	26.48

Tabela S2: Continuação

31/05/2018	23.94	4.93	23.97	6.96	34.93		29.88	17.89	34.54	32.11	41.92	27.41
01/06/2018	23.82	5.20	25.16	7.33	36.39		30.72	18.91	35.84	33.38	43.13	28.34
02/06/2018	24.74	5.62	26.68	7.79	38.21		31.67	20.14	37.23	34.99	44.55	29.58
03/06/2018	25.90	6.03	28.10	8.39	39.83		32.70	21.32	38.50	36.60	45.97	30.93
04/06/2018	27.19	6.18	28.48	8.77	40.31		33.00	21.89	38.96	37.42	46.66	31.39
05/06/2018	27.73	6.41	28.77	8.96	40.47		33.02	22.08	39.27	37.62	47.04	31.57
06/06/2018	27.99	6.67	29.29	9.26	41.13		33.41	22.41	39.33	37.77	47.38	32.03
07/06/2018	28.32	6.98	30.20	9.72	42.16		34.02	23.06	40.10	38.55	48.16	32.65
08/06/2018	28.95	7.38	30.68	10.04	42.71		34.18	23.76	40.82	39.13	48.87	32.97
09/06/2018	29.73	7.38	30.50	9.89	42.38		33.91	23.51	40.41	38.71	48.73	32.76
10/06/2018	29.33	7.53	30.64	9.95	42.48		34.04	23.52	40.33	38.52	48.68	32.74
11/06/2018	29.32	7.84	31.11	10.11	42.76		34.48	23.55	40.57	38.63	48.71	32.83
12/06/2018	29.31	8.08	31.65	10.28	43.67		35.14	23.61	40.88	39.12	48.71	33.05
13/06/2018	29.37	8.40	32.28	10.55	44.73		35.92	24.06	41.27	39.86	49.17	33.54
14/06/2018	29.69	8.51	32.53	10.63	45.48		36.34	24.42	41.41	40.29	49.58	33.90
15/06/2018	29.93	8.67	32.87	10.79	46.24		36.81	24.76	41.57	40.66	49.94	34.33
16/06/2018	30.25	8.76	33.11	10.95	46.82		37.21	25.11	41.65	41.00	50.27	34.57
17/06/2018	30.59	8.85	33.40	11.10	47.26		37.46	25.42	41.68	41.46	50.43	34.84
18/06/2018	30.87	9.03	33.86	11.36	47.80		37.77	25.88	41.83	42.20	50.81	35.15
19/06/2018	31.50	9.21	34.34	11.72	48.31		38.13	26.28	41.96	42.93	51.17	35.47
20/06/2018	32.16	9.55	34.91	12.25	48.90		38.52	26.89	42.18	43.51	51.83	35.85
21/06/2018	32.95	9.92	35.42	12.64	49.35		38.85	27.39	42.41	41.43	52.30	36.15
22/06/2018	33.66	10.65	36.53	13.31	50.28		39.36	28.57	43.08	44.92	53.54	36.83
23/06/2018	34.99	10.55	36.46	13.37	50.20		39.12	28.46	42.65	44.69	53.42	36.77
24/06/2018	34.91	10.75	36.66	13.80	50.56		39.27	29.05	42.70	45.07	54.07	37.12
25/06/2018	35.52	11.03	37.18	14.40	51.02		39.01	29.45	42.75	45.23	54.91	37.58
26/06/2018	36.15	11.28	37.73	15.07	51.29		37.62	29.46	42.69	45.10	55.20	37.92
27/06/2018	36.96	11.45	38.16	15.57	51.36		37.68	30.08	42.71	45.15	55.07	38.02
28/06/2018	37.95	11.66	38.69	16.33	51.50		37.74	30.75	42.91	45.23	55.35	38.20
29/06/2018	38.92	12.01	39.60	17.30	52.14		37.91	31.82	43.55	45.76	56.01	38.55
30/06/2018	40.27	12.56	40.80	18.35	53.18		38.41	32.96	44.92	46.79	57.18	39.42
01/07/2018	41.60	12.46	40.53	17.91	52.86		38.14	32.46	44.51	46.28	56.89	38.99
02/07/2018	41.19	12.51	40.62	18.02	52.86		38.21	32.58	44.42	46.32	56.98	38.94
03/07/2018	41.38	12.42	40.37	17.76	52.55	13.89	38.12	32.28	43.94	45.82	56.85	38.49
04/07/2018	40.98	12.65	40.31	18.22	52.73	13.70	37.94	32.37	43.56	45.57	57.02	38.66
05/07/2018	41.00	12.83	40.64	18.91	53.13	13.81	37.91	32.79	43.75	45.75	57.55	39.07
06/07/2018	41.43	13.48	41.61	20.16	54.12	14.12	38.12	33.70	44.18	46.23	58.60	40.43
07/07/2018	42.53	14.09	42.49	21.12	55.01	14.47	38.22	34.59	44.64	46.79	59.70	41.48
08/07/2018	43.48	14.87	43.70	22.51	56.04	14.93	38.24	35.73	45.23	47.55	60.74	43.18
09/07/2018	44.68	15.69	44.90	23.78	56.89	15.48	38.30	36.83	45.79	48.31	61.74	44.87
10/07/2018	45.88	16.51	46.01	24.97	57.53	15.96	38.34	37.90	46.27	49.01	62.65	46.44
11/07/2018	47.04	17.20	46.98	25.87	58.01	16.31	38.20	38.57	46.87	49.29	63.33	48.94
12/07/2018	48.06	17.37	47.06	26.05	57.73	16.54	38.09	38.32	46.51	49.00	63.25	54.30

