

Avaliação de Colónias de *Apis mellifera iberiensis* Sujeitas à Seleção Darwiniana

Larissa Fonseca da Cunha

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

Orientado por

Ana Rita Gomes Lopes de Brito

Maria Alice da Silva Pinto

Fabiana Martins Costa Maia

Esta dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Bragança

2025

FINANCIAMENTO DO PROJETO

Este trabalho foi conduzido no âmbito do projeto Better-B, financiado pela União Europeia, pela Secretaria de Estado da Suíça para a Educação, Investigação e Inovação e pela Investigação e Inovação do Reino Unido, sob a garantia de financiamento do programa Horizonte Europa ao governo do Reino Unido (referência 10068544). A Fundação para a Ciência e Tecnologia forneceu apoio financeiro através de fundos nacionais (FCT/MCTES) ao CIMO (PIDDAC): CIMO, UIDB/00690/2020 (DOI: 10.54499/UIDB/00690/2020) e UIDP/00690/2020 (DOI: 10.54499/UIDP/00690/2020); e SusTEC, LA/P/0007/2020 (DOI: 10.54499/LA/P/0007/2020).

À minha mãe, que criou uma filha sensível e com asas para voar pelo mundo. Em memória do meu tio Antônio Carlos Fonseca “Tio Carlos”, quem sempre me incentivou e levo no coração. *“Como sou pouco e sei pouco, faço o pouco que me cabe me doando por inteiro.”* – Ariano Suassuna

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese representa o culminar de uma jornada académica intensa, marcada por grandes desafios e aprendizagens inesquecíveis. Como nenhuma pesquisa se faz sozinha, este trabalho reflete o apoio de muitas pessoas e instituições.

À minha orientadora Dr.^a Ana Rita Lopes, cujo brio pelo conhecimento me cativou desde o início, a ti agradeço a paciência, a orientação, o rigor e a ponderação, que foram bússolas para a concretização desta investigação. E, a jusante do ambiente académico, pelas palavras de incentivo e pelos sorrisos, mesmo em horas nubladas (afinal, tornamo-nos experts em correr da chuva e levar o trabalho a cabo).

Às minhas co-orientadoras, Prof.^a Dr.^a Alice Pinto, do IPB, pelas contribuições valiosas que enriqueceram minha visão sobre a apicultura, a genética e a persistência. E à Prof.^a Dr.^a Fabiana Martins Costa, da UTFPR-DV, por me acolher e apresentar o melhoramento genético de abelhas, forjando a base da apicultura que me permitiu percorrer o caminho deste mestrado.

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Dois Vizinhos (UTFPR-DV), e ao programa de Dupla Diplomação, cujo suporte institucional e financiamento através da bolsa Nilo Peçanha tornaram esta experiência internacional realidade. Estendo o reconhecimento ao projeto Better-B pelo apoio financeiro e ao Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação de Montanha pelo acesso aos recursos necessários para a realização deste trabalho. Aqui agradeço aos meus colegas do grupo de pesquisa em genética de abelhas, tanto do IPB quanto da UTFPR-DV, pela colaboração técnica e pelo ambiente enriquecedor.

Como a vivência num novo país traz desafios únicos, aos meus amigos (e às minhas meninas), obrigada por tornarem os desafios num novo país mais leves e por partilharem as angústias, as celebrações, as risadas e o forró. À minha família, o meu agradecimento mais profundo, vocês foram o meu alicerce inabalável. Mesmo separados pela distância física, o vosso amor, conforto e presença constante foram o combustível que me fez persistir em cada etapa.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente para este projeto, muito obrigada. Este percurso transcendeu fronteiras geográficas e académicas, consolidando laços que levarei para a vida e ensinamentos que serão os pilares do meu futuro profissional e pessoal.

RESUMO

A apicultura enfrenta desafios globais devido ao complexo hospedeiro-parasita liderado pelo ácaro *Varroa destructor*. A Seleção Darwiniana, caracterizada pela ausência de aplicação de acaricidas, surge como uma estratégia evolutiva para a criação de populações localmente adaptadas e resilientes. O presente estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência e a dinâmica populacional das abelhas e da varroa de 53 colónias de *Apis mellifera iberiensis* sujeitas a este protocolo no Nordeste de Portugal (2024–2026). Monitorizou-se a infestação por varroa (forética e queda natural), assim como o comportamento defensivo. A monitorização contínua do peso e temperatura interna do ninho foi garantida através do sistema de telemetria BEEP. A origem materna foi caracterizada via análise de DNA mitocondrial, enquanto que a avaliação da infestação e dos possíveis preditores de sobrevivência foi realizada através da aplicação de Modelos Lineares Mistos e Modelos de Risco Proporcional de Cox. A análise do DNA mitocondrial revelou que 85% das colónias pertencem à linhagem africana (A), enquanto que as restantes 15% pertencem a linhagens europeias (M e C). O ensaio culminou numa mortalidade global de 94%, sendo que as 3 colónias sobreviventes são da linhagem A. A modelação de Cox revelou uma contrapartida populacional, nomeadamente, as colónias mais fortes em julho apresentaram um risco letal significativamente maior no inverno (risco de mortalidade aumenta 32,8% para cada quadro de abelhas e unidade de varroa), associado à elevada disponibilidade de criação para a reprodução do ácaro. Estatisticamente, a letalidade associada à varroa concentrou-se nos meses de junho e setembro, comprometendo o desenvolvimento fisiológico das abelhas de inverno. O comportamento defensivo, avaliado pelo teste de agressividade, não apresentou correlação com a sobrevivência, sugerindo independência genética face à resistência ao ácaro. A telemetria corroborou o declínio em 2025, em que perdas precoces de peso e severas amplitudes térmicas internas (até 15 °C) funcionaram como indicadores da perda de termorregulação das colónias. Conclui-se que o protocolo foi um filtro seletivo eficaz na identificação de génotipos locais tolerantes (Rainhas 1 e 12), sendo a resistência à varroa fortemente dependente da origem genética materna e não do vigor populacional da colónia na época apícola ativa.

Palavras-chave: *Apis mellifera iberiensis*, *Varroa destructor*, seleção natural, monitorização, sobrevivência, telemetria.

ABSTRACT

Beekeeping faces global challenges due to the host-parasite complex led by the mite *Varroa destructor*. Darwinian Selection, characterised by the absence of acaricide use, emerges as an evolutionary strategy for the creation of locally adapted and resilient populations. This study aimed to assess the survival and population dynamics of bees and varroa mites in 53 colonies of *Apis mellifera iberiensis* subjected to this protocol in north-eastern Portugal (2024–2026). Varroa infestation (phoretic and natural fall) was monitored, as well as defensive behaviour. Continuous monitoring of nest weight and internal temperature was ensured using the BEEP telemetry system. Maternal origin was characterised via mitochondrial DNA analysis, whilst the assessment of infestation and potential predictors of survival was carried out using Mixed Linear Models and Cox Proportional Hazards Models. Mitochondrial DNA analysis revealed that 85% of the colonies belong to the African lineage (A), whilst the remaining 15% belong to European lineages (M and C). The trial resulted in an overall mortality rate of 94%, with the three surviving colonies belonging to lineage A. Cox modelling revealed a population trade-off, specifically, the strongest colonies in July exhibited a significantly higher lethal risk in winter (mortality risk increases by 32.8% for each frame of bees and varroa unit), associated with high brood availability for mite reproduction. Statistically, varroa associated mortality was concentrated in June and September, compromising the physiological development of winter bees. Defensive behaviour, assessed by the aggression test, showed no correlation with survival, suggesting genetic independence from mite resistance. Telemetry corroborated the decline in 2025, where early weight loss and severe internal temperature fluctuations (up to 15 °C) served as indicators of the colonies' loss of thermoregulation. It is concluded that the protocol was an effective selective filter for identifying tolerant local genotypes (Queens 1 and 12), with varroa resistance being strongly dependent on maternal genetic origin rather than the colony's population vigour during the active beekeeping season.

Keywords: *Apis mellifera iberiensis*, *Varroa destructor*, natural selection, monitoring hives, survival, telemetry.

ÍNDICE

FINANCIAMENTO DO PROJETO	ii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. A evolução do gênero <i>Apis</i> e a conquista de novos habitats	14
3.2. Diversificação e linhagens morfológicas da <i>Apis mellifera</i>	14
3.3. A <i>Apis mellifera iberiensis</i> e o <i>hotspot</i> peninsular	15
3.4. Vulnerabilidade evolutiva e o ciclo reprodutivo da <i>Varroa destructor</i>	17
3.5. A interferência do manejo apícola na seleção natural e coevolução	21
3.6. Resiliência natural e os mecanismos de adaptação ao hospedeiro	22
3.7. Protocolo de Seleção Darwiniana como ferramenta de adaptação local	26
3.8. Perspetivas e limitações da Seleção Darwiniana.....	27
3.9. Metodologias de avaliação da infestação e sobrevivência	28
3.9.1. Métodos de campo para estimativa da infestação e força da colónia.....	28
3.9.2. Avaliação da sobrevivência e a dinâmica longitudinal da infestação	29
3.9.3. Monitorização remota e não invasiva.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Cronologia das atividades realizadas.....	32
4.2. Caracterização da população	33
4.3. Protocolo de Seleção Darwiniana para o segundo ano.....	33
4.4. Avaliação da infestação por varroa	35
4.4.1. Estimativa da taxa de infestação forética	35
4.4.2. Monitorização da queda natural de ácaros	36
4.5. Teste de agressividade	38
4.6. Determinação da linhagem evolutiva	39
4.7. Monitorização do desenvolvimento das colónias em tempo real	41
4.8. Análise estatística	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.1. Origem materna evolutiva: caracterização genética do apiário.....	44
5.2. Análise descritiva e associações iniciais	45
5.3. Evolução temporal da pressão parasitária	53
5.4. Sobrevivência global e indicadores de risco.....	55
5.4.1. Dinâmica temporal do risco de mortalidade.....	58
5.4.2. Dinâmica sazonal de peso e termorregulação.....	61
6. CONCLUSÃO.....	65
7. REFERÊNCIAS	68
8. ANEXOS	75
8.1. Especificações técnicas do hardware (Base BEEP)	75
8.2. Detalhes sobre a interface digital do sistema BEEP	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico e dinâmica populacional da varroa (<i>Varroa destructor</i>).	20
Figura 2: Diagrama de Gantt ilustrativo do delineamento experimental e do cronograma de atividades executadas ao longo do ensaio (2025-2026).	32
Figura 3: Modelo de Apidea com três quadros e alimentador utilizado a campo.	35
Figura 4: Procedimentos de amostragem e quantificação da infestação forética por varroa através do método de lavagem com água e detergente..	36
Figura 5: Preparação e instalação do material para monitorização da queda natural de <i>Varroa destructor</i>	37
Figura 6: Representação esquemática do delineamento experimental e do protocolo de monitorização da infestação por <i>Varroa destructor</i> pelo método de queda natural.....	37
Figura 7: Procedimentos para a avaliação do índice de agressividade das colónias através do teste da bandeira.	39
Figura 8: Vistas em perspetiva e posterior de uma colmeia experimental, evidenciando o posicionamento da Base BEEP.	42
Figura 9: Base BEEP utilizada.	42
Figura 10: Frequência dos haplótipos nas rainhas originais.....	45
Figura 11: Dinâmica populacional das colónias no período ativo representada pelo número de quadros com abelhas.....	48
Figura 12: Dinâmica populacional da varroa de maio a junho em ácaros/dia (queda natural).....	48
Figura 13: Distribuição da taxa de infestação por varroa.	50
Figura 14: Índice de agressividade ao longo do tempo.	51
Figura 15: Gráfico de correlação de Spearman entre a queda natural de varroa (ácaros/dia) e a taxa de infestação (%) observadas em junho.	52
Figura 16: Gráfico de dispersão e correlação de Spearman entre o índice de agressividade e a força da colónia, correspondentes aos valores médios do trimestre de julho a setembro	52
Figura 17: Queda natural de varroa (ácaros/dia) registada ao longo dos meses de acompanhamento, estratificada pelos dois grupos de infestação inicial.	54
Figura 18: Curva de sobrevivência global (Kaplan-Meier) das colónias ao longo do período experimental (2025/2026).	56

Figura 19: Curvas de sobrevivência estratificadas (Kaplan-Meier) das colónias ao longo do período experimental (2025/2026).	57
Figura 20: Evolução comparativa do peso médio diário (kg) das colónias em 2024 (A) e 2025 (B).	62
Figura 21: Evolução comparativa da amplitude térmica diária (°C) do ninho em 2024 (A) e 2025 (B).	64
Figura 22: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização geral e as funcionalidades da aba “Editar colmeia”.	76
Figura 23: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização geral e as funcionalidades da aba “Editar rainha”.	76
Figura 24: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando a visualização do cabeçalho do histórico de inspeções de uma colmeia, na aba “Ver inspeções”.	77
Figura 25: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização geral e as funcionalidades da aba “Nova inspeção”.	77
Figura 26: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização das medições de uma base BEEP.	79
Figura 27: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização de Alertas.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Terminologia e definições relacionadas à interação entre <i>A. mellifera</i> e varroa.	24
Tabela 2: Populações sobreviventes e respectivos mecanismos significativos evidenciados.	25
Tabela 3: Síntese das vantagens ecológicas e limitações práticas do protocolo de Seleção Darwiniana.	27
Tabela 4: Cronologia e síntese dos procedimentos de manejo estabelecidos pelo protocolo de Seleção Darwiniana aplicados durante o ano de 2025.	34
Tabela 5: Dados descritivos da sobrevivência das colônias até o segundo ano de Seleção Darwiniana (2024/2025).	46
Tabela 6: Estatística descritiva geral das variáveis avaliadas no campo para o ano 2025/2026.	47
Tabela 7: Razão de Risco (HR) e Intervalos de Confiança (IC = 95%) estimados por Modelos de Riscos.	61

1. INTRODUÇÃO

A apicultura moderna enfrenta desafios sanitários sem precedentes. Como consequência da globalização, observou-se um aumento expressivo de agentes patogénicos que afetam a abelha melífera (*Apis mellifera*). O caso mais paradigmático e destrutivo resultou de um fenómeno de mudança de hospedeiro protagonizado pela *Varroa destructor*. Historicamente confinado à *Apis cerana*, a sua transição para as colónias de *A. mellifera* transformou-o na maior ameaça biológica enfrentada pela apicultura à escala global (Blacquièrre et al., 2019; Mondet et al., 2020).

O controlo desta ameaça na apicultura comercial baseia-se, predominantemente, na aplicação sistemática de acaricidas (quer orgânicos quer químicos). Esta prática apresenta uma clara dualidade, na medida em que, se, por um lado, assegura a sobrevivência imediata das colónias e o retorno económico para os apicultores, por outro, atua como um bloqueio direto à coevolução entre a *A. mellifera* e a *V. destructor* (Blacquièrre & Panziera, 2018; Neumann & Blacquièrre, 2017). Ao controlar artificialmente a população do ácaro, o manejo apícola suprime o estímulo biológico necessário para que as abelhas desenvolvam e fixem mecanismos genéticos e comportamentais de resistência e tolerância, condenando-as a uma dependência crónica da intervenção humana (Locke, 2016).

Consciente desta limitação imposta pelas práticas de gestão, uma solução duradoura para a varroa deve ser procurada na própria resiliência natural das abelhas (Mondet et al., 2020). Na Europa, *A. mellifera* é uma espécie nativa, cujas populações apresentam um longo historial de adaptação local a uma ampla diversidade de condições ambientais. Apesar da hibridação e da pressão de seleção artificial para traços produtivos, a abelha melífera mantém os seus instintos primitivos intactos e um elevado potencial de adaptação contínua (Blacquièrre & Panziera, 2018). Para que este potencial se traduza numa resistência efetiva, é imperativo restabelecer a relação natural hospedeiro-parasita, permitindo que a própria *V. destructor* exerça a sua pressão seletiva e atue como o motor evolutivo da colónia.

Portanto, para promover uma apicultura sustentável e mitigar a dependência de acaricidas, é essencial adotar um método baseado na biologia evolutiva, em que as condições de manejo sejam alinhadas o mais próximo possível ao que ocorre na natureza (Blacquièrre & Panziera, 2018). Em vez de limitar os processos coevolutivos, devem-se

adotar soluções baseadas na seleção natural, permitindo que as abelhas expressem e desenvolvam os seus próprios mecanismos naturais de defesa (Neumann & Blacqui re, 2017).