Tabela S2: Continuação

13/07/2018	48.21	18.03	47.69	26.96	58.27	16.94	38.27	38.84	46.93	49.26	63.97	55.07
14/07/2018	48.94	18.39	48.01	27.40	58.44	17.15	38.08	38.91	46.90	49.18	64.26	55.47
15/07/2018	49.21	18.87	48.65	28.22	58.85	17.66	37.98	39.33	47.24	49.20	64.73	56.11
16/07/2018	49.93	19.14	49.01	28.78	59.16	18.07	37.91	39.72	47.35	49.12	64.98	56.68
17/07/2018	50.38	19.80	50.01	29.71	59.80	18.70	37.89	40.54	47.81	49.42	65.63	57.51
18/07/2018	51.27	20.53	51.18	30.76	60.24	19.35	37.88	41.34	48.33	49.88	66.34	58.30
19/07/2018	52.34	21.52	52.47	31.90	60.92	20.19	37.85	42.03	48.92	50.45	67.20	59.47
20/07/2018	53.64	22.23	53.62	33.08	61.89	21.03	37.89	42.88	49.62	51.02	67.94	60.56
21/07/2018	54.64	22.40	53.77	33.12	62.46	21.24	37.81	43.05	49.75	51.03	68.03	60.49
22/07/2018	54.77	22.78	54.57	34.16	62.81	21.90	37.93	43.87	50.14	51.37	68.64	61.11
23/07/2018	55.65	23.35	55.95	35.76	63.28	22.80	37.94	44.93	50.80	51.77	69.53	62.25
24/07/2018	56.73	23.90	57.21	37.19	64.08	23.68	37.95	45.92	51.40	52.13	70.34	63.07
25/07/2018	57.98	24.44	58.43	38.54	64.85	24.52	37.93	46.78	52.05	52.67	71.16	64.09
26/07/2018	59.26	24.77	59.59	39.97	65.56	25.28	37.93	47.68	52.58	53.09	71.81	64.99
27/07/2018	60.38	24.97	60.47	40.98	65.94	25.83	37.77	48.22	52.93	53.42	72.31	65.59
28/07/2018	61.24	25.43	61.33	41.90	66.51	26.42	37.80	48.87	53.29	53.76	72.78	66.35
29/07/2018	62.07	25.88	62.22	43.12	67.13	26.93	37.71	49.41	53.76	54.10	73.39	67.18
30/07/2018	62.85	26.39	63.10	44.28	67.74	27.65	37.78	50.24	54.15	54.42	74.00	68.08
31/07/2018	63.83	26.94	63.85	45.34	68.42	28.30	37.77	50.97	54.69	54.54	74.59	69.26
01/08/2018	64.85	27.43	64.40	46.13	68.83	28.80	37.76	51.47	54.88	54.61	74.94	70.07
02/08/2018	65.47	27.95	64.91	47.08	69.19	29.28	37.63	51.94	55.19	54.60	75.28	70.74
03/08/2018	65.98	28.17	64.96	47.32	69.26	29.40	37.48	52.01	55.10	54.38	75.26	70.91
04/08/2018	66.01	28.18	64.76	47.41	69.01	29.29	37.30	51.78	54.88	54.09	74.96	70.65
05/08/2018	65.64	28.18	64.71	47.65	69.00	29.36	37.14	51.69	54.73	53.82	74.74	70.50
06/08/2018	65.55	28.22	64.65	47.93	68.79	29.47	36.99	51.53	54.59	53.59	74.55	70.36
07/08/2018	65.40	28.09	64.41	47.90	68.65	29.42	36.78	51.23	54.33	53.34	74.19	69.96
08/08/2018	65.19	27.92	64.35	48.00	68.65	29.28	36.64	51.02	54.23	53.28	73.95	69.81
09/08/2018	65.17	28.09	64.05	47.98	68.56	29.41	36.56	50.93	54.00	53.06	73.66	69.33
10/08/2018	64.91	28.24	64.01	48.17	68.60	29.50	36.49	50.80	53.85	52.82	73.50	69.16
11/08/2018	64.78	28.45	63.97	48.43	68.57	29.61	36.41	50.70	53.72	52.62	73.37	69.04
12/08/2018	64.64	28.59	63.98	48.67	68.61	29.73	36.21	50.59	53.57	52.46	73.25	68.73
13/08/2018	64.64	28.83	63.81	48.70	68.64	29.84	36.19	50.65	53.49	52.24	73.07	68.71
14/08/2018	64.79	29.13	63.89	49.05	68.60	29.73	36.13	50.62	53.39	52.13	73.14	68.71
15/08/2018	64.71	29.42	63.85	49.24	68.58	29.92	35.94	50.39	53.21	51.96	73.04	68.49
16/08/2018	64.57	29.66	63.89	49.35	68.54	30.05	35.90	50.43	53.08	51.79	72.96	68.34
17/08/2018	64.51	29.92	63.89	49.50	68.31	30.14	35.82	50.45	53.02	51.68	72.80	68.20
18/08/2018	64.53	29.87	63.73	49.51	68.31	30.13	35.65	50.22	52.86	51.51	72.64	67.93
19/08/2018	64.32	29.79	63.72	49.65	68.28	30.18	35.59	50.19	52.72	51.35	72.48	67.80
20/08/2018	64.19	29.70	63.70	49.65	68.23	30.24	35.50	50.18	52.60	51.24	72.37	67.62
21/08/2018	64.10	29.65	63.61	49.72	68.20	30.26	35.50	49.93	52.24	51.14	72.26	67.35
22/08/2018	63.91	29.72	63.65	49.88	68.09	30.31	35.49	50.10	52.27	51.06	72.14	67.18
23/08/2018	63.72	29.68	63.59	49.98	68.85	30.23	35.46	50.17	52.22	51.08	71.95	66.70
24/08/2018	63.70	29.47	63.05	49.65	70.47	29.95	35.30	50.03	52.13	51.01	71.47	65.92

Tabela S2: Continuação

25/08/2018	63.53	29.45	62.99	49.69	70.40	29.94	35.35	49.96	52.09	50.82	71.42	65.57
26/08/2018	63.43	29.44	62.85	49.69	70.32	29.88	35.36	49.91	52.07	50.79	71.39	65.27
27/08/2018	63.34	29.36	62.79	49.66	70.32	29.88	35.47	49.82	52.06	50.74	71.39	65.17
28/08/2018	63.16	29.37	62.73	49.71	70.22	29.94	35.41	49.85	52.01	50.67	71.27	65.04
29/08/2018	62.78	29.26	62.58	49.55	70.17	29.69	35.41	49.85	51.83	50.43	71.07	64.83
30/08/2018	62.98	29.32	62.50	49.71	70.17	29.85	35.57	49.93	51.93	50.43	71.13	64.75
31/08/2018	62.80	29.31	62.41	49.70	70.16	29.93	35.63	49.89	51.89	50.35	71.06	64.62
01/09/2018	62.73	29.28	62.30	49.48	70.03	29.96	35.51	49.78	51.81	50.24	70.92	64.38
02/09/2018	62.61	29.23	62.19	49.54	69.96	29.93	35.55	49.70	51.71	50.13	70.80	64.09
03/09/2018	62.50	29.06	62.03	49.54	69.96	29.96	35.53	49.64	51.67	50.10	70.67	63.73
04/09/2018	62.47	29.00	61.55	49.28	69.79	29.78	35.39	49.45	51.61	49.77	70.28	63.53
05/09/2018	62.42	28.96	61.53	49.19	69.48	29.58	35.38	49.12	51.40	49.77	70.23	63.17
06/09/2018	62.25	21.36	35.20	31.36	38.10	21.56	22.68	32.32	28.52	26.81	41.26	40.45
07/09/2018	32.52	13.57	8.78	13.21	6.44	12.78	9.92	15.41	5.52	3.74	12.28	16.34
08/09/2018	2.89	13.66	8.84	13.34	6.42	12.86	10.14	15.57	5.65	3.69	12.36	16.22
09/09/2018	2.99	14.05	9.35	13.48	6.81	13.00	10.51	16.16	6.07	3.84	12.48	16.44
10/09/2018	3.63	13.72	9.02	13.45	6.61	12.82	10.30	15.63	5.53	3.68	12.42	15.69
11/09/2018	3.23	13.70	9.13	14.15	6.89	13.04	10.58	15.67	5.65	4.09	12.88	15.72
12/09/2018	3.55	13.58	8.96	14.00	6.69	12.92	10.59	15.44	5.51	3.88	12.70	15.32
13/09/2018	3.53	13.48	8.89	13.91	6.58	12.85	10.62	15.30	5.39	3.78	12.57	15.05
14/09/2018	3.43	13.43	8.87	13.84	6.52	12.81	10.64	15.18	5.29	3.72	12.53	14.89
15/09/2018	3.34	13.41	8.88	13.86	6.51	12.79	10.68	15.13	5.18	3.68	12.52	14.76
16/09/2018	3.38	13.36	8.91	13.80	6.49	12.73	10.71	15.09	5.08	3.57	12.50	14.60
17/09/2018	3.45	13.25	8.87	13.78	6.51	12.69	10.71	15.08	5.00	3.38	12.45	14.42
18/09/2018	3.58	13.11	8.78	14.02	6.52	12.65	10.70	15.06	4.97	3.44	12.34	14.41
19/09/2018	3.87	13.12	8.84	14.11	6.48	12.60	10.80	15.03	4.91	3.45	12.41	14.32
20/09/2018	3.93	13.10	8.83	14.11	6.45	12.51	10.86	14.95	4.82	3.46	12.41	14.22
21/09/2018	3.89	13.08	8.86	14.07	6.42	12.46	10.81	14.94	4.71	3.45	12.42	14.10
22/09/2018	3.95	13.07	8.83	13.93	6.37	12.26	10.70	14.93	4.61	3.39	12.45	13.91
23/09/2018	4.02	13.02	8.83	14.05	6.34	12.14	10.83	14.84	4.61	3.38	12.48	13.76
24/09/2018	4.04	13.02	8.87	14.16	6.36	12.12	10.88	14.85	4.55	3.44	12.50	13.66
25/09/2018	4.13	12.91	8.71	14.05	6.27	12.02	10.83	14.72	4.45	3.38	12.40	13.55
26/09/2018	4.13	12.83	8.57	13.98	6.17	11.99	10.76	14.59	4.34	3.25	12.28	13.46
27/09/2018	4.33	12.79	8.54	14.02	6.16	11.94	10.77	14.52	4.28	3.23	12.26	13.32
28/09/2018	4.48	12.80	8.54	13.92	6.14	11.83	10.79	14.59	4.29	3.27	12.29	13.33
29/09/2018	4.49	12.81	8.49	14.03	6.09	11.87	10.75	14.58	4.23	3.28	12.29	13.28
30/09/2018	4.44	12.78	8.41	14.06	6.03	11.84	10.63	14.53	4.12	3.26	12.25	13.20
01/10/2018	4.41	12.72	8.29	14.06	5.89	11.80	10.60	14.44	4.10	3.20	12.15	13.08
02/10/2018	4.31	12.64	8.12	13.97	5.75	11.73	10.52	14.31	4.02	3.08	12.04	12.91
03/10/2018	4.11	12.52	8.05	14.08	5.65	11.64	10.46	14.14	3.94	3.27	11.99	12.73
04/10/2018	4.01	12.48	7.90	14.09	5.73	11.53	10.39	14.10	3.81	3.21	11.91	12.63
05/10/2018	4.32	12.35	7.68	14.34	5.63	11.37	10.32	13.96	3.64	3.09	11.79	12.43
06/10/2018	4.62	12.29	7.60	14.36	5.47	11.32	10.18	13.88	3.54	3.06	11.70	12.29