Neste contexto, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar a sobrevivência, o desenvolvimento e a capacidade de adaptação de col nias de *Apis mellifera iberiensis*   infestação por *V. destructor*. Para tal, o estudo baseia-se na aplicação do protocolo de Seleção Darwiniana (*Darwinian Black Bee Box*; Blacqui re et al., 2019), um maneio de intervenção mínima, pelo qual procura-se compreender de que forma estas abelhas locais respondem, resistem e se adaptam   pressão parasitária contínua do  caro *V. destructor*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a sobrevivência, o desempenho e o potencial de adaptação de col nias de *Apis mellifera iberiensis* inseridas num apiário sujeito ao protocolo de Seleção Darwiniana.

2.2. Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral delineado, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar os parâmetros de desempenho e o desenvolvimento populacional das col nias (força da col nia);
- Monitorizar a dinâmica das col nias através da avaliação contínua de variações de peso e temperatura interna, recorrendo à utilização do sistema BEEP (ferramentas digitais de precisão para apicultores);
- Quantificar o nível de infestação e a pressão parasitária exercida pelo  caro *Varroa destructor* nas col nias avaliadas;
- Avaliar o comportamento defensivo das col nias através da aplicação de testes de agressividade;
- Determinar a linhagem evolutiva das col nias em estudo através da análise de DNA mitocondrial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A evolução do gênero *Apis* e a conquista de novos habitats

A família Apidae caracteriza-se pela sua existência em comunidades sociais e pela presença de órgãos especializados na recolha de pólen. Dentro desta família está o gênero *Apis*, cujas espécies se diferenciam por características morfológicas, comportamentais e de distribuição geográfica (Ruttner, 1988).

As principais características biológicas do gênero *Apis* surgiram no início do período Terciário (Oligoceno). Estas incluem a construção de ninhos ao ar livre com favos verticais de cera com células hexagonais bilaterais, a proteção por um denso enxame de obreiras, a alimentação progressiva das larvas, a reprodução por enxameação e a comunicação através da dança em oito (*waggle dance*). Este tipo primário manteve-se sem alterações substanciais ao longo de todo o Terciário. Contudo, por estar estritamente adaptado às condições ecológicas tropicais, este tipo “conservador” de *Apis* foi extinto na Europa devido à deterioração climática observada no final deste período (Ruttner, 1988).

Durante o Pleistoceno, a emergência de climas temperados, associada à última Era Glaciar, marcou a evolução das abelhas *Apis*. Para sobreviver a estas novas condições, as abelhas adaptaram-se, passando a nidificar em cavidade como forma de desenvolver a capacidade de termorregulação corporal e atingir a homeostase térmica. Além disso, houve o aperfeiçoamento da comunicação por meio da dança. Em conjunto, estas adaptações comportamentais permitiram a ampliação da área de distribuição do gênero, outrora restrito aos trópicos, para as regiões temperadas da Europa e da África. Este fenómeno de dispersão e adaptação destacou-se sobretudo nas espécies *A. mellifera* e *A. cerana*, muito próximas na árvore filogenética.

3.2. Diversificação e linhagens morfométricas da *Apis mellifera*

Ainda durante o Pleistoceno, as oscilações climáticas promoveram períodos de maior conectividade entre a África e a Europa, nomeadamente através de fases mais húmidas no Saara, facilitando a dispersão da *A. mellifera*. Embora a origem da espécie permaneça objeto de debate científico, com hipóteses a apontar para a Ásia ou a África (Dogantzis et al., 2021; Whitfield et al., 2006), a bacia do Mediterrâneo desempenhou um papel fundamental como zona de expansão e diferenciação. Foi nesta região que, em refúgios glaciares, se consolidaram subespécies europeias importantes: *A. m. mellifera* na

Península Ibérica, *A. m. ligustica* nos Apeninos e *A. m. carnica* no sul da Península Balcânica (Ruttner, 1988).

A espécie *A. mellifera* (Linneaus, 1758), destaca-se por seu alto nível de aptidão. Ao longo da sua evolução, diversificou-se em subespécies com adaptações específicas para diversas combinações de cenários, desde climas temperados frios até tropicais, variando a humidade, padrões de criação e diferentes taxas de reprodução (Ruttner, 1988). A exposição prolongada a invernos rigorosos, por exemplo, forçou algumas subespécies de *A. mellifera* a desenvolver características de sobrevivência. Tais como o aumento do tamanho individual, maior eficiência na termorregulação, mudança na composição corporal e menor e mais precoce propensão à enxameação (Ruttner, 1988).

Atualmente, 31 subespécies podem ser diferenciadas com base em características morfométricas e genéticas, embora Ruttner (1988) tenha caracterizado inicialmente apenas 24. Estas subespécies estão distribuídas em 4 linhagens evolutivas principais (Ruttner, 1988; Hepburn & Radloff, 1998; Engel, 1999; Sheppard & Meixner, 2003; Meixner et al., 2011; Chen et al., 2016; Ilyasov et al., 2020):

- **Linhagem A (África):** agrupa as subespécies do continente africano tais como *A. m. intermissa*, *A. m. litorea*, *A. m. lamarckii*, *A. m. adansonii*, *A. m. scutellata*, *A. m. sahariensis*, entre outras.
- **Linhagem M (Europa Ocidental e Central):** agrupa as abelhas de clima temperado ocidental, como *A. m. mellifera* e *A. m. iberiensis*.
- **Linhagem C (Leste Europeu e Balcãs):** na qual se inserem subespécies como *A. m. cecropia*, *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*.
- **Linhagem O (Médio Oriente e Cáucaso):** constituído por subespécies como *A. m. pomonella* ou *A. m. remipes*.

Apesar de partilharem um ancestral comum com características "progressivas" (como a termorregulação e a nidificação em múltiplas cavidades), foi o isolamento geográfico causado por barreiras naturais, como o Mar Mediterrâneo e as cadeias montanhosas, que permitiu esta vasta diversificação morfológica e ecológica ao longo do Pleistoceno.

3.3. A *Apis mellifera iberiensis* e o hotspot peninsular

A Península Ibérica funcionou como um refúgio glacial durante o Pleistoceno, atuando (até hoje) como zona de contacto entre os continentes europeu e africano. Esta

fronteira geográfica moldou uma complexa zona de hibridação, tornando o território um “ponto quente”, *hotspot*, de diversidade genética mitocondrial e nuclear (Pinto et al., 2013; Chávez-Galarza et al., 2013). A subespécie endêmica resultante, *A. m. iberiensis* (Goetze, 1964), conhecida como abelha ibérica, caracteriza-se pela coocorrência de duas linhagens evolutivas divergentes, a da Europa Ocidental (Linhagem M) e a Africana (Linhagem A), que formam um gradiente de distribuição ao longo do território (Pinto et al., 2013). Embora seja morfologicamente agrupada na linhagem M (Ruttner, 1988), a sequenciação da região intergênica tRNA^{leu}-cox2 do ADN mitocondrial (mtDNA) tem revelado elevada variação e forte afinidade evolutiva com as subespécies africanas (Pinto et al., 2013; Chávez-Galarza et al., 2017; Gebremedhn et al., 2025).

O mtDNA, dada a sua herança matrilinear e ausência de recombinação, é o marcador padrão para inferência filogenética em *A. mellifera* (Garnery et al., 1993; Guedes, 2010). A região intergênica tRNA^{leu}-cox2 caracteriza-se por um polimorfismo de comprimento resultante de variações nos elementos estruturais P e Q. A combinação destes elementos é o que permite a discriminação das linhagens evolutivas: a linhagem C é caracterizada pela ausência total do elemento P, enquanto as linhagens M e A são portadoras das formas P0 e P1, respetivamente, em associação com uma ou mais cópias do elemento Q (Garnery et al., 1993; Chávez-Galarza et al., 2017).

A abelha ibérica apresenta um fenótipo adaptado às variações ambientais acentuadas. Esta subespécie é caracterizada pela sua rusticidade, suportando invernos de zonas temperadas e altas temperaturas características dos climas mediterrânicos. Ao mesmo tempo que mantém comportamentos primitivos pronunciados, nomeadamente uma reação defensiva rápida, uma elevada propensão à enxameação e uma recolha abundante de própolis. Morfologicamente, distingue-se por um abdómen mais largo e asas dianteiras mais estreitas (Ruttner, 1988).

Historicamente, a apicultura comercial tem negligenciado os comportamentos naturais e as escolhas da colónia, realizando uma seleção artificial intensiva contra características consideradas indesejáveis para o manejo humano, como a tendência de enxameação e o comportamento defensivo. No entanto, estes comportamentos podem estar intimamente ligados à vitalidade e aos instintos de sobrevivência originais da espécie (Blacquièrre et al., 2019). A conservação desta diversidade genética e fenotípica é potenciada a uma escala local quando se utilizam abordagens como a Seleção

Darwiniana, que promovem a manutenção de populações localmente adaptadas (Blacqui re et al., 2019).

3.4. Vulnerabilidade evolutiva e o ciclo reprodutivo da *Varroa destructor*

A compreensão da taxonomia e do histórico de invasão do  caro *Varroa destructor*   fundamental para o desenvolvimento de estratégias de mitigação. Durante décadas, assumiu-se que o ácaro ectoparasita responsável pelo declínio global da abelha melífera ocidental (*A. mellifera*) era a *Varroa jacobsoni*, descrita originalmente no início do século XX como parasita natural da abelha asiática (*A. cerana*). No entanto, estudos gen tipicos, fen tipicos e reprodutivos rigorosos realizados diferenciaram uma nova espécie, a *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000) (daqui em diante mencionada apenas como varroa). Esta nova espécie foi responsável pela migração de hospedeiro e   a principal ameaça patológica   apicultura global (Blacqui re et al., 2019; Mondet et al., 2020).

Para compreender a vulnerabilidade da *A. mellifera*   varroa, é fundamental observar sua história evolutiva e a da irmã, a *A. cerana*. Ambas as espécies se encontram num estágio evolutivo relativamente próximo, tendo-se separado imediatamente antes ou durante o Pleistoceno (há cerca de 1 a 2 milhões de anos), sem terem entrado em contacto posteriormente na natureza. As duas espécies partilham vantagens adaptativas, nomeadamente a nidificação em favos múltiplos, a homeostase de temperatura (termorregulação eficiente) e a comunicação através da dança em oito (*waggle dance*). Adicionalmente, partilham a mesma sequência de funções laborais ao longo da vida (limpeza, cuidado com a criação, construção e forrageamento), embora, na *A. cerana* o ciclo biológico seja ligeiramente mais acelerado (Ruttner, 1988).

No entanto, a separação geográfica definiu trajetórias coevolutivas distintas em relação   varroa. A *A. cerana* desenvolveu, após milhares de anos de interação, uma relação hospedeiro-parasita estável baseada em defesas biológicas, nomeadamente, a restrição da reprodução do ácaro aos alvéolos de z ng o e a remoção ativa dos parasitas por meio de comportamento de limpeza (autolimpeza e alolimpeza) (Ruttner, 1988). Em contraste, devido   sua história evolutiva mais curta, estimada a partir de meados do século XX (aquando da introdução na Europa) (Traynor et al., 2020), a *A. mellifera* apresenta defesas comportamentais incipientes e menos evidentes (Ruttner, 1988; Panziera et al., 2017). Além disso, o sucesso invasivo da varroa (particularmente do mais

comum e virulento "Haplótipo Coreia") reside na sua extrema plasticidade reprodutiva, pois é capaz de se reproduzir tanto em alvéolos de zângãos quanto em obreiras (Traynor et al., 2020). Tal, resulta num crescimento populacional exponencial (Ruttner, 1988; De Miranda et al., 2013) e, se não for controlado ou alvo de seleção natural, leva ao colapso da colônia (Panziera et al., 2017; Traynor et al., 2020; Morfin et al., 2023).

Para compreender a dinâmica de disseminação da varroa é necessário analisar o seu ciclo de vida (ver Figura 1, painel A). O ciclo reprodutivo do ácaro está intimamente sincronizado com o desenvolvimento da criação. O processo inicia-se quando a fêmea fundadora (mãe) invade um alvéolo com criação instantes antes da operculação. Para garantir o sucesso reprodutivo, a fêmea deve ovipositar um ovo não fecundado (macho) entre 60 e 70 h após a invasão da célula, seguido da postura de um ou mais ovos fecundados (fêmeas). A descendência deve maturar e acasalar no alvéolo com criação, período em que as fêmeas estão em fase reprodutiva, antes da emergência da abelha. O ciclo reprodutivo completo da varroa dura cerca de 12 dias nos alvéolos de obreiras e 15 dias nos alvéolos de zângãos. Em condições de campo, cada fêmea fundadora consegue completar entre 1,5 e 3 ciclos reprodutivos ao longo de sua vida. Após a emergência da abelha, o macho morre e as fêmeas recém-fecundadas, juntamente com a fêmea fundadora, iniciam a fase forética. Durante esta etapa, parasitam as abelhas adultas até localizarem um novo alvéolo com criação para reiniciar o ciclo (De Miranda et al., 2013; Traynor et al., 2020). O sucesso reprodutivo pode falhar se a fêmea não ovipositar ovos viáveis, se não gerar descendência masculina ou se iniciar a postura demasiado tarde em relação à pupação da abelha (De Miranda et al., 2013).

A dinâmica populacional e a proliferação da varroa flutuam substancialmente ao longo das estações do ano, acompanhando o ciclo da colônia, conforme ilustrado no painel B da Figura 1. Na primavera, durante a expansão da colônia, a varroa exibe uma preferência oito vezes maior por parasitar a criação de zângão. O período de operculação mais longo dos zângãos permite à fêmea fundadora gerar, em média, 1,6 a 2,5 filhas viáveis, em contraste com apenas 0,7 a 1,45 filhas na criação de obreira. Durante o verão e após a época de enxameação, a redução drástica ou cessação da criação de zângãos força a varroa a reproduzir-se nos alvéolos de obreira. No final do verão, à medida que a área de criação diminui e a população de ácaros aumenta, torna-se frequente a co-infestação de um único alvéolo por múltiplas fêmeas fundadoras. Embora isto reduza a taxa de

reprodução individual de cada ácaro, aumenta a produção de descendência fecundada e o intercâmbio genético. No outono e inverno, com a diminuição drástica da criação, a população de varroa perde os seus locais de reprodução, sendo forçada a refugiar-se maioritariamente sobre a população de abelhas adultas de inverno, que possuem um corpo gordo mais desenvolvido, na fase forética, o que leva a uma redução da população global do ácaro até à primavera seguinte (Traynor et al., 2020).