Tabela S2: Continuação

07/10/2018	4.52	12.17	7.49	14.26	5.32	11.23	10.06	13.81	3.46	3.01	11.63	12.17
08/10/2018	4.38	12.01	7.37	14.08	5.21	11.04	9.99	13.67	3.30	2.85	11.51	12.06
09/10/2018	4.33	11.95	7.24	13.79	5.12	10.89	9.91	13.52	3.19	2.60	11.34	11.84
10/10/2018	4.26	11.89	7.05	13.77	5.02	10.86	9.78	13.46	3.09	2.55	11.30	11.61
11/10/2018	4.11	11.97	7.21	13.86	5.19	10.91	9.87	13.65	3.32	2.69	11.44	12.08
12/10/2018	4.12	11.95	7.24	13.76	5.20	10.78	9.85	13.59	3.06	2.66	11.35	11.85
13/10/2018	4.04	11.85	7.17	13.59	5.21	10.75	9.79	13.52	2.95	2.62	11.33	11.55
14/10/2018	4.03	11.78	7.10	14.33	6.05	10.71	9.74	13.42	2.91	2.62	11.26	11.57
15/10/2018	3.86	11.94	7.27	14.14	5.77	10.79	9.84	13.63	3.37	2.88	11.48	12.18
16/10/2018	4.18	11.95	7.31	13.59	5.37	10.73	9.84	13.64	3.30	2.81	11.41	12.25
17/10/2018	4.25	11.78	7.20	13.42	5.19	10.62	9.77	13.49	2.85	2.63	11.27	11.91
18/10/2018	4.01	11.81	7.25	13.48	5.35	10.62	9.81	13.54	3.09	2.88	11.42	12.20
19/10/2018	4.06	11.59	7.10	13.30	5.00	10.43	9.68	13.29	2.56	2.52	11.15	11.55
20/10/2018	3.75	11.45	6.96	13.17	4.77	10.33	9.59	13.14	2.41	2.42	11.05	11.28
21/10/2018	3.62	11.34	6.87	13.06	4.63	10.28	9.52	13.07	2.31	2.37	10.98	11.17
22/10/2018	3.56	11.30	6.65	12.84	4.47	10.14	9.36	12.89	2.48	2.18	10.85	10.92
23/10/2018	3.55	11.39	6.42	12.76	4.19	9.93	9.20	12.62	2.68	1.98	10.67	10.65
24/10/2018	3.31	11.31	6.39	12.68	4.08	9.78	9.16	12.52	2.58	1.93	10.59	10.55
25/10/2018	3.21	11.18	6.31	12.62	3.94	9.72	9.09	12.39	2.46	1.87	10.53	10.47
26/10/2018	3.07	11.13	6.34	12.62	3.92	9.71	9.02	12.42	2.37	1.81	10.51	10.36
27/10/2018	3.13	11.07	6.31	12.55	3.88	9.64	8.98	12.37	2.30	1.77	10.50	10.34
28/10/2018	3.10	10.97	6.20	12.51	3.74	9.58	8.92	12.25	2.19	1.75	10.44	10.27
29/10/2018	2.97	10.90	6.14	12.43	3.65	9.52	8.86	12.22	2.12	1.70	10.39	10.19
30/10/2018	2.94	11.20	6.39	12.70	4.00	9.68	9.01	12.55	2.57	1.97	10.73	11.21
31/10/2018	3.35	11.19	6.40	12.59	4.01	9.60	8.95	12.51	2.36	1.88	10.60	11.14
01/11/2018	3.34	11.07	6.30	12.47	3.81	9.52	8.84	12.36	2.01	1.76	10.44	10.69
02/11/2018	3.15	11.07	6.30	12.47	3.94	9.54	8.89	12.41	2.11	1.82	10.55	10.69
03/11/2018	3.19	10.92	6.14	12.33	3.66	9.43	8.78	12.26	1.86	1.69	10.36	10.29
04/11/2018	3.02	10.99	6.21	12.48	3.67	9.50	8.85	12.43	2.09	1.92	10.54	10.60
05/11/2018	3.15	11.37	6.67	12.79	4.17	9.73	9.08	12.94	2.58	2.33	10.83	11.45
06/11/2018	3.67	11.40	6.67	12.72	4.24	9.71	9.08	12.99	2.57	2.27	10.86	11.52
07/11/2018	3.61	11.44	6.85	12.73	4.31	9.72	9.11	13.18	2.49	2.32	10.82	11.41
08/11/2018	3.72	11.29	6.73	12.66	4.03	9.61	8.98	13.00	2.30	2.22	10.72	11.31
09/11/2018	3.55	11.38	6.78	12.71	4.25	9.66	9.04	13.15	2.53	2.31	10.81	11.60
10/11/2018	3.64	11.46	6.97	12.79	4.45	9.74	9.12	13.26	2.43	2.39	10.88	11.60
11/11/2018	3.74	11.49	7.09	12.93	4.32	9.78	9.17	13.57	2.66	2.55	11.01	11.81
12/11/2018	3.88	11.54	7.26	12.95	4.34	9.78	9.14	13.54	2.66	2.54	10.93	11.92
13/11/2018	4.03	11.28	7.01	12.64	3.99	9.56	8.90	13.10	2.10	2.31	10.70	11.39
14/11/2018	3.64	11.18	6.91	12.62	3.88	9.51	8.84	12.97	1.83	2.25	10.61	11.07
15/11/2018	3.53	11.16	6.84	12.53	3.87	9.45	8.81	12.92	1.76	2.22	10.63	11.04
16/11/2018	3.50	11.04	6.67	12.40	3.65	9.38	8.72	12.75	1.55	2.11	10.51	10.76
17/11/2018	3.40	11.00	6.60	12.31	3.55	9.35	8.69	12.68	1.46	2.06	10.49	10.60
18/11/2018	3.34	10.96	6.54	12.33	3.51	9.34	8.66	12.66	1.43	2.08	10.50	10.48

Tabela S2: Continuação

19/11/2018	3.29	11.16	6.71	12.44	3.82	9.45	8.76	12.86	1.84	2.24	10.70	11.43
20/11/2018	3.56	11.12	6.67	12.38	3.67	9.40	8.72	12.79	1.71	2.20	10.62	11.28
21/11/2018	3.49	11.08	6.64	12.43	3.55	9.38	8.70	12.87	1.79	2.23	10.69	11.37
22/11/2018	3.47	11.16	6.70	12.49	3.69	9.44	8.74	13.06	1.93	2.33	10.74	11.55
23/11/2018	3.56	11.19	6.74	12.48	3.73	9.42	8.72	13.08	2.07	2.34	10.75	11.56
24/11/2018	3.58	11.24	6.77	12.51	3.77	9.45	8.74	13.16	2.15	2.39	10.81	11.62
25/11/2018	3.60	11.22	6.83	12.49	3.82	9.45	8.73	13.18	2.11	2.41	10.79	11.63
26/11/2018	3.64	11.02	6.68	12.29	3.59	9.30	8.55	12.88	1.53	2.18	10.57	11.03
27/11/2018	3.40	10.83	6.50	12.16	3.19	9.17	8.39	12.59	0.59	2.01	10.39	10.52
28/11/2018	3.21	10.75	6.42	12.06	3.07	9.11	8.34	12.53	0.00	1.96	10.35	10.36
29/11/2018	3.14	10.83	6.47	12.22	3.22	9.20	8.40	12.75	0.01	2.16	10.52	10.75
30/11/2018	3.32	10.90	6.53	12.13	3.41	9.18	8.39	12.79	-0.09	2.13	10.50	10.83
01/12/2018	3.35	10.78	6.42	12.05	3.17	9.09	8.32	12.58	-0.78	1.97	10.36	10.56
02/12/2018	3.14	10.74	6.37	12.00	3.18	9.06	8.30	12.55	-0.96	1.92	10.35	10.45
03/12/2018	3.07	10.66	6.31	11.98	3.15	9.06	8.28	12.52	-1.21	1.91	10.35	10.32
04/12/2018	3.05	10.56	6.21	11.82	3.10	8.98	8.21	12.42	-1.51	1.80	10.28	10.14
05/12/2018	2.96	10.46	6.04	11.74	2.94	8.89	8.12	12.30	-1.88	1.71	10.20	9.88
06/12/2018	2.85	10.45	6.01	11.64	2.96	8.86	8.10	12.29	-1.92	1.68	10.21	9.81
07/12/2018	2.85	10.37	5.93	11.59	2.88	8.81	8.04	12.18	-2.07	1.63	10.15	9.68
08/12/2018	2.78	10.31	5.83	11.52	2.75	8.76	8.00	12.10	-2.12	1.61	10.11	9.63
09/12/2018	2.73	10.19	5.70	11.43	2.65	8.68	7.91	11.97	-2.21	1.53	10.02	9.54
10/12/2018	2.62	10.12	5.61	11.40	2.57	8.62	7.84	11.88	-2.25	1.49	9.97	9.49
11/12/2018	2.56	10.06	5.56	11.36	2.55	8.59	7.81	11.86	-2.26	1.46	9.94	9.44