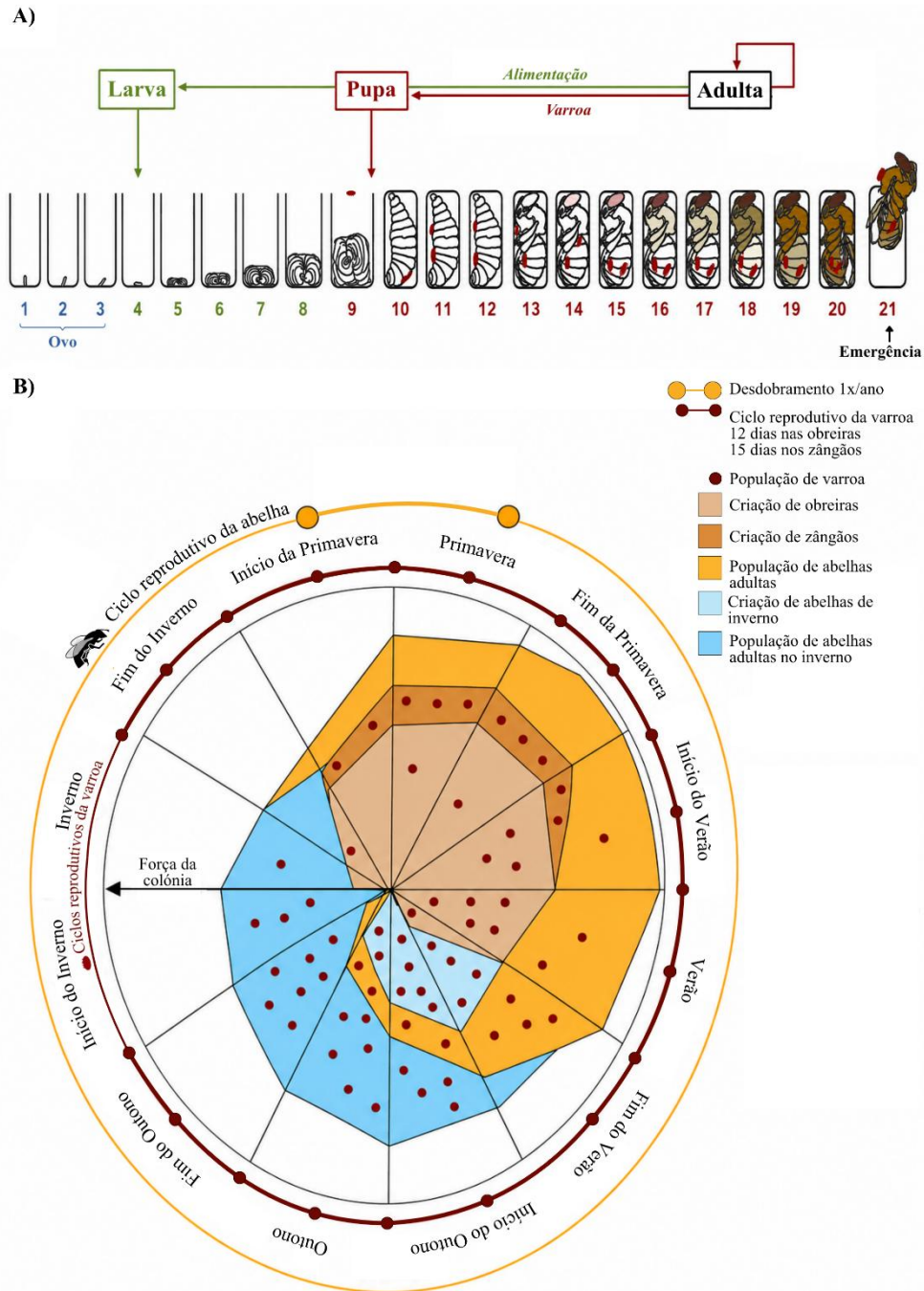


Figura 1: Ciclo biológico e dinâmica populacional da varroa (*Varroa destructor*). (A) Ciclo reprodutivo individual do ácaro durante o desenvolvimento da abelha, destacando as vias de transmissão de patógenos, em especial a transmissão direta pela varroa (setas vermelhas). (B) Flutuação sazonal da população do ácaro numa colônia não tratada, evidenciando a dependência da presença de criação de zangãos na primavera e o refúgio forético sobre as abelhas adultas durante a paragem de postura no inverno. Fonte: Adaptado de Traynor et al. (2020).

A varroa afeta, direta e indiretamente, a saúde das abelhas (Morfin et al., 2023). Ainda na fase reprodutiva, as ninfas se alimentam da hemolinfa das pupas e, na fase forética, dos tecidos adiposos das abelhas adultas. Enquanto se alimenta, a saliva da varroa secreta proteínas que podem afetar a resposta imune, o metabolismo e funções

neurais das abelhas (Morfin et al., 2023). Além disso, a varroa atua como um vetor de vírus patógenos, como o vírus das asas deformadas (Deformed wing virus – DWV – *Iflavirus aladeformis*). A varroa, ao alimentar-se dos tecidos de uma abelha infetada, seja pupa ou adulta, e transitar entre outros indivíduos, adquire e transmite os vírus a novas abelhas durante o processo de alimentação (Traynor et al., 2020). Esta transmissão contribui significativamente para o colapso das colônias quando não são aplicadas medidas de controlo (Blacquièrre et al., 2019; Mondet et al., 2020; Morfin et al., 2023).

Até o momento, o controlo da varroa baseia-se na utilização de acaricidas químicos e orgânicos (Traynor et al., 2020; Morfin et al., 2023). No entanto, esta prática induz um ciclo vicioso, na medida em que suprime a pressão seletiva necessária para que as abelhas desenvolvam e fixem suas adaptações, ao mesmo tempo que induz o desenvolvimento de resistência cruzada aos acaricidas por parte das populações de varroa (Blacquièrre et al., 2019).

3.5. A interferência do manejo apícola na seleção natural e coevolução

Para além da barreira evolutiva imposta pelo uso sistemático de acaricidas, a apicultura comercial intensiva engloba diversas práticas de manejo que atuam como impeditivos diretos da coevolução e da resiliência natural das abelhas (Neumann & Blacquièrre, 2017). A elevada densidade de colmeias nos apiários, por exemplo, facilita a deriva e a rápida transmissão horizontal de patógenos. Simultaneamente, a seleção artificial direcionada para a promoção de características como a elevada produção de mel e a docilidade tem privilegiado determinados traços de interesse apícola, podendo, em alguns casos, influenciar a expressão de comportamentos naturais, como o comportamento defensivo, a enxameação e a produção de própolis. Estes comportamentos desempenham um papel relevante na defesa e na saúde da colónia, sendo considerados componentes importantes da sua resposta coletiva aos agentes patogénicos. A inseminação artificial e a utilização de um número reduzido de zângãos nos apiários de fecundação limitam o potencial poliândrico das rainhas, reduzindo drasticamente a diversidade genética da colónia e os alelos disponíveis para a resposta imunitária coletiva (Blacquièrre & Panziera, 2018).

Outra perturbação profunda na dinâmica hospedeiro-parasita resulta da substituição artificial e frequente de rainhas, que contraria a forma como a natureza lida com os patógenos. Na reprodução natural (enxameação), a rainha progenitora sai da

colmeia com parte da população de obreiras e zângãos, levando consigo uma fração da população de parasitas residente, cuja relação hospedeiro-parasita já se encontrava estabelecida. A colmeia original, agora órfã, retém o restante da população de parasitas, mas inicia a criação de uma nova rainha (filha). À medida que a nova rainha acasala e a sua descendência emerge, a identidade genética da colônia altera-se gradualmente. Desta forma, assegura-se uma transmissão vertical: a colônia-filha herda da mãe os alelos de tolerância aos parasitas locais, podendo ainda adquirir novas vantagens genéticas através dos zângãos com os quais acasalou. Esta nova identidade genética, em parte herdada e em parte adquirida, aumenta a aptidão biológica global (Blacquièrre & Panziera, 2018).

Ao suprimir a enxameação e introduzir rotineiramente rainhas não locais, criadas em ambientes distintos, o apicultor interrompe este ciclo adaptativo. Os parasitas locais são subitamente expostos a genótipos completamente novos, o que força a transmissão horizontal de doenças e reinicia a relação hospedeiro-parasita. Consequentemente, a mudança contínua da transmissão vertical para a horizontal limita o potencial adaptativo da transmissão vertical (Blacquièrre & Panziera, 2018).

Ironicamente, o manejo apícola focado na alta produtividade tem um efeito contraproducente na saúde geral das abelhas. A utilização de tratamentos químicos contra a varroa, embora viabilize a produção imediata, anula a pressão seletiva. Sem este estímulo natural, as colônias ficam impedidas de desenvolver e consolidar os seus próprios mecanismos de defesa, condenando-se a uma dependência crônica da intervenção humana para sobreviver.

3.6. Resiliência natural e os mecanismos de adaptação ao hospedeiro

Uma transição sustentável para a apicultura exige explorar a biologia da espécie. Compreender as interações naturais e as adaptações entre as abelhas e a varroa é um primeiro passo essencial para alcançar soluções duradouras (Locke, 2016). Uma abordagem alternativa viável é a potenciação de características hereditárias de resistência ou tolerância por meio de programas de melhoramento genético ou de seleção de colônias que sobrevivem naturalmente sem tratamento (Mondet et al., 2020).

A nível genético, a sequenciação do genoma da *A. mellifera* revelou que a abelha possui um conjunto reduzido de genes associados à resposta imune. Adicionalmente, ao contrário dos vertebrados, as abelhas têm apenas sistema imune inato, isto é, não têm a capacidade de produzir anticorpos nem de desenvolver memória imunitária (Evans et al.,

2006; Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Esta aparente limitação imunitária a nível individual é amplamente compensada pela sua imunidade social, que assenta em respostas comportamentais, estratégias de limpeza mútua e higiene profilática coletiva ao nível do superorganismo (Evans et al., 2006).

É precisamente sobre este conjunto de defesas comportamentais que a seleção natural atua. Quando há abstenção de tratamentos, a seleção atua de forma bidirecional (Neumann & Blacqui re, 2017). Por um lado, as col nias capazes de tolerar a carga parasitária sobrevivem e transmitem os seus genes   geração seguinte (Blacqui re et al., 2019). Por outro lado, parasitas excessivamente virulentos correm o risco de aniquilar o hospedeiro de forma demasiado rápida, eliminando a sua própria via de transmissão e levando à sua própria extinção (*Superinfection exclusion, SIE*). Assim, com o passar do tempo e das gerações, a conjugac  o destes fen menos leva a uma atenuação da virulência do parasita e um aumento da resistência ou tolerância do hospedeiro (Blacqui re & Panziera, 2018).

A eficácia desta coevolução está comprovada em populações de *A. mellifera* ao redor do mundo, tanto em col nias geridas como em populações selvagens, que sobrevivem sem tratamento (Locke, 2016). Para compreender a base biológica desta sobrevivência, é essencial distinguir dois conceitos prévios, nomeadamente, a tolerância (capacidade do hospedeiro de mitigar os danos) e a resistência (capacidade de reduzir o sucesso reprodutivo do parasita) (Mondet et al., 2020). A Tabela 1 sumariza a terminologia padrão utilizada na identificação e nos estudos desta dinâmica hospedeiro-parasita.

Tabela 1: Terminologia e definições relacionadas à interação entre *A. mellifera* e varroa.

Terminologia em português	Terminologia em inglês	Definição
Comportamento higiênico sensível à varroa	<i>Varroa Sensitive Hygiene (VSH)</i>	Comportamento higiênico que identifica e elimina a cria infestada por varroa. Esta característica é avaliada através de ensaios que medem a eliminação da cria parasitada por varroa.
Crescimento da população de ácaros	<i>Mite Population Growth (MPG)</i>	A variação no número de ácaros numa população ao longo de um período específico. A ausência (ou o baixo) crescimento populacional constitui a base da resistência do hospedeiro.
Comportamento higiênico	<i>Hygienic behaviour (HYG)</i>	Sequência comportamental que consiste na localização, abertura e remoção de crias doentes, feridas, parasitadas ou mortas pelas abelhas operárias. Esta característica é normalmente avaliada através de ensaios com crias mortas por congelamento (<i>FKB</i>) ou por perfuração (<i>Pin test</i>).
Não-reprodução do ácaro	<i>Mite non-reproduction (MNR)</i>	A incapacidade de um ácaro fundador de produzir pelo menos uma fêmea adulta e acasalada que venha a integrar a população de ácaros da colônia quando a abelha em desenvolvimento emergir da célula como abelha adulta. Um ácaro fundador não terá sucesso na reprodução se não puser nenhum ovo (infértil), puser apenas um ovo, não produzir descendência masculina ou começar a pôr os seus ovos demasiado tarde em relação ao desenvolvimento da pupa da abelha.
Reoperculação	<i>Recapping</i>	Sequência comportamental que consiste em localizar, abrir e, em seguida, voltar a tapar as células de cria, o que pode levar à interrupção da reprodução dos ácaros. São necessárias mais investigações para confirmar que esta característica é totalmente distinta da <i>VSH</i> .
Limpeza/ Autolimpeza/ Alolimpeza	<i>Grooming/ Autogrooming/ Allogrooming</i>	Comportamento que consiste na remoção de varroa das abelhas adultas, seja por uma abelha infestada pelo próprio ácaro (autolimpeza) ou por uma abelha que limpa outra abelha (alolimpeza).
Virulência do ácaro	<i>Mite virulence</i>	Capacidade do ácaro (parasita) de causar danos ao seu hospedeiro.
Tolerância do hospedeiro	<i>Host tolerance</i>	Capacidade de um hospedeiro (colônia de abelhas ou abelha individual) de reduzir os efeitos nocivos causados pelo parasita.
Resistência do hospedeiro	<i>Host resistance</i>	Capacidade de um hospedeiro (colônia de abelhas ou abelha individual) de reduzir o sucesso reprodutivo do parasita, de modo que a infestação permaneça abaixo de um nível prejudicial.
Característica da abelha melífera	<i>Honey bee trait</i>	Uma característica estrutural ou funcional observável das abelhas melíferas ou das colônias de abelhas melíferas
Característica reguladora	<i>Regulatory trait</i>	Uma característica hereditária de natureza estrutural, fisiológica ou comportamental que confere resistência ou tolerância ao hospedeiro contra um parasita.

Fonte: Adaptado de Mondet et al. (2020).

Com base nestes conceitos, a literatura tem documentado diversas populações de abelhas que atingiram a resiliência por diferentes vias evolutivas. A Tabela 2 apresenta os principais exemplos de populações de *A. mellifera* sobreviventes à varroa e os

respetivos mecanismos de defesa significativos que desenvolveram ao longo da sua adaptação local.

Tabela 2: Populações sobreviventes e respetivos mecanismos significativos evidenciados.

Local	Mecanismo significativo
Brasil (africanizada)	<i>HYG</i> , <i>Grooming</i> , tamanho reduzido da colónia e menor tempo de desenvolvimento
África do Sul	<i>HYG</i> , <i>Grooming</i> , tamanho reduzido da colónia e menor tempo de desenvolvimento
Primorsky, Rússia	<i>HYG</i> e <i>Grooming</i>
Gotland, Suécia	Tamanho reduzido da colónia e <i>MPG</i>
Avignon, França	<i>MPG</i>
Arnot Forest, EUA	Tamanho reduzido da colónia

Fonte: Adaptado de Locke (2016).

Como se pode observar nas populações documentadas, a resiliência não decorre de um mecanismo universal, mas sim da combinação de várias características reguladoras. Numa revisão abrangente, Mondet et al. (2020) identificaram 15 mecanismos presentes em colónias sobreviventes. As características comportamentais mais expressas são a Não-reprodução do ácaro (*MNR*), a Higiene Sensível à Varroa (*VSH*), o *Grooming* e o *Recapping*. Adicionalmente, o tamanho reduzido da colónia, característico de populações selvagens, destacou-se como um limitante físico à reprodução exponencial do ácaro (Locke, 2016). A menor quantidade de abelhas e de cria limita o ciclo reprodutivo da varroa e, conseqüentemente, reduz a infestação da colónia. Muitas destas populações selvagens de *A. mellifera* que sobrevivem à varroa são colónias menores do que as domesticadas, uma vez que a pressão de seleção artificial para altos rendimentos de mel, insistida na apicultura, foi removida (Locke, 2016).

O resultado cumulativo destes mecanismos traduz-se num parâmetro central que é a redução do crescimento da população de ácaros (*MPG*). Nas populações sobreviventes, 95% apresentam um *MPG* reduzido, confirmando que a resistência (manter a infestação abaixo do nível prejudicial) explica a sobrevivência destas abelhas de forma mais robusta (Mondet et al., 2020). No entanto, quantificar mesmo algo aparentemente simples como o *MPG* em colónias de abelha melífera pode ser muito desafiante, porque existem variações e limitações nas metodologias para estimar a infestação da varroa (as quais serão abordadas ao decorrer desta revisão), bem como flutuações da proporção entre as populações de ácaros e abelhas. Nenhuma estimativa isolada consegue prever corretamente a população de parasitas na sua totalidade, a menos que sejam combinadas e/ou utilizadas em paralelo com modelos que permitam a inferência de padrões espaço-temporais dessas flutuações (Mondet et al., 2020).

Apesar da ampla documentação destas características, a sobrevivência da colônia raramente provém de um único traço isolado, resultando, em vez disso, da combinação e coocorrência de múltiplos mecanismos que conferem resiliência conjunta. Além disso, a importância e a expressão de adaptações específicas variam substancialmente consoante as condições ambientais e o contexto geográfico. Por exemplo, a forte resistência alcançada pelas abelhas africanizadas no Brasil baseia-se num conjunto de mecanismos diferentes do observado nas abelhas sobreviventes da Suécia (Locke, 2016; Mondet et al., 2020). A impossibilidade de definir uma via de adaptação padronizada reflete a complexidade do equilíbrio hospedeiro-parasita, tornando imperativo que os programas de seleção e melhoramento genético sejam desenvolvidos a nível local, respeitando os fenótipos e as pressões ecológicas de cada região (Panziera et al., 2017; Mondet et al., 2020; Moro et al., 2021).

3.7. Protocolo de Seleção Darwiniana como ferramenta de adaptação local

Os métodos de seleção para a resistência à varroa dividem-se, essencialmente, em seleção fenotípica direcionada (com foco no apuramento de traços específicos que contrariam o desenvolvimento da varroa) e seleção natural (com foco na sobrevivência por meio da abstenção de tratamentos). Para tornar a seleção natural aplicável e replicável em qualquer apiário local, Blacquièrre et al. (2019) propuseram o modelo *Darwinian Black Bee Box (DBBB)*. O programa, daqui em diante referenciado como Seleção Darwiniana, deve funcionar por pelo menos 4 anos seguidos.

Esta metodologia adota uma abordagem de "caixa negra", isto é, em vez de qualificar e procurar características vantajosas pré-definidas, permite-se que a seleção natural atue sobre a vitalidade e a sobrevivência da colônia face à pressão do ácaro. Tal como na teoria darwiniana, as colônias sobreviventes têm os alelos associados ao fenótipo mais bem-sucedido que se propagam à geração seguinte (Blacquièrre et al., 2019). Este método já foi posto em prática nos Países Baixos por dez anos e resultou em colônias resistentes à varroa (Panziera et al., 2017; Kruitwagen et al., 2017; Blacquièrre et al., 2019).

A execução do protocolo de Seleção Darwiniana arranca na primavera com 25 a 30 colônias locais geneticamente distintas. No primeiro ano, permite-se apenas um único tratamento acaricida (ácido oxálico) nestas colônias, antes do desdobramento, suspendendo-se o controlo de forma permanente a partir desse momento. O manejo

acompanha estritamente o ciclo reprodutivo sazonal natural das abelhas. Na prática, isto implica no desenvolvimento de zângãos e na criação de enxames artificiais (desdobramentos) na iminência da enxameação natural, evitando-se, assim, a perda do efetivo populacional.

O critério de seleção é rigoroso e restringe-se às colônias que demonstram elevado vigor primaveril, envolvimento na reprodução e capacidade de sobrevivência ao inverno. As colônias serão suplementadas com alimento artificial, de modo a evitar que a escassez introduza uma pressão de seleção adicional. Para garantir a estabilização e a fixação dos genes locais de resiliência, é imperativo que o acasalamento das novas rainhas ocorra numa área remota isolada (raio mínimo de 3 km) de apiários com manejo convencional e tratamentos químicos. Por outras palavras, as novas rainhas devem acasalar preferencialmente com machos provenientes do apiário de Seleção Darwiniana.

3.8. Perspetivas e limitações da Seleção Darwiniana

A implementação do modelo de Seleção Darwiniana representa uma mudança de paradigma na abordagem sanitária da apicultura moderna. Contudo, tal como qualquer modelo evolutivo aplicado à atividade económica, apresenta vantagens ecológicas consideráveis e desafios estruturais práticos. A Tabela 3 sintetiza as principais perspetivas e os desafios associados a este protocolo.

Tabela 3: Síntese das vantagens ecológicas e limitações práticas do protocolo de Seleção Darwiniana.

Parâmetro	Ponto-chave	Descrição
Vantagens	Eficiência e Acessibilidade	Método económico que não exige fenotipagem laboratorial complexa, apresentando sinais visíveis de estabilização a médio prazo (4 a 10 anos).
	Conservação Genética	Aumenta a diversidade funcional ao conservar genótipos adaptados localmente, contrariando a homogeneização promovida por linhagens exóticas.
	Impacto Ecológico	Promove a viabilidade de enxames selvagens (reintrodução natural) e força a naturalização da varroa no ecossistema através da coevolução.
Limitações	Estrangulamento Genético	A elevada mortalidade nos anos iniciais pode causar um "efeito gargalo", exigindo a reposição controlada de novas colónias locais para manter a diversidade.
	Adaptação da Criação de Rainhas	A seleção em colónia inteira difere da criação industrial, exigindo que a produção de rainhas extras seja feita em Apideas acasaladas no mesmo local remoto da população.
	Isolamento Reprodutivo	Requer um rigoroso planeamento logístico para o estabelecimento de estações de acasalamento isoladas, o que pode ser um desafio em regiões de alta densidade apícola.

Fonte: Elaborado com base em Blacquièrre et al. (2019).

3.9. Metodologias de avaliação da infestação e sobrevivência

Para avaliar a eficácia de protocolos de seleção natural como a Seleção Darwiniana e compreender a evolução da dinâmica hospedeiro-parasita, é fundamental a adoção de metodologias padronizadas e rigorosas de fenotipagem no campo. A avaliação da resiliência das colônias assenta numa combinação de avaliações manuais da carga parasitária, estimativas de sobrevivência a longo prazo e, cada vez mais, em sistemas de monitorização remota (Fries et al., 2006; Zacepins et al., 2016).

3.9.1. Métodos de campo para estimativa da infestação e força da colónia

A quantificação periódica da infestação permite inferir a capacidade adaptativa do hospedeiro. Existem vários métodos para inferir o número de ácaros que infestam colônias de abelha melífera, tais como: contar os ácaros caídos na base da colmeia, estimar os ácaros foréticos utilizando amostras de abelhas adultas ou contar os ácaros na criação (De Miranda et al., 2013). Muitas vezes, apenas uma destas estimativas é utilizada para inferir a população total de ácaros que infestam uma colónia, uma vez que combiná-las é demasiado demorado (Mondet et al., 2020).

A monitorização da infestação pode ser medida pela queda natural de ácaros. Este método baseia-se no número de ácaros caídos no fundo da colmeia, sejam mortos naturalmente ou pelo comportamento de *Grooming* das abelhas. A queda natural de ácaros é, em grande parte, determinada pela quantidade de criação infestada emergente, não indicando a infestação total da colónia, mas é, em geral, considerada um bom indicador de infestação da colónia em casos de monitorização (Branco et al., 2006).

O método de queda natural é tido como não invasivo e rápido, sem a necessidade de abertura da colmeia, que fornece uma quantificação relativa que pode ser utilizada para a comparação entre colônias dentro da mesma experiência, tornando-o vantajoso para a monitorização da infestação ao longo do tempo (Branco et al., 2006; Dietemann et al., 2013). Por outro lado, requer a utilização de material específico e a interpretação cautelosa dos resultados obtidos, uma vez que diversos fatores estão envolvidos na taxa de mortalidade dos ácaros, como o estado da colónia, o clima (possíveis variações regionais) e a quantidade de criação na colmeia (Dietemann et al., 2013).

Outro método utilizado para estimar a infestação é o método do detergente, que determina a taxa de infestação forética baseada no número de ácaros a cada 100 abelhas. Recorre-se à recolha de uma amostra de abelhas adultas que é mergulhada numa solução

de água e sabão. A presença do detergente atua como agente tensioativo, provocando o desprendimento imediato dos ácaros. O método destaca-se pela sua elevada sensibilidade e baixo custo. Em contraponto, é considerado um método destrutivo, pois sacrifica a amostra, o que pode penalizar o desenvolvimento de colónias menores e exige logística adequada para execução em apiários remotos (Dietemann et al., 2013). Existe ainda o teste do açúcar, metodologicamente semelhante ao teste do detergente, mas que utiliza açúcar em pó (açúcar de confeitiro) e permite a devolução das abelhas vivas à colónia após a realização do ensaio.

A estimativa da força da colónia, de forma subjetiva, estipula o tamanho da população da colónia sendo útil na avaliação do seu desenvolvimento e um indicativo do seu estado de saúde. Consiste na avaliação visual do número de quadros cobertos por abelhas adultas, sendo este um indicador fundamental da capacidade da colónia para tolerar a infestação e sobreviver ao inverno. Diferenças visíveis no tamanho populacional entre colónias com alta ou baixa carga parasitária acentuam-se no outono, servindo como marcadores de risco precoces (van Dooremalen & van Langevelde, 2021). Por ser um método rápido e não destrutivo, é o ideal para protocolos de intervenção mínima, preservando a coesão social das colónias experimentais (Delaplane et al., 2013).

3.9.2. Avaliação da sobrevivência e a dinâmica longitudinal da infestação

No contexto de colónias submetidas à Seleção Darwiniana, a vitalidade não é medida por limiares de intervenção química, mas sim pela capacidade intrínseca de subsistir ao longo do tempo. Ao contrário da longevidade individual da operária, a sobrevivência da colónia avalia-se longitudinalmente, registando-se o período exato (em meses ou anos) desde o início da abstenção de tratamento até ao colapso definitivo do enxame (Fries et al., 2006). A determinação temporal deste colapso baseia-se em critérios como a perda total da rainha, a exaustão da população adulta ou a ausência irreversível de criação.

A literatura demonstra que a duração desta sobrevivência longitudinal é intimamente ditada pela capacidade da colónia em gerir a sua carga parasitária inicial (van Dooremalen et al., 2012). O ciclo biológico anual em climas temperados exige que a dinâmica populacional do ácaro seja monitorizada rigorosamente a partir da primavera. Colónias que emergem do inverno com infestações sub-letais (frequentemente <1 ácaro por 100 abelhas) evidenciam uma maior eficácia nos seus mecanismos reguladores, o que

lhes permite travar o crescimento exponencial da varroa durante o pico reprodutivo de verão (Giacobino et al., 2016).

Em contraste, a falha dos mecanismos de resistência natural na primavera impede o controlo da infestação e permite que a varroa atinja picos populacionais críticos no outono. Período o qual coincide com a produção das abelhas de inverno, cuja longevidade prolongada é essencial para a sobrevivência da colónia (van Dooremalen et al., 2012). O parasitismo intenso nesta fase degrada as reservas corporais de vitelogenina e proteínas, além de potenciar a transmissão de viroses letais. Consequentemente, a esperança de vida destas abelhas é drasticamente reduzida, culminando no colapso da colónia durante o inverno (van Dooremalen et al., 2012).

Assim, a quantificação periódica da infestação e a datação do eventual colapso constituem os parâmetros fenotípicos diretos para medir a adaptação. Para realizar este rastreio contínuo sem perturbar a dinâmica natural que se pretende avaliar, a integração de métodos não invasivos assume um papel crucial.

3.9.3. Monitorização remota e não invasiva

No manejo apícola, costuma-se realizar inspeções visuais que exigem a abertura da colmeia que pode causar um *stress* significativo à colónia, desregular a temperatura interna, quebrar o invólucro profilático de própolis e interromper o forrageamento. Para contornar estas limitações, a apicultura de precisão integra sensores e tecnologias da Internet das Coisas (*IoT*) no manejo apícola. Esta abordagem permite a monitorização contínua e não invasiva das colmeias, baseada fundamentalmente na avaliação de dois parâmetros físicos essenciais: a temperatura e o peso (Catania & Vallone, 2020; Meikle & Holst, 2015).

O primeiro destes parâmetros, a temperatura interna, é um reflexo direto da homeostase da colónia. Para garantir o desenvolvimento saudável da criação, as obreiras mantêm a zona da criação rigorosamente entre 34,5 °C e 35,5 °C. A estabilidade térmica neste intervalo indica uma população saudável e com vigor suficiente para gerar calor. Em contraste, quando a colónia enfrenta altos níveis de infestação por varroa, as exigências metabólicas severas desregulam a capacidade termorreguladora (Schäfer et al., 2011). Consequentemente, flutuações anormais atuam como indicadores precoces de *stress* patológico, declínio populacional, perda de rainha ou risco de mortalidade invernal (Cota et al., 2023; Zacepins et al., 2016).

Em complementaridade à dinâmica térmica, a variação contínua de peso fornece o panorama comportamental e populacional da colónia. A utilização de balanças digitais gera uma curva que reflete a interação das abelhas com o ambiente externo ao longo das estações do ano (Catania & Vallone, 2020; Meikle et al., 2016). Nesta curva, os ganhos indicam fluxos de néctar e refletem o vigor da força forrageira, enquanto as perdas graduais traduzem o consumo natural de reservas. Por sua vez, uma perda crónica e acelerada no outono funciona como um preditor telemétrico de mortalidade no inverno. Já as quedas bruscas de peso são o indicador digital primário de eventos agudos, como a enxameação, a pilhagem ou o colapso abrupto da colmeia (Catania & Vallone, 2020; Cota et al., 2023; Meikle et al., 2016).

A correlação contínua entre o comportamento térmico e o peso torna a monitorização remota uma ferramenta indispensável em protocolos de mínima interferência humana, como a Seleção Darwiniana. Como o princípio evolutivo exige que os processos biológicos naturais não sejam perturbados pela ação do apicultor (Blacquièrre et al., 2019), o uso de plataformas digitais de monitorização viabiliza a recolha ininterrupta de dados. Quando cruzadas com as avaliações fenotípicas da infestação por varroa, estas medidas não-invasivas fornecem um panorama em tempo real do estado da colmeia, o que permite avaliar a saúde, o vigor e a adaptação das colónias sujeitas à pressão de seleção natural.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte do programa de Seleção Darwiniana conduzido no apiário localizado na aldeia de Pinelo, da vila de Vimioso, em Bragança, Portugal (41,64836° N, 6,54472° O). O local encontra-se a um raio de 3 km de qualquer outro apiário registado, garantindo o isolamento reprodutivo necessário e a minimização de riscos sanitários por transmissão horizontal de apiários vizinhos. As experiências a campo foram realizadas neste apiário, enquanto as contagens (varroa e ferrões) e as técnicas biomoleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Investigação de Montanha (CIMO), no Instituto Politécnico de Bragança (IPB).

Este trabalho consiste na avaliação do desenvolvimento de colónias de *Apis mellifera iberiensis* sujeitas à Seleção Darwiniana. Embora as avaliações fenotípicas de campo se centrem no segundo ano de seleção (2025), a análise integra os dados da monitorização remota (peso e temperatura) recolhidos de forma contínua desde o

primeiro ano (2024), permitindo uma avaliação longitudinal do desenvolvimento e da sobrevivência das colónias. Sendo assim, aqui serão descritos a cronologia das atividades durante o ano, a caracterização destas colónias no início da seleção, o protocolo e o manejo apícola a que estas colónias foram submetidas, as metodologias das experiências e a monitorização remota das colmeias.

As variáveis avaliadas foram: avaliação da taxa de infestação pelo método do detergente, monitorização da infestação por varroa pelo método de queda natural, teste de agressividade pelo método de contagem de ferrões e força da colónia pelo método subjetivo. Algumas colmeias foram monitorizadas em balanças automáticas e sensores de temperatura integrados ao sistema BEEP (<https://app.beep.nl>). Além disso, técnicas de biologia molecular (PCR + sequenciação de Sanger) foram empregues para determinar a linhagem evolutiva das rainhas através do DNA mitocondrial (mtDNA).

4.1. Cronologia das atividades realizadas

Para dar resposta à cronologia de realização das atividades supramencionadas, a estruturação temporal e a sobreposição das diferentes fases do estudo encontram-se sumarizadas através do Diagrama de Gantt na Figura 2.

As atividades representadas no diagrama foram organizadas em categorias operacionais, cujos protocolos específicos são detalhados nos subcapítulos subsequentes: o manejo apícola (ver secção 4.3), a monitorização da infestação de varroa (ver secção 4.4), o teste de agressividade (ver secção 4.5), a amostragem e as técnicas de biologia molecular (ver secção 4.6) e a monitorização remota pelo sistema BEEP (ver secção 4.7).

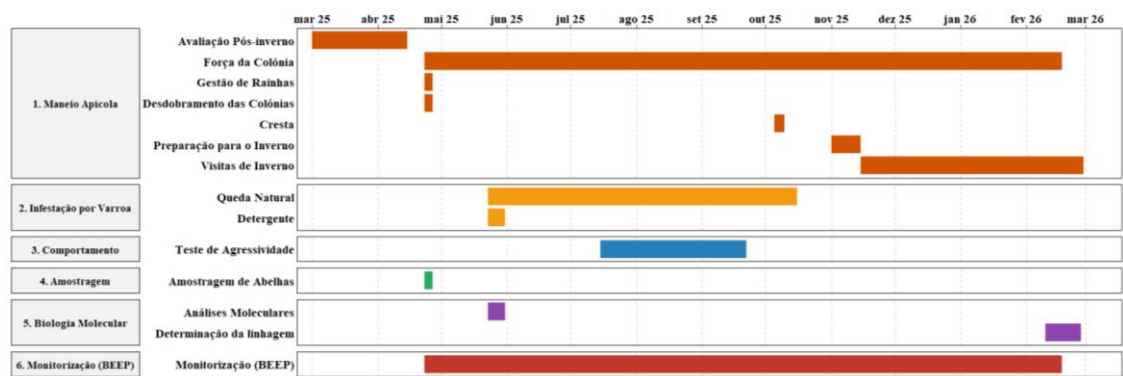


Figura 2: Diagrama de Gantt ilustrativo do delineamento experimental e do cronograma de atividades executadas ao longo do ensaio (2025-2026). As atividades encontram-se agrupadas por categoria temática e ordenadas cronologicamente.