12/12/2018	2.54	10.08	5.58	11.42	2.63	8.63	7.82	11.92	-2.20	1.50	9.96	9.45
13/12/2018	2.60	10.31	5.77	11.53	2.93	8.75	7.97	12.25	-1.83	1.69	10.20	10.28
14/12/2018	2.81	10.15	5.64	11.41	2.68	8.62	7.86	12.03	-2.15	1.53	9.99	9.69
15/12/2018	2.66	10.26	5.71	11.50	2.81	8.69	7.92	12.29	-1.77	1.66	10.18	9.60
16/12/2018	2.90	10.48	6.04	11.76	2.72	8.84	8.13	12.76	-1.39	1.97	10.46	10.00
17/12/2018	3.18	10.36	5.97	11.64	1.86	8.74	8.01	12.63	-1.54	1.85	10.29	9.84
18/12/2018	2.98	10.37	5.96	11.63	1.35	8.74	8.01	12.66	-1.49	1.87	10.33	9.84
19/12/2018	2.98	10.50	6.04	11.70	1.39	8.81	8.07	12.87	-1.38	1.96	10.48	9.97
20/12/2018	3.08	10.50	6.04	11.65	0.72	8.77	8.04	12.74	-1.50	1.87	10.45	9.92
21/12/2018	3.02	10.42	5.94	11.55	-0.21	8.71	7.96	12.61	-1.62	1.80	10.33	9.82
22/12/2018	2.86	10.40	5.90	11.51	-0.71	8.67	7.94	12.56	-1.60	1.79	10.30	9.76
23/12/2018	2.86	10.30	5.81	11.41	-1.43	8.60	7.88	12.38	-1.71	1.68	10.17	9.62
24/12/2018	2.76	10.25	5.74	11.37	-1.96	8.58	7.83	12.29	-1.78	1.63	10.09	9.53
25/12/2018	2.69	10.19	5.67	11.27	-1.97	8.54	7.79	12.22	-1.84	1.56	10.05	9.46
26/12/2018	2.66	10.10	5.54	11.19	-2.09	8.45	7.71	12.10	-1.89	1.50	9.99	9.34
27/12/2018	2.59	10.07	5.50	11.15	-2.07	8.43	7.69	12.09	-1.89	1.49	9.97	9.30
28/12/2018	2.58	10.01	5.43	11.04	-2.07	8.37	7.65	12.05	-1.92	1.41	9.92	9.23
29/12/2018	2.51	9.85	5.27	10.82	-2.19	8.22	7.54	11.87	-2.00	1.28	9.78	9.04
30/12/2018	2.34	9.70	5.06	10.69	-2.34	8.08	7.40	11.68	-2.09	1.15	9.65	8.89
31/12/2018	2.17	9.56	4.88	10.55	-2.46	7.99	7.29	11.52	-2.17	1.05	9.54	8.73

Tabela S2: Continuação

01/01/2019	2.01	9.47	4.78	10.43	-2.51	7.91	7.22	11.44	-2.22	0.99	9.46	8.57
02/01/2019	1.91	9.39	4.68	10.36	-2.56	7.83	7.15	11.36	-2.25	0.93	9.40	8.45
03/01/2019	1.81	9.29	4.56	10.25	-2.61	7.74	7.07	11.23	-2.30	0.85	9.33	8.37