4.2. Caracterização da população

Para melhor compreender a população avaliada neste estudo, faz-se necessária a elucidação da história do apiário desde o início do programa de seleção. Este apiário foi montado exclusivamente para a condução do programa de melhoramento genético baseado no protocolo de Seleção Darwiniana (descrito por Blacquièrre et al., 2019), como parte do projeto europeu Better-B.

O programa foi estabelecido na primavera de 2024, com 23 colónias de *Apis mellifera iberiensis* geneticamente não relacionadas. Conforme estabelecido para o primeiro ano (Blacquièrre et al., 2019), estas colónias receberam um único tratamento antes do desdobramento, com o intuito de padronizar a carga parasitária inicial. Estas 23 colónias (23 rainhas fundadoras) foram desdobradas em quatro novas, totalizando 92 colónias para o início da seleção.

As rainhas que integraram as 23 colónias iniciais foram consideradas a geração fundadora (F0), definindo as respetivas famílias. Desta forma, as colónias filhas de cada fundadora são tratadas como irmãs, preservando-se esta estrutura familiar ao longo das gerações seguintes. As colmeias utilizadas foram do modelo Langstroth, a população recebeu um sistema de identificação de numeração contínua, contando a partir de um. Neste período, nove colmeias foram equipadas com um sistema de monitorização remoto (BEEP) composto por balança e sensor de temperatura. Para garantir que a pressão de seleção atuaria fundamentalmente sobre a capacidade de resistência ao ácaro, as colónias foram alimentadas continuamente com pasta de açúcar (apipasta vitamínica, Zukan).

Destas 92 colónias, apenas 21 sobreviveram ao primeiro inverno (2024/2025). O presente trabalho foca-se na avaliação e no acompanhamento longitudinal dos desdobramentos provenientes destas 21 colónias sobreviventes.

4.3. Protocolo de Seleção Darwiniana para o segundo ano

A aplicação do protocolo de Seleção Darwiniana durante o ano de 2025 acompanhou o ciclo biológico natural das abelhas, focando-se na reprodução orientada e na mínima interferência humana. O manejo foi adaptado das diretrizes de Blacquièrre et al. (2019), ajustando o limite máximo de desdobramentos de quatro para três núcleos por colónia-mãe, de forma a garantir a viabilidade e o vigor das novas colónias. A cronologia e os procedimentos técnicos executados ao longo da época apícola encontram-se sintetizados na Tabela 4.

Tabela 4: Cronologia e síntese dos procedimentos de manejo estabelecidos pelo protocolo de Seleção Darwiniana aplicados durante o ano de 2025.

Protocolo realizado no segundo ano de Seleção Darwiniana (2025)		
Período	Fase do Maneio	Procedimentos Principais
Março - abril (Início da primavera)	Preparação e criação de zângãos	Avaliação pós-inverno das colônias sobreviventes. Inserção de um quadro indicador na 2ª posição para incentivar a construção de favos e criação de zângãos. Alimentação de estímulo (2 L de xarope/visita). Amostragem de obreiras para análise genética (conservadas a - 20 °C e em etanol 99 %).
Final de Abril	Desdobramento Delaplane et al. (2013)	Captura e remoção das rainhas (F1). Divisão em núcleos (máx. 3/colônia), distribuindo equivalentemente: 1 quadro com postura, 2 de criação operculada, 2 de alimento e obreiras. Identificação e fecho imediato dos núcleos com régua de transumância. Transporte para local a 5 km (desorientação) e regresso ao apiário no dia seguinte*.
Maio	Gestão de rainhas e fecundação	Verificação de alvéolos reais e rainhas virgens (13 dias após o desdobramento). Capturas de rainhas suplentes (uma por família) para núcleos Apidea contendo abelhas orfanizadas. Verificação do acasalamento (presença de ovos/larvas) no final do mês.
Junho (Início do verão)	Estabelecimento	Confirmação do sucesso da fecundação (27 dias após o desdobramento). Introdução das rainhas suplentes nas colônias que falharam o acasalamento. Fixação da população em 53 novas colônias (15 famílias originais).
Julho - outubro	Manutenção de verão e avaliação	Avaliações fenotípicas regulares (força da colônia**, infestação por varroa e agressividade). Alimentação de suporte (pasta de açúcar) fornecida consoante a necessidade. Adição de meias-alças nas colônias mais vigorosas. Cresta (setembro).
Novembro - fevereiro/2026	Preparação para o inverno	Preparação do ninho: quadros de criação ao centro, ladeados por alimento e isolados por um plástico ("poncho") com acesso central à alimentação. Visitas mensais de monitorização da sobrevivência (apenas a temperaturas > 12 °C) e alimentação com pasta.

*: Os desdobramentos foram temporariamente deslocados para evitar o regresso das obreiras à colônia-mãe, sendo posteriormente reinstalados no apiário para acasalamento. As colmeias com bases BEEP permaneceram no local. **: Avaliação da força da colônia desde a verificação das rainhas até ao fim do inverno. Elaborado com base em Blacquière et al. (2019).

No dia anterior à captura de rainhas suplentes realizou-se a preparação de Apideas (núcleo de fecundação) (Figura 3). Estas são caixas feitas de poliestireno expandido rígido, cada uma equipada com três quadros de plástico, porta deslizante e grelha de ventilação na ranhura de entrada, alimentador removível e sua tampa possui abertura interna para inserção de uma gaiola de rainha. Em cada Apidea, colocou-se uma chávena (300 mL) de abelhas operárias. As obreiras foram coletadas de pelo menos três colônias

dadoras de outro apiário, colocadas em um balde e mantidas numa sala fechada, escura e fresca até o dia seguinte (processo de orfanização). Este procedimento visa a melhor aceitação das rainhas.



Figura 3: Modelo de Apidea com três quadros e alimentador utilizado a campo. Fonte: La Tienda del Apicultor (s.d.).

4.4. Avaliação da infestação por varroa

A monitorização longitudinal da infestação por varroa foi realizada de duas formas: uma estimativa pontual da taxa de infestação forética e a quantificação da queda natural de ácaros ao longo de seis meses.

4.4.1. Estimativa da taxa de infestação forética

Em maio de 2025, realizou-se a estimativa da taxa de infestação forética por varroa pelo método de lavagem com água e detergente, conforme descrito em Dietemann et al. (2013). Das 53 colónias ativas, seis foram excluídas desta amostragem para evitar comprometer o seu desenvolvimento devido à sua reduzida força populacional, totalizando 47 colónias avaliadas.

Para a amostragem, recolheram-se abelhas adultas diretamente do quadro imediatamente a seguir ao último quadro de criação (garantindo a ausência da rainha), armazenando-as em recipientes ventilados. No laboratório, as amostras foram conservadas a -20 °C. As obreiras de cada amostra foram contadas e separadas dos zângãos. De seguida, as obreiras foram imersas num frasco com água e detergente neutro e agitadas manualmente durante um minuto. O conteúdo foi vertido sobre um sistema de dupla peneira: uma malha superior (3-4 mm) para a retenção das abelhas e uma malha inferior (<0,5 mm) para a retenção dos ácaros. Os ácaros presentes na malha inferior foram isolados e contabilizados de forma direta (Figura 4). A taxa de infestação forética

foi calculada dividindo o número total de ácaros pelo número de obreiras da amostra, multiplicando-se o quociente por 100 para expressar o resultado em ácaros/100 abelhas.

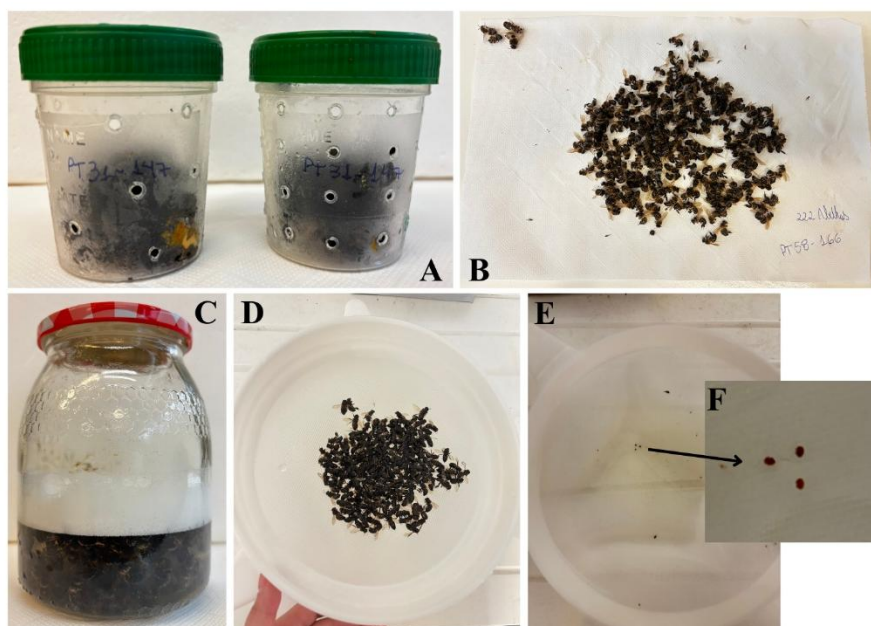


Figura 4: Procedimentos de amostragem e quantificação da infestação forética por varroa através do método de lavagem com água e detergente. (A) Copos de amostragem (100 mL) com orifícios de ventilação contendo as abelhas recolhidas no apiário. (B) Disposição da amostra sobre papel absorvente para estabilização térmica, triagem e contagem das obreiras. (C) Frasco de vidro contendo as abelhas, água e detergente neutro após 1 minuto de agitação manual. (D) Peneira superior (malha de 3-4 mm) retendo as abelhas após o processo de lavagem. (E) Peneira inferior (malha de <0,5 mm) retendo os ácaros desprendidos após o enxaguamento abundante. (F) Detalhe ampliado das varroas isoladas para a contagem final.

4.4.2. Monitorização da queda natural de ácaros

A dinâmica populacional da varroa foi monitorizada mensalmente, entre maio e outubro de 2025, através do registo da queda natural, conforme a metodologia descrita por Dietemann et al. (2013) e esquematizada na Figura 6: Representação esquemática do delineamento experimental e do protocolo de monitorização da infestação por *Varroa destructor* pelo método de queda natural. Esta avaliação foi realizada em 42 colónias, devido à disponibilidade limitada de estrados sanitários adequados no apiário.

O procedimento consistiu na colocação de placas cromatográficas adesivas da Biobest na gaveta do estrado sanitário de cada colmeia (Figura 5). As placas permaneceram *in situ* por um período de 72 horas (três dias), com aproximadamente 30 dias de intervalo, a depender das condições meteorológicas favoráveis para deslocamento até o apiário.

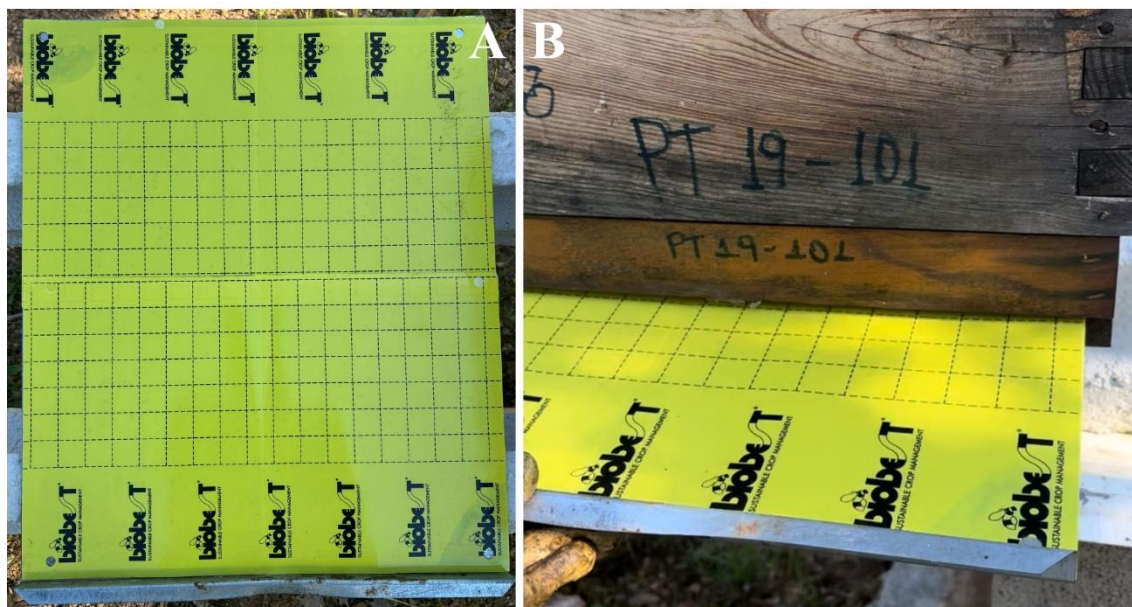


Figura 5: Preparação e instalação do material para monitorização da queda natural de *Varroa destructor*. (A) Par de placas cromatográficas adesivas dispostas sobre a chapa metálica do estrado sanitário, cobrindo a totalidade do fundo. (B) Inserção da chapa na base da colmeia.

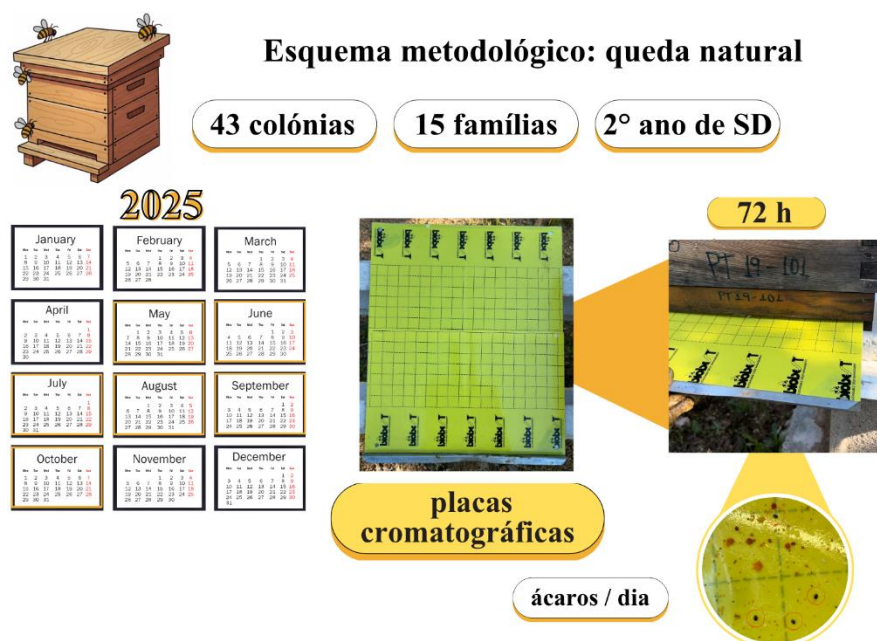


Figura 6: Representação esquemática do delineamento experimental e do protocolo de monitorização da infestação por *Varroa destructor* pelo método de queda natural.

Após a remoção das placas, procedeu-se à contagem manual (em laboratório) dos ácaros retidos na superfície adesiva, com atenção às abelhas coladas à placa, que poderiam ser alvo de ácaros ainda vivos. Para efeitos de análise de dados, o número absoluto de ácaros contabilizados em cada placa foi dividido por três, obtendo-se o valor normalizado da taxa diária de queda de varroa (ácaros/dia) para cada colónia avaliada. Em rigor com as recomendações de Dietemann et al. (2013), optou-se por não extrapolar

estes valores para a carga parasitária total da colónia, uma vez que os fatores de conversão estabelecidos na literatura estão validados exclusivamente para o clima da Europa Central.

4.5. Teste de agressividade

O comportamento defensivo das colónias foi quantificado através de um índice de agressividade, baseado no número de ferrões depositados numa bandeira de tecido agitada sobre o ninho. Este ensaio deriva de metodologias clássicas amplamente validadas para avaliar o comportamento defensivo da *A. mellifera* (Guzmán-Novoa et al., 1999; Guzmán-Novoa et al., 2003; Breed et al., 2004).

O dispositivo experimental consistiu em bandeiras de camurça preta (10x10 cm) acopladas a hastes de madeira. A seleção deste material e cor fundamenta-se no facto de os instintos defensivos e o reflexo de ferroada das abelhas serem fortemente estimulados por cores escuras, odores/texturas de origem animal e movimentos rápidos (Guzmán-Novoa et al., 1999; Breed et al., 2004).

A nível prático, as colmeias foram abertas sem qualquer aplicação prévia de fumo. A bandeira foi agitada ritmicamente sobre o topo dos quadros durante cinco segundos (perfazendo cinco movimentos ondulatórios). Para evitar o enviesamento dos resultados motivado pela rápida propagação de feromonas de alarme (Breed et al., 2004), a sequência dos testes foi planeada para garantir uma distância espacial considerável entre as colónias avaliadas de forma consecutiva. Imediatamente após a exposição, a bandeira foi selada num saco de plástico para conter os odores de defesa. O índice de agressividade foi determinado *a posteriori*, em laboratório, mediante a contagem direta do número de ferrões retidos no tecido (Guzmán-Novoa et al., 2003) (Figura 7).

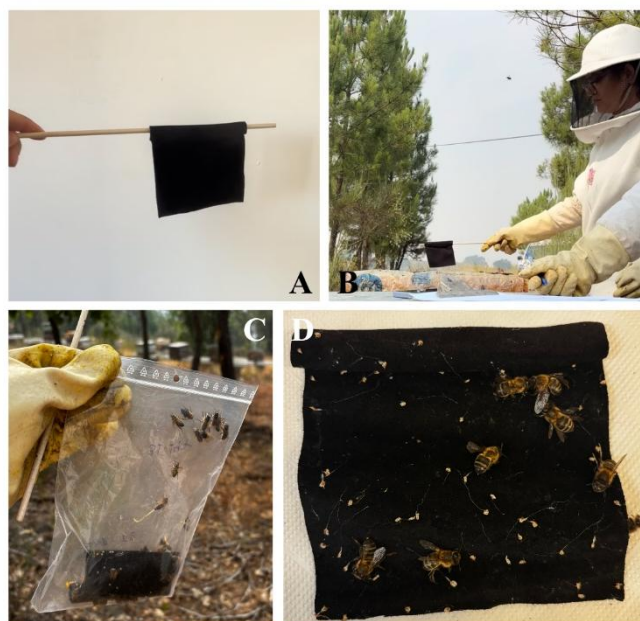


Figura 7: Procedimentos para a avaliação do índice de agressividade das colónias através do teste da bandeira. (A) Bandeira de teste confeccionada com um retalho de tecido de camurça preto (10x10 cm) fixado a uma haste de madeira. (B) Execução do ensaio de campo, consistindo na agitação rítmica da bandeira sobre o topo dos quadros do ninho durante cinco segundos. (C) Acondicionamento imediato da bandeira utilizada num saco de plástico selado para conter as abelhas e os odores de defesa. (D) Detalhe do tecido de camurça evidenciando os ferrões retidos, cuja contagem direta, realizada posteriormente em local afastado das colónias, determina o índice de agressividade.

As avaliações foram conduzidas no período da manhã, nos meses de julho, agosto e setembro de 2025, garantindo um intervalo temporal de aproximadamente 30 dias entre cada medição. Do efetivo total, 49 colónias completaram integralmente as três repetições do ensaio. As quebras na dimensão da amostra resultaram da mortalidade natural das colónias.

4.6. Determinação da linhagem evolutiva

Com o intuito de determinar a linhagem evolutiva materna das colónias em estudo, procedeu-se à análise do ADN mitocondrial (mtDNA). Por ser herdado de forma estritamente matrilinear e ser isento de recombinação, o genoma mitocondrial destaca-se como o marcador molecular padrão para a inferência filogenética e para o estudo da dinâmica e estrutura das populações de *A. mellifera* (Garnery et al., 1993; Guedes, 2010).

A identificação da linhagem evolutiva materna das colónias foi realizada através da análise da região intergénica tRNA^{leu}-cox2 do mtDNA. A extração de ADN foi realizada a partir do tórax de uma obreira representante de cada família. O processo de extração e purificação decorreu de forma automatizada através do sistema Maxwell RSC,

utilizando o kit comercial de base magnética *Maxwell RSC PureFood GMO and Authentication Kit* (Promega), seguindo as especificações do fabricante.

Para confirmar o sucesso da extração e avaliar a integridade do DNA obtido, as amostras (preparadas num volume de 2 µL de ADN homogeneizado com 2 µL de *Loading Buffer*) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, com Brometo de Etídio como corante (5 µL / 80 mL de gel). A corrida eletroforética decorreu em tampão TAE 1x a uma voltagem constante de 90 V durante 30 minutos. Após a corrida no gel, o ADN foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) num transiluminador. Este procedimento permitiu validar a presença de bandas de ADN de alto peso molecular e atestar a viabilidade das amostras antes da amplificação.

A amplificação da região tRNA^{leu}-cox2 foi conduzida por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* específicos E2 (5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3') e H2 (5'-CAATATCATTGATGACC-3') (Garnery et al., 1993). A PCR foi preparada para um volume final de 15 µL de *Master Mix*, contendo: 9 µL de água ultrapura (H₂O), 1,5 µL de *Buffer* de reação, 1,5 µL de dNTPs, 1,5 µL de *primer* E2, 1,5 µL de *primer* H2 e 0,15 µL de enzima *SuperTaq* DNA polimerase. A este volume foi adicionado 1 µL ADN. Os reagentes base, dNTPs e *primers*, foram usados em concentrações de trabalho de 2 mM e 2 µM, respetivamente.

O ciclo térmico de amplificação foi realizado num termociclador e consistiu numa etapa de desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por três etapas: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, emparelhamento (*annealing*) a 50 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos. O processo finalizou com uma etapa de extensão final a 72 °C durante 10 minutos, sendo as amostras conservadas a 4 °C.

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à sequenciação pelo método de Sanger (Chávez-Galarza et al., 2017). Após a obtenção dos dados, a visualização, a inspeção qualitativa e a edição dos cromatogramas foram realizadas recorrendo ao *software* FinchTV (Geospiza, 2004), de modo a eliminar as extremidades e corrigir erros de leitura. Em seguida, as sequências editadas foram submetidas ao algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990) para uma pré-classificação do haplótipo por comparação às sequências depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Após esta validação inicial, o alinhamento das sequências nucleotídicas foi efetuado no *software* MEGA12 (Kumar *et al.*, 2024). O alinhamento permitiu a detecção de inserções, deleções e substituições nucleotídicas (*SNPs*), confirmando a estrutura exata dos elementos P e Q (Chávez-Galarza *et al.*, 2017) e os haplótipos previamente indicados pelo BLAST.

4.7. Monitorização do desenvolvimento das colónias em tempo real

A monitorização contínua e não-intrusiva das colónias foi assegurada pelo sistema BEEP (*app.beep.nl*), uma tecnologia de apicultura de precisão. Esta ferramenta permitiu a avaliação em tempo real do peso e da temperatura interna da colmeia sem a necessidade de intervenção física, preservando a termorregulação e o comportamento natural da colónia. O sistema é constituído por dois componentes: o hardware de sensorização (Base BEEP) instalado na base da colmeia para a monitorização de parâmetros físicos e uma plataforma digital baseada na nuvem (BEEP *app* v3) para armazenamento e gestão telemétrica dos dados (detalhes técnicos descritos nos Anexos 8.1 e 8.2).

Cada Base BEEP está equipada com balança, um microfone e um sensor de temperatura. As colmeias foram posicionadas sobre a base (Figura 9: Base BEEP utilizada. Fonte: BEEP Foundation (2026).) com o auxílio de um suporte de madeira (Figura 8), e a sonda de temperatura foi inserida no interior do ninho, o mais próximo possível da área de criação. O sistema de transmissão de dados para a nuvem utiliza tecnologia *LoRa* (*Long Range*), sendo alimentado autonomamente por um painel solar e uma bateria interna. O dispositivo foi configurado para realizar aquisições com a duração de dois segundos em intervalos regulares de 15 minutos, assegurando a transmissão contínua da informação recolhida. A plataforma BEEP *app* v3 atuou simultaneamente como recetor dos dados e como diário de campo digital para o registo parametrizado de todas as inspeções realizadas ao longo do ensaio.

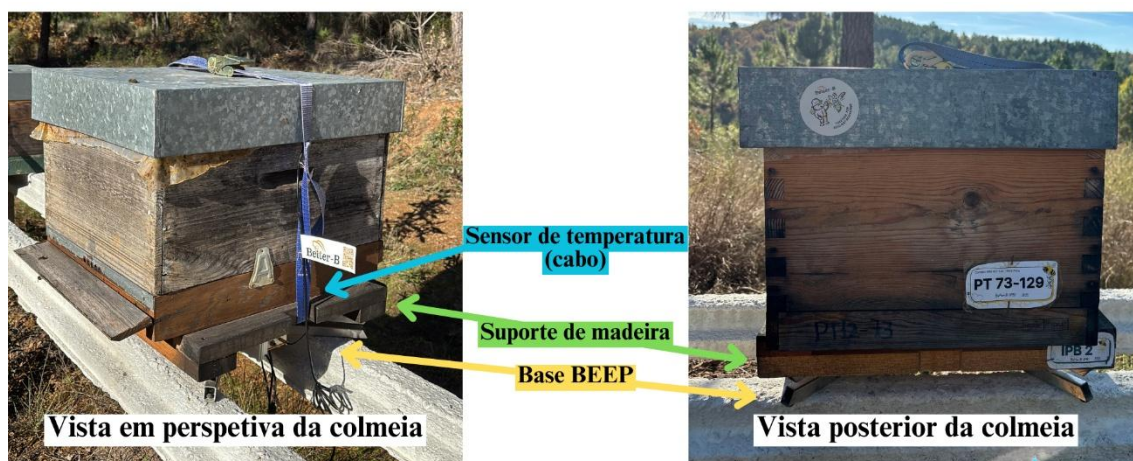


Figura 8: Vistas em perspectiva e posterior de uma colmeia experimental, evidenciando o posicionamento da Base BEEP.

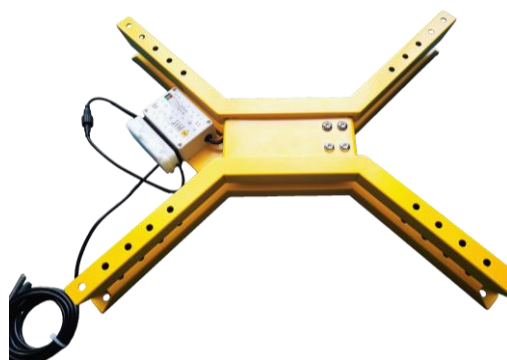


Figura 9: Base BEEP utilizada. Fonte: BEEP Foundation (2026).

O desenho experimental incluiu a monitorização de nove colónias em simultâneo desde maio de 2024. A seleção das colónias obedeceu a dois critérios: (1) representatividade genética, garantindo que as nove colónias pertenciam a famílias distintas. No caso de colapso (morte) de uma colónia monitorizada, a Base BEEP era transferida para uma nova colónia, se possível pertencendo à mesma família (uma irmã). Cada transferência foi documentada na plataforma digital e em ficheiro Excel específico. Em meados do inverno de 2025, o efetivo de monitorização foi reforçado com a instalação de três novas bases no apiário. Para a análise do presente trabalho, foram extraídos e processados os dados telemétricos compreendidos entre 22 de maio de 2024 (confirmação do acasalamento) e 7 de janeiro de 2026.

4.8. Análise estatística

A estruturação, o pré-processamento e a análise inferencial dos dados foram conduzidos na linguagem R (R Core Team, 2025), utilizando o ambiente RStudio (Posit team, 2025). O nível de significância adotado para todas as análises foi de $\alpha = 0,05$. Para a análise exploratória primária, as variáveis foram sumariadas através de métricas

descritivas (média, medianas, desvio padrão) e representações visuais (boxplots e histogramas via *ggplot2*). Associações entre as variáveis queda natural de varroa e infestação inicial bem como índice de agressividade e tamanho da colônia foram aferidas através da correlação de Spearman.

De seguida, a evolução temporal da pressão parasitária foi analisada aplicando Modelos Lineares Mistos (*LMM*, pacote *lme4*) (Bates et al., 2015). Foram ajustados três modelos distintos com o objetivo de avaliar se a taxa de infestação inicial, a força da colônia e o índice de agressividade influenciam a queda natural de varroa ao longo do tempo. Desta forma, a queda natural de varroa (*mite_fall*) foi considerada a variável de resposta e modelada em função da interação do mês e da taxa de infestação inicial dicotomizada (<3% vs. >3%) (efeito fixo), incluindo ainda a colônia como efeito aleatório (**Modelo 1:** $mite_fall \sim taxa_infestação * mês + (1|colônia)$). A mesma estrutura do modelo 1 foi usada nos restantes modelos substituindo a variável explicativa respectivamente pela força da colônia (**Modelo 2:** $mite_fall \sim força_colônia * mês + (1|colônia)$) e índice de agressividade (**Modelo 3:** $mite_fall \sim agressividade * mês + (1|colônia)$).

A análise de sobrevivência visou identificar indicadores de risco de mortalidade, integrando variáveis de estudo: queda natural de ácaros, infestação inicial, força da colônia e índice de agressividade. A caracterização geral da população sobre seleção foi realizada através do método de Kaplan-Meier (Kassambara, 2017). O efeito da taxa de infestação inicial ($\geq 3\%$ ou $< 3\%$) e da proveniência das colônias (15 rainhas fundadoras que deram origem aos desdobramentos de 2025) na sobrevivência foi avaliado através teste Log-Rank (*survdif*, pacote *survival*).

Para quantificar o risco relativo de mortalidade, ajustaram-se Modelos de Riscos Proporcionais de Cox com efeitos mistos (*MECM*) e clássicos (*PHM*) (*coxme*, *coxph* e pacote *survival*) (Therneau, 2024), acomodando a flutuação temporal da força da colônia, da queda natural de varroa e do índice de agressividade como covariáveis dependentes do tempo. No primeiro modelo, a sobrevivência foi modelada em função da queda natural de varroa e da força da colônia como efeitos fixos, incluindo a origem inicial da rainha e a colônia como efeitos aleatórios (**Modelo 4:** $Surv(start, stop, event) \sim mite_fall + força_colônia + (1|colônia) + (1|rainha_ID)$). Para compreender melhor o risco relativo de mortalidade para cada variável de estudo, empregaram-se *PHM* univariados e

multivariados para cada mês independentemente. A estrutura dos modelos univariados foi mantida, substituindo-se sucessivamente a variável explicativa queda natural de ácaros (*mite_fall*) pela força da colónia e pelo índice de agressividade, de acordo com os respetivos meses de amostragem (**Modelo 5:** $\text{Surv}(\text{days_survival}, \text{censura}) \sim \text{mite_fall}$). O modelo multivariado seguiu a mesma estrutura incluindo força da colónia e queda natural de ácaros como variáveis explicativas (efeitos fixos) (**Modelo 6:** $\text{Surv}(\text{days_survival}, \text{censura}) \sim \text{mite_fall} + \text{força_colonia}$). O índice de agressividade não foi incluído uma vez que os dados correspondem apenas a 3 dos 6 meses em análise.

Dada a multiplicidade de modelos testados, os valores de p ($p\text{-values}$) foram ajustados através do método de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995). A validade dos pressupostos da proporcionalidade de risco foi sistematicamente confirmada pelo teste de resíduos de Schoenfeld (*cox.zph*).