Tabela S3: Dados do teste do açúcar

Data	Identificação colônia	Peso do copo	Peso do copo + abelhas	Número de ácaros	% Varroa
25/06/2018	A4	57	115	0	0.00
	PT1	47	103	0	0.00
	BR5	43	97	3	0.56
	A18	47	105	4	0.69
	BL6	35	95	0	0.00
	A27	42	91	1	0.20
	CB4	42	93	0	0.00
	A35	42	95	0	0.00
	B27	43	91	1	0.21
	B16	43	116	0	0.00
	B52	41	93	0	0.00
	A36	44	101	0	0.00
	B35	43	105	0	0.00
	B44	43	97	2	0.37
B43	46	106	0	0.00	
B36	46	107	0	0.00	
23/08/2018	B36	73	113	0	0.00
	B43	82	120	3	0.79
	B44	88	144	2	0.36
	B35	83	129	4	0.87
	A27	88	142	1	0.19
	A18	81	121	5	1.25
	A36	76	135	1	0.17
	B52	79	126	10	2.13
	B16	76	115	0	0.00
	B27	76	137	38	6.23
	BL6	75	136	2	0.33
	A35	76	144	5	0.74
	CB4	78	129	3	0.59
	A4	78	139	0	0.00
PT1	72	137	2	0.31	
BR5	74	158	12	1.43	
22/10/2018	A35	71	119	2	0.42
	BL6	73	122	2	0.41
	B27	76	129	23	4.34
	B16	76	124	6	1.25
	B52	76	127	49	9.61
	A36	75	129	0	0.00
	B35	78	131	20	3.77
	B44	79	124	1	0.22
	B43	79	126	3	0.64
	A27	74	127	2	0.38
	A18	77	121	2	0.45
	BR5	77	131	24	4.44
	PT1	78	130	16	3.08
	A4	76	129	3	0.57
CB4	77	124	2	0.43	
25/02/2019	A4	71	129	1	0.17
	PT1	73	121	3	0.63

Tabela S3: Continuação

	BR5	76	116	15	3.75
	A18	77	124	8	1.70
	A27	79	119	5	1.25
	B43	80	121	7	1.71
	B44	82	134	9	1.73
	B35	78	127	7	1.43
	A36	78	119	0	0.00
	B16	78	123	7	1.56
	BL6	78	118	6	1.50
	A35	77	124	1	0.21

Tabela S4: Cálculo do peso do mel.

	PT1		BR5		A4		A35		CB4		BL6	
Número de meias alças	Data	Peso	Data	Peso	Data	Peso	Data	Peso	Data	Peso	Data	Peso
1	21/04/2018	6.51	18/05/2018	7.31	01/05/2018	6.73	18/05/2018	6.86	21/04/2018	6.95	03/07/2018	7.58
2	18/05/2018	7.12			18/05/2018	7.07	25/06/2018	6.39	18/05/2018	8.02		
3	30/05/2018	8.11			25/06/2018	6.18			23/05/2018	8.37		
4	25/06/2018	6.62							25/06/2018	6.22		
5									11/07/2018	7.12		
Peso total das meias alças	28.36		7.31		19.98		13.25		36.68		7.58	
Peso antes da cresta	86.36		57.04		106.6		86.66		131.7		64.49	
Peso após a cresta	28.55		34.36		33.93		37.21		31.92		40.15	
Peso do mel (kg)	29.45		15.37		52.69		36.2		63.1		16.76	
	B16		B52		B27		B44		B35		B43	
Número de meias alças	Data	Peso	Data	Peso	Data	Peso	Data	Peso	Data	Peso	Data	Peso
1	21/04/2018	6.83	01/05/2018	6.88	21/04/2018	6.8	21/04/2018	6.09	21/04/2018	6.79	21/04/2018	7.15
2	18/05/2018	7.94	23/05/2018	7.16	14/05/2018	9.18	14/05/2018	9.12	01/05/2018	8.06	14/05/2018	9.08
3	30/05/2018	7.88	11/07/2018	7.32	23/05/2018	7.88	30/05/2018	8.13	23/05/2018	9.01	23/05/2018	7.94
4					11/07/2018	6.86	25/06/2018	6.96	30/05/2018	9.06	11/07/2018	7.73
5							11/07/2018	7.08				
Peso total das meias alças	22.65		21.36		30.72		37.38		32.92		31.9	
Peso antes da cresta	78.91		101.19		105.98		105.1		125.37		110.95	
Peso após a cresta	30.74		38.65		29.38		28.82		34.53		47.89	
Peso do mel (kg)	25.52		41.18		45.88		38.9		57.92		31.16	

Tabela S5: Dados força da colônia.