Por fim, os dados longitudinais contínuos da telemetria (sistema BEEP) foram explorados de forma estritamente descritiva e gráfica. Para mitigar o ruído das medições (intervalos de 15 minutos) e captar tendências biológicas, os registos foram processados em métricas diárias, nomeadamente, a média diária para o peso da colmeia e amplitude térmica diária registada pelo sensor de temperatura. Aplicou-se ainda uma normalização aos dados de peso, subtraindo variações estruturais de manejo (adição ou remoção de meias-alças), garantindo que as curvas refletissem unicamente a flutuação de peso da colónia, as trajetórias temporais de desenvolvimento populacional, o declínio pré-invernal e a capacidade de termorregulação. Esta abordagem facilitou a diferenciação de padrões termodinâmicos e populacionais face à longevidade final das colónias e a comparação global entre as gerações do programa de seleção (2024 vs. 2025).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Origem materna evolutiva: caracterização genética do apiário

A análise do ADN mitocondrial (mtDNA) das famílias do apiário experimental ($N = 23$) (Figura 10) revelou o predomínio da linhagem africana (Linhagem A), característica de *A. m. iberiensis* em Portugal (Pinto et al., 2013; Chávez-Galarza et al., 2015), presente em 85% das famílias. Esta linhagem apresentou elevada diversidade haplotípica, com maior frequência do haplótipo A16' (25%; $N = 5$) e A1 (20%; $N = 4$), seguido de A62', A11 e A20 (10%; $N = 2$ cada) e ocorrências únicas de A42' e A36 (5%; $N = 1$). As linhagens europeias registaram frequências reduzidas ($N = 1$ para cada

haplótipo), com a Linhagem M a representar 10% (haplótipos M41 e M69) e Linhagem C 5% (haplótipo C2), esta última associada a introduções de genética comercial de origem desconhecida. Das 23 famílias, três não puderam ser caracterizadas devido à falha na sequenciação.

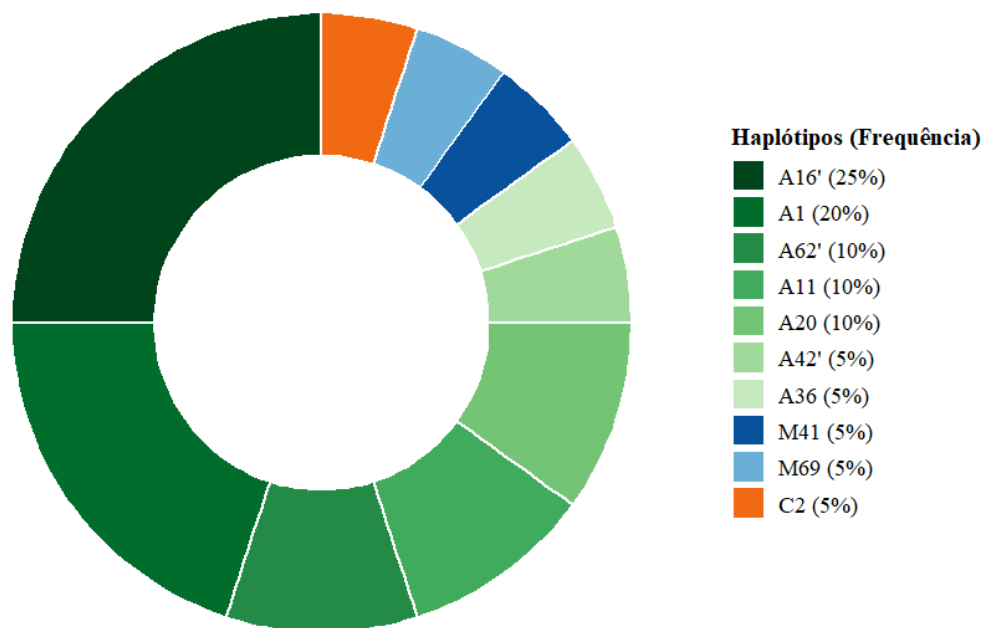


Figura 10: Frequência dos haplótipos nas rainhas originais.

5.2. Análise descritiva e associações iniciais

Para a descrição da evolução do apiário, foram utilizados dois denominadores distintos: (1) o número total de desdobramentos para medir a taxa de sucesso operacional e de sobrevivência sazonal; e (2) o número fixo de 23 rainhas originais para monitorar a taxa de retenção da diversidade genética ao longo de todo o período de seleção.

Tabela 5: Dados descritivos da sobrevivência das colônias até o segundo ano de Seleção Darwiniana (2024/2025). Os valores absolutos (na parte superior) correspondem ao número de colônias vivas em cada etapa. As percentagens (parte inferior), referem-se às taxas de sobrevivência por cada etapa.

Sobrevivência ao longo dos anos			
Época do ano	Variável (em n.º de colônias vivas)	Ano	
		2024	2025
Início da primavera	Rainhas originais	23	15
	Desdobramentos	92	53
Outono	Início da estação	57	50
Inverno	Início da estação	38	8
Início da primavera do ano seguinte	Total de sobreviventes	21	3
	Linhagens sobreviventes	21	3
Percentagens de sobrevivência ao longo dos anos (%)			
Época do ano	Variável (em percentagem)	Ano	
		2024	2025
Início da primavera	Rainhas originais	100	65
Outono	Início da estação	62	94
Inverno	Início da estação	41	15
Início da primavera do ano seguinte	Total de sobreviventes	23	6
	Linhagens sobreviventes	91	13

A dinâmica da sobrevivência do apiário demonstrou um forte contraste entre os anos, entre as colônias e a origem materna (Tabela 5). Na época 2024/2025, partindo de 92 desdobramentos, registrou-se uma sobrevivência de 23% na primavera seguinte em que 91% da origem materna inicial estava representada. Ainda em 2024, o colapso das colônias aconteceu de forma progressiva desde o início do outono até a primavera de 2025, observando-se aumentos de 38%, 59% e 77% no início do outono, no início do inverno e no início da primavera do ano seguinte (2025), respetivamente.

Em 2025/2026, a taxa de sobrevivência foi apenas de 6% (3/53), correspondendo estas colônias a 13% da origem materna inicial (3/23) enquanto descendência de segunda geração das rainhas fundadoras. Neste ano, o colapso das colônias caracterizou-se por uma mudança abrupta no padrão de mortalidade, concentrada no período de inverno. No início do outono, apenas 6% das colônias tinham colapsado, porém esta mortalidade disparou para 85% ainda no início do inverno e aumentou para 94% no início da primavera de 2026. Esta variação entre os dois primeiros anos de seleção evidencia a severidade da pressão de seleção exercida pela varroa nesta fase inicial. Este período é amplamente documentado na literatura como o estágio mais crítico para a sobrevivência das colônias, caracterizando-se por um afunilamento populacional após a suspensão dos

tratamentos acaricidas (Fries et al., 2006; Seeley, 2007; Locke, 2016). A dinâmica da mortalidade observada valida este padrão esperado em programas de Seleção Darwiniana, nos quais o pico de infestação acumulada no segundo ano dita a eliminação das colônias susceptíveis antes da estabilização da população resistente.

A análise do mtDNA mostrou que as três colônias sobreviventes ao inverno de 2025 pertenciam à linhagem africana (A), com haplótipos A16', A20 e A62', enquanto todas as colônias de origem europeia (M e C) morreram. Apesar de sugerir maior resiliência das abelhas de linhagem africana à varroa, esta conclusão deve ser interpretada com cautela, devido ao reduzido tamanho amostral. Além disso, 85% das colônias iniciais eram de origem africana, aumentando a probabilidade de sobrevivência desse grupo. Assim, não é possível confirmar uma vantagem adaptativa sem dados adicionais.

Tabela 6: Estatística descritiva geral das variáveis avaliadas no campo para o ano 2025/2026. Nota: N = número total de observações considerando as repetições ao longo dos meses. DP = Desvio Padrão; Q1-Q3 = Intervalo interquartil (25% - 75%).

Estatística Descritiva Geral das Variáveis Avaliadas a Campo						
Variável	N	Média ± DP	Mediana (Q1 – Q3)	Mín. Máx.	CV (%)	Assimetria (Skew)
Tamanho da colônia (n° quadros)	307	6,18 ± 2,26	6,00 (5,00 - 8,00)	1,00 15,00	36,5	0,66
Taxa de infestação (%)	47	2,17 ± 3,71	0,68 (0,00 - 2,46)	0,00 20,09	170,5	2,87
Queda de ácaros (ácaros/dia)	258	12,63 ± 15,66	7,85 (2,40 - 15,30)	0,00 95,00	124,0	2,56
Índice de agressividade	150	15,97 ± 19,38	7,00 (2,00 - 23,75)	0,00 90,00	121,4	1,52
Sobrevivência (dias)	53	223,06 ± 48,12	236,00 (195,00 - 236,00)	31,00 278,00	21,57	-1,95

A análise descritiva das 53 colônias (ano 2025/2026) revelou dinâmicas distintas nas características avaliadas ao longo do período de atividade das abelhas (Tabela 6: Estatística descritiva geral das variáveis avaliadas no campo para o ano 2025/2026. Nota: N = número total de observações considerando as repetições ao longo dos meses.). O tamanho das colônias apresentou uma variação moderada (CV = 36,5%), com média de 6,18 quadros e mediana de 6, a indicar um desenvolvimento populacional relativamente homogêneo no apiário. A análise temporal (Figura 11) corrobora este padrão, demonstrando a clássica curva sazonal com o pico populacional a ocorrer entre os meses de julho e agosto.

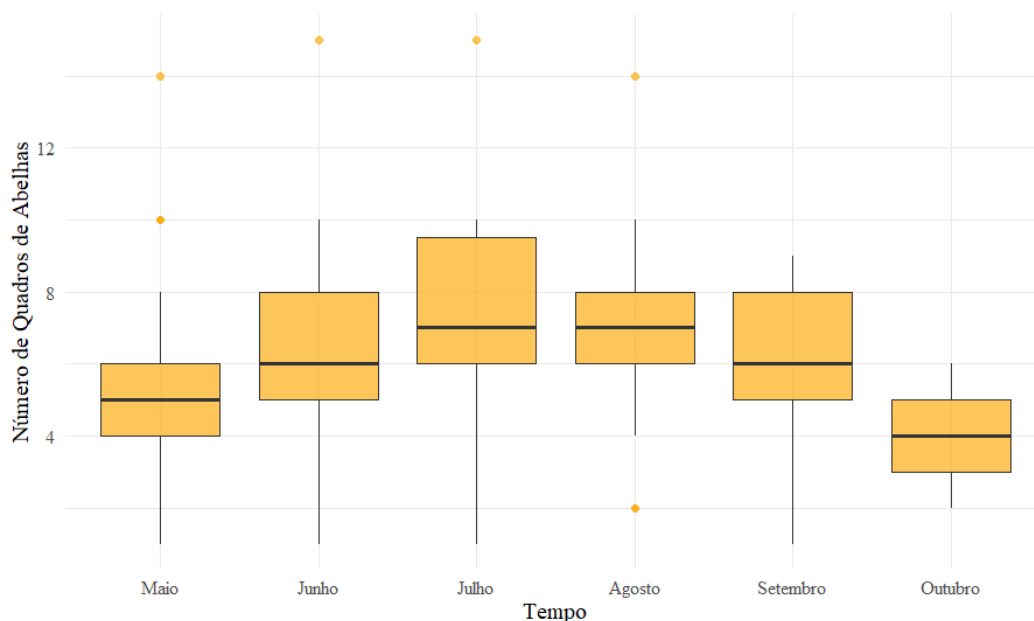


Figura 11: Dinâmica populacional das colónias no período ativo representada pelo número de quadros com abelhas.

Em contraste, as variáveis associadas à pressão parasitária pela varroa e à agressividade demonstraram extrema heterogeneidade. A queda natural diária de ácaros registou um CV de 124%, com a mediana (7,85 ácaros/dia) substancialmente inferior à média (12,63 ácaros/dia). Esta forte assimetria positiva ($Skew = 2,56$) indica que, embora a maioria das colónias tenha mantido níveis moderados de infestação (com 75% dos registos abaixo de 15,3 ácaros/dia), ocorreram picos severos de infestação em momentos ou colónias específicas, acentuando-se progressivamente até setembro (Figura 12).

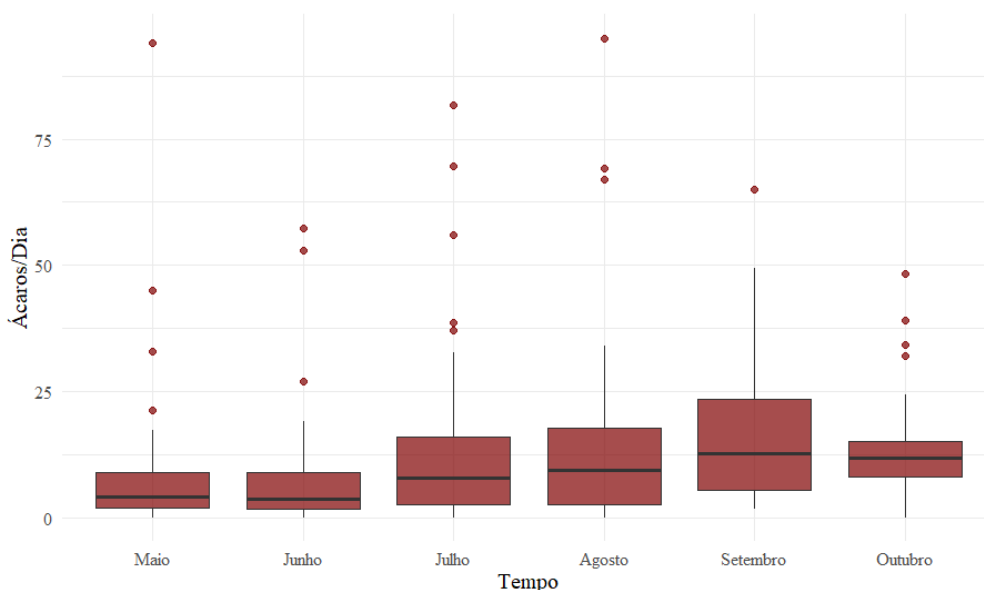


Figura 12: Dinâmica populacional da varroa de maio a junho em ácaros/dia (queda natural).

O mesmo padrão assimétrico foi observado na taxa de infestação ($CV = 170,5\%$; mediana = $0,68\%$; média = $2,17\%$). A distribuição de frequências (Figura 13) apresenta uma forte assimetria à direita, onde a classe 0-1% apresentou a frequência mais elevada. É importante realçar, ainda, que a maior parte das colónias (75%) apresentou uma taxa de infestação inferior a $2,46\%$, situando-se abaixo, mas bastante próxima, do limiar crítico de 3% de infestação forética. Este valor é amplamente utilizado na Europa como limite tolerável no período ativo, acima do qual torna-se necessária a aplicação urgente de tratamento contra a varroa para evitar o colapso das colónias (Genersch et al., 2010; Rosenkranz et al., 2010). A grande variação global desta taxa é, portanto, impulsionada por uma minoria de colónias altamente infestadas e evidencia um gradiente de pressão parasitária entre os grupos. Além disso, esta variação na suscetibilidade inicial das colónias servirá de ponto de partida para avaliar a dinâmica populacional da varroa ao longo do ano e o consequente risco de mortalidade nos modelos analíticos seguintes.

Nos apiários sujeitos ao manejo convencional (com tratamento para varroa) avaliados por Giacobino et al. (2016), as colónias que apresentaram infestação $<2\%$ na primavera tiveram suas rainhas trocadas e foram tratadas para varroa no inverno. Este resultado sugere que o desdobramento, convencionalmente utilizado para multiplicar o efetivo de colmeias e, no presente trabalho realizado como parte do protocolo, atua como redutor da infestação por varroa nas colónias (Blacquièrre et al., 2019). Este efeito benéfico decorre não só da diminuição imediata da população de ácaros entre as colónias filhas, mas da indução de uma pausa na criação de abelhas, o que interrompe temporariamente o ciclo reprodutivo da varroa e sua proliferação.