		Abelhas adultas			Criação					
		Número total > 70%	Média	Desvio padrão	Número total	Média	Desvio padrão	Compactação	Média	Desvio padrão
21/04/2018	A18	3	7.12	2.88	4	2.75	1.64	3	2	1.58
25/06/2018		10.5			3			1		
23/08/2018		9			4			4		
22/10/2018		6			0			0		
21/04/2018	A27	6	11.12	6.17	5	4.375	2.86	4	3	1.73
25/06/2018		17			8			4		
23/08/2018		17.5			4.5			4		
22/10/2018		4			0			0		
21/04/2018	A35	1	9.5	5.85	3	4.25	2.59	2	2.75	1.30
25/06/2018		12			8			4		
23/08/2018		17			5			4		
22/10/2018		8			1			1		
21/04/2018	A36	3	8.75	3.90	4	3.25	2.17	4	2.75	1.09
25/06/2018		9			6			3		
23/08/2018		14			3			3		
22/10/2018		9			0			1		
21/04/2018	A44	7	12.87	5.46	3	4.25	3.27	4	2.75	1.64
25/06/2018		17			9			4		
23/08/2018		19.5			5			3		
22/10/2018		8			0			0		
21/04/2018	B16	7	10.5	3.57	6	3.125	2.30	4	2.5	1.66
25/06/2018		15			0			0		
23/08/2018		13			4.5			4		
22/10/2018		7			2			2		
21/04/2018	B27	8	12.75	5.26	6	4.75	1.30	4	3	1.22
25/06/2018		18			6			3		
23/08/2018		18			4			4		
22/10/2018		7			3			1		
21/04/2018	B35	7	11.87	5.25	6	4.5	2.06	4	3	1.73
25/06/2018		14			6			4		
23/08/2018		19.5			5			4		
22/10/2018		7			1			0		
21/04/2018	B36	8	14.66	4.87	5	6	1.41	4	3.66	0.47

25/06/2018		16.5			8			4		
------------	--	------	--	--	---	--	--	---	--	--

Continuação Tabela S5:

23/08/2018		19.5			5			3		
22/10/2018										
21/04/2018	B43	7	15.125	7.21	5	4.25	2.59	4	2.5	1.66
25/06/2018		18			7			4		
23/08/2018		25.5			5			2		
22/10/2018		10			0			0		
21/04/2018	B44	8	11.5	3.77	7	4.75	3.11	4	2.5	1.50
25/06/2018		13			8			3		
23/08/2018		17			4			3		
22/10/2018		8			0			0		
21/04/2018	B52	4	11.125	6.17	4	4.68	3.20	4	3.25	0.83
25/06/2018		17			10			4		
23/08/2018		17.5			3.25			3		
22/10/2018		6			1.5			2		
21/04/2018	BL6	2	8.75	4.44	2	2.87	2.07	3	2.75	1.64
25/06/2018		11			5.5			4		
23/08/2018		14			4			4		
22/10/2018		8			0			0		
21/04/2018	BR5	1	7.5	4.09	3	4	1.00	2	2.75	0.75
25/06/2018		11			6			3		
23/08/2018		11			4			4		
22/10/2018		7			3			2		
21/04/2018	CB4	8	13	5.56	6	5.5	1.80	4	3.5	0.87
25/06/2018		19.5			8			4		
23/08/2018		17.5			5			4		
22/10/2018		7			3			2		
21/04/2018	PT1	6	13.75	6.82	6	4.625	2.94	4	2.75	1.64
25/06/2018		19.5			8			4		
23/08/2018		21.5			4.5			3		
22/10/2018		8			0			0		

Continuação Tabela S6:

B27	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	2	0	22	12	0%	8%	
A27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	1	24	0	0%	0%	
BR5	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	0	0	21	16	0%	0%	
BL6	-	0	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	0	0	0	16	36%	0%	0%	
B44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	0	23	8%	0%	0%	
23/08/2018	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25											
B16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	25	0%	0%	0%	
PT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	23	4%	0%	0%	
B35	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	23	4%	0%	0%	
CB4																																				
A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	1	22	8%	0%	0%		
B43	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0	0	2	18	22%	0%	0%	
A18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	24	4%	0%	0%	
A35	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0	0	2	18	22%	0%	0%	
B52	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	23	4%	0%	0%	
A36	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0	0	22	12%	0%	0%	
B27																																				
A27	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	24	4%	0%	0%	
BR5	-	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0	2	0	18	28%	0%	8%	
BL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	0	23	8%	0%	0%	
B44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	1	1	0	14	44%	4%	4%	
22/10/2018	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25											
B16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	1	22	8%	0%	0%	
PT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	0	23	8%	0%	0%	
B35	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	0	0	0	20	20%	0%	0%	
CB4	-	0	-	0	-	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	1	0	0	17	32%	4%	0%	
A4																																				
B43	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	0	0	0	12	52%	0%	0%	
A18	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0	0	0	19	24%	0%	0%	
A35	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0	1	21	13%	0%	0%	
B52	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0	1	1	18	28%	0%	4%	
A36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	1	0	22	15%	0%	4%	
B27	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	0	23	8%	0%	0%	
A27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	24	4%	0%	0%	
BR5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	2	21	9%	0%	0%
BL6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	24	4%	0%	0%	
B44																																				