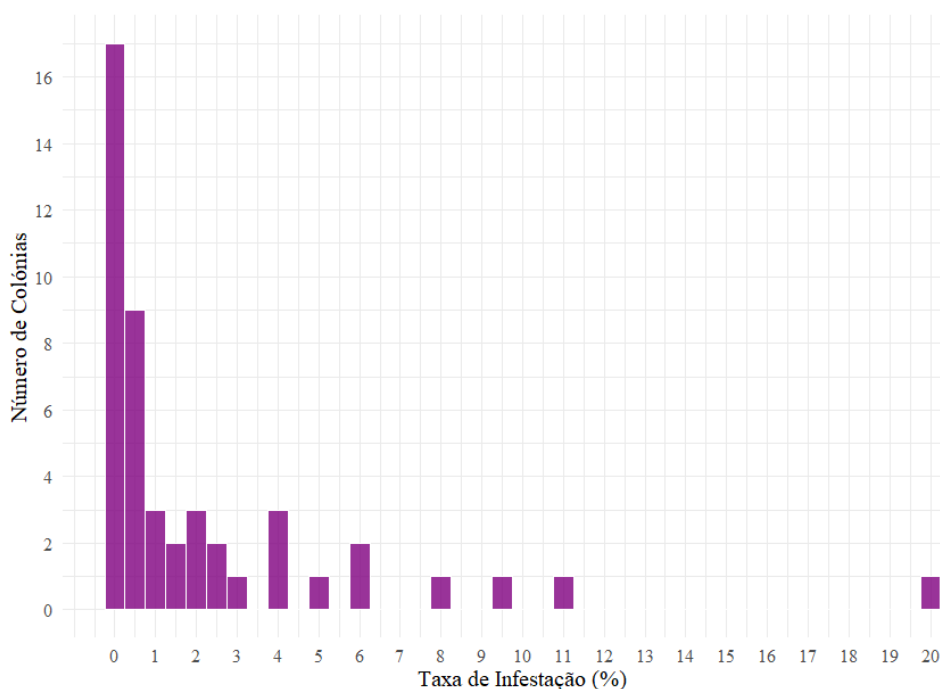


Figura 13: Distribuição da taxa de infestação por varroa. Medida única após confirmação de sucesso dos desdobramentos (junho/2025).

Paralelamente, o índice de agressividade também apresentou forte variabilidade ($CV = 121,4\%$; mediana = 7,0; $Skew = 1,52$). A média observada neste estudo ($15,97 \pm 19,38$) é superior à reportada por Guzmán-Novoa et al. (2003) para linhagens europeias ($7,6 \pm 6,5$), embora relativamente próxima. Por outro lado, apresenta valores substancialmente inferiores aos observados em abelhas africanizadas ($88,3 \pm 14,1$) e em híbridos resultantes do cruzamento entre linhagens europeias e africanizadas ($77,5 \pm 23,9$). A análise temporal do índice de agressividade (Figura 14) revela um aumento drástico e uma elevada dispersão deste comportamento no mês de setembro. Este pico defensivo explica-se por fatores ecológicos e sanitários, em detrimento de fatores meteorológicos. Durante a transição para o outono a escassez de néctar induz um stress nutricional e eleva a ameaça de pilhagem entre colónias, o que exige o recrutamento de um maior número de abelhas guarda, exacerbando a reatividade do ninho (Downs & Ratnieks, 2000). Este estado de alerta é em simultâneo agravado pelo pico de carga parasitária na colónia. Embora a temperatura média durante a execução dos testes em setembro ($\sim 20^\circ\text{C}$) tenha sido inferior à dos meses anteriores (julho = 24°C ; agosto = 26°C), este perfil térmico permanece amplamente adequado à atividade normal de voo. Por conseguinte, o aumento da agressividade não decorre do arrefecimento do ambiente,

constituindo antes uma resposta defensiva à pilhagem e à escassez de recursos no final da época ativa.

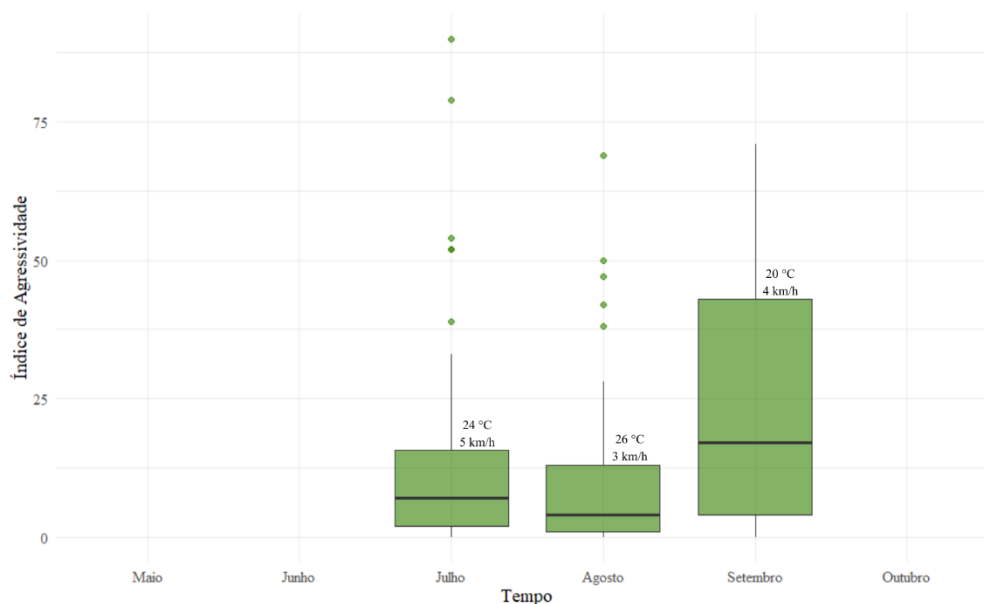


Figura 14: Índice de agressividade ao longo do tempo. Cada mês possui indicação da média de temperatura ambiente (°C) e da velocidade do vento (km/h) no momento da realização do teste.

A associação entre a queda natural de varroa e a taxa de infestação inicial apresentou correlação positiva moderada e significativa ($\rho = 0,41$; $p < 0,05$) (Figura 15). Estes resultados indicam que ambas as metodologias avaliam a infestação das colónias de forma relativamente congruente, contudo, a relação não é suficientemente forte para adotar apenas uma delas como métrica universal de avaliação da infestação por varroa. Desta forma, este resultado suporta o recomendado pela literatura de optar pelo método do detergente para avaliações de infestação pontuais (antes do tratamento para varroa em manejos convencionais), uma vez que se trata de um procedimento letal e invasivo para as abelhas amostradas (Dietemann et al., 2013). Em contrapartida, para a avaliação e monitorização contínua da infestação, é recomendado fazer uso do método de queda natural, dada a sua natureza não invasiva e ausência de perturbação no desenvolvimento da colónia (Branco et al., 2006; Dietemann et al., 2013). Além disso, a elevada variância não explicada por esta correlação corrobora a premissa de que a queda natural não constitui o método mais fidedigno para avaliar a infestação em cenários onde a carga parasitária é baixa (Dietemann et al., 2013).

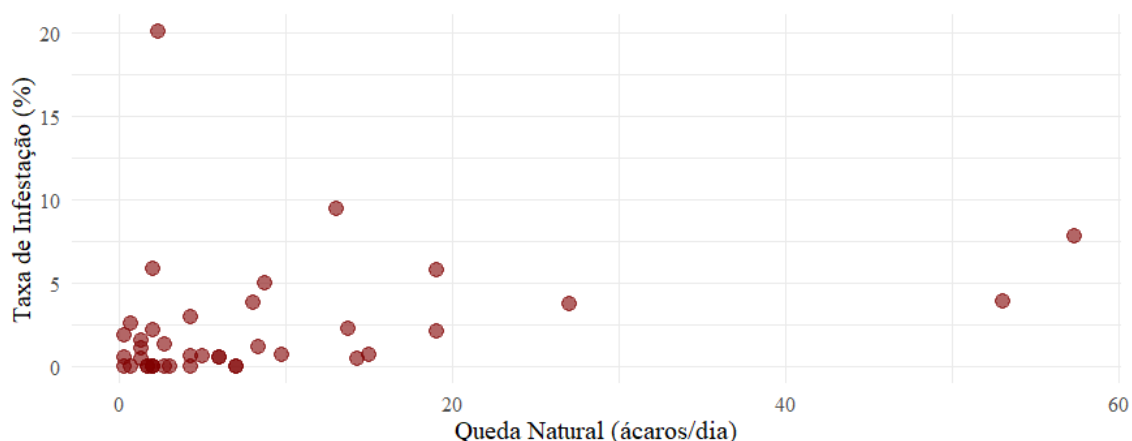


Figura 15: Gráfico de correlação de Spearman entre a queda natural de varroa (ácaros/dia) e a taxa de infestação (%) observadas em junho. ($\rho = 0,41$; $p < 0,05$).

Paralelamente, observou-se uma correlação positiva moderada e significativa ($\rho = 0,53$; $p < 0,05$) entre o índice de agressividade e a força da colônia (Figura 16), calculada com base na média das observações registadas ao longo dos meses de julho, agosto e setembro. Este resultado demonstra a tendência biológica de que colônias com maior efetivo populacional apresentam respostas defensivas mais robustas (Breed et al., 2004; Nouvian et al., 2016), traduzindo-se diretamente num maior número de ferrões depositados na bandeira durante o teste de agressividade. Por outras palavras, uma colônia com um maior efetivo populacional tem possibilidade de recrutar mais abelhas guarda do que uma colônia mais fraca. Como demonstrado por Nouvian et al. (2016), existe uma correlação direta entre o número de abelhas guarda à entrada da colônia e a sua intensidade da resposta defensiva.

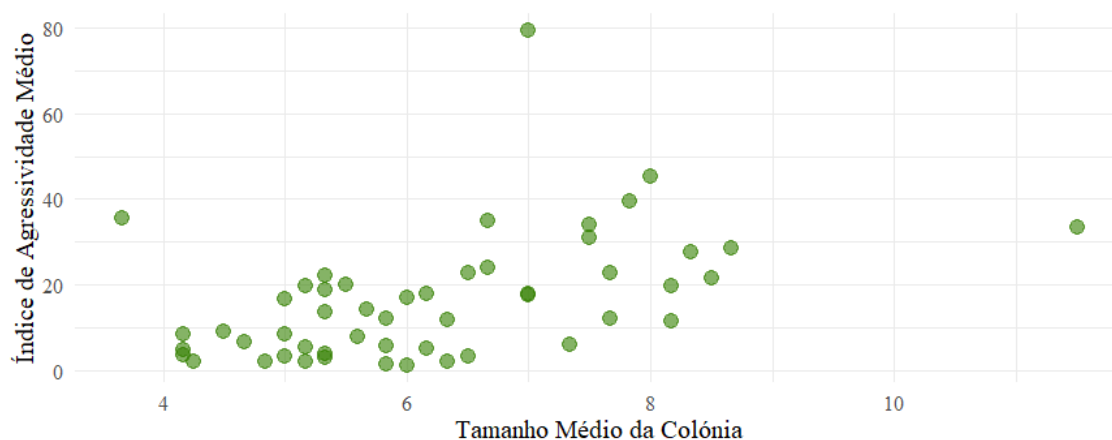


Figura 16: Gráfico de dispersão e correlação de Spearman entre o índice de agressividade e a força da colônia, correspondentes aos valores médios do trimestre de julho a setembro ($\rho = 0,53$; $p < 0,05$).

5.3. Evolução temporal da pressão parasitária

A análise dos Modelos Lineares Mistos (*LMM*) evidenciou dinâmicas distintas para os efeitos das variáveis da taxa de infestação, força da colônia e índice de agressividade sobre a queda natural de varroa ao longo dos meses de observação.

No **Modelo 1**, observou-se que a taxa de infestação com que as colônias iniciaram a primavera é um determinante crítico da pressão parasitária futura ($F = 14,83$; $p = 0,0004$). Embora no mês de referência (maio) a diferença estimada pelo modelo (pelo coeficiente β) entre os grupos ($\geq 3\%$ ou $< 3\%$) tenha sido de aproximadamente 7 varroas, uma variação não significativa ($\beta = 7,00$; $p = 0,159$), o afastamento progressivo das trajetórias de infestação justifica o elevado efeito global do modelo. Esta divergência é visível na Figura 17, na qual a linha do grupo de maior infestação (vermelho) permanece sistematicamente acima da do grupo de menor carga (verde).

A dinâmica evidenciada pelo **Modelo 1** confirma que o nível de infestação com que a colônia inicia a época ativa atua como um preditor irreversível da pressão sanitária tardia (Rosenkranz et al., 2010). O acréscimo pontual e significativo de queda natural logo no mês de julho, exclusivo do grupo mais infestado ($\geq 3\%$), sugere uma saturação prematura da capacidade de suporte da criação (Martin, 1998). À medida que o espaço para reprodução da varroa nos alvéolos se esgota, uma maior proporção de ácaros é forçada a transitar para a fase forética, precipitando a sua queda nas bases (Boot et al., 1993; Fries et al., 1994). Os aumentos globais registados entre agosto e outubro refletem a transição sazonal da colônia, nomeadamente, o natural declínio da taxa de postura da rainha no final do verão reduz a proporção de criação relativamente ao número de abelhas adultas, promovendo a concentração da varroa nas abelhas adultas e exacerbando o colapso das colônias já debilitadas (Sumpter & Martin, 2004; Genersch et al., 2010).

Esta correlação entre o aumento expressivo da carga parasitária outonal e a suscetibilidade da colônia alinha-se com a dinâmica documentada por Fries et al. (2006) na população de Gotland. Neste estudo, a letalidade impulsionada pelos picos de infestação atingidos no outono do segundo ano sem tratamentos funcionou como o principal estrangulamento populacional, confirmando esta transição sazonal como o filtro crítico da seleção natural (Fries et al., 2006).

Verificou-se ainda um efeito significativo para a variável mês ($F = 3,93$; $p = 0,002$). Em comparação com o mês de referência (maio), registaram-se aumentos

significativos na queda natural de varroa nos meses de agosto ($\beta = 8,23$; $p = 0,007$), setembro ($\beta = 8,84$; $p = 0,004$) e outubro ($\beta = 7,63$; $p = 0,014$). A interação global entre os grupos de infestação e os meses não foi significativa ($F = 1,71$; $p = 0,133$), indicando que a trajetória de queda de varroa foi tendencialmente paralela em ambos os grupos. No entanto, a análise dos coeficientes do modelo revelou um acréscimo significativo na queda natural de varroa no mês de julho, especificamente para o grupo $\geq 3\%$ ($\beta = 14,36$; $p = 0,019$).

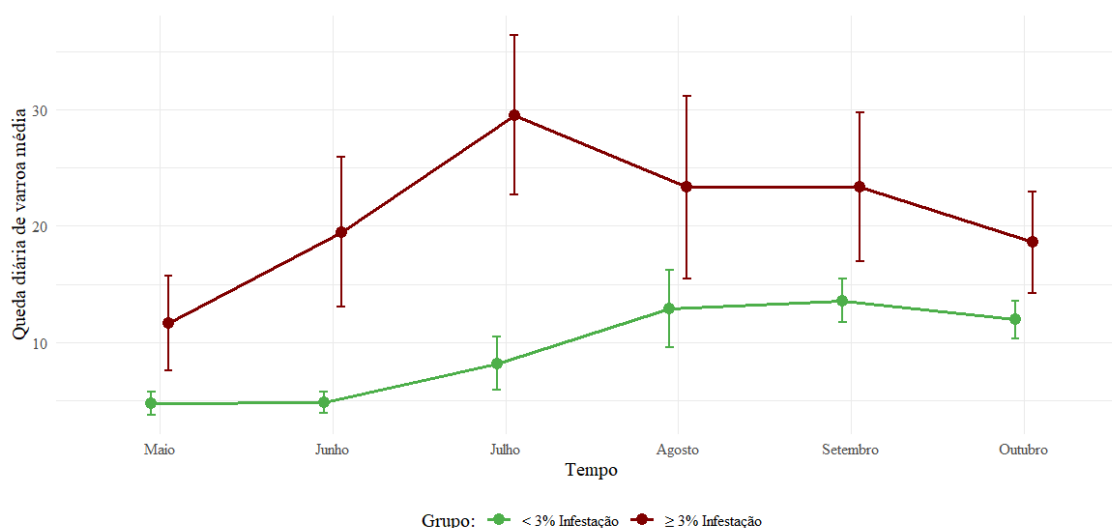


Figura 17: Queda natural de varroa (ácaros/dia) registada ao longo dos meses de acompanhamento, estratificada pelos dois grupos de infestação inicial. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. Os pontos foram ligeiramente desalinhados no eixo horizontal para acomodar as barras de erro.

Relativamente ao **Modelo 2**, os resultados demonstraram que a força da colónia não exerceu uma influência preditiva significativa sobre a queda natural de varroa ($F = 0,10$; $p = 0,751$). Neste modelo específico, nem a progressão mensal ($F = 0,38$; $p = 0,5367$) nem a interação entre a força da colónia e o tempo ($F = 0,55$; $p = 0,4585$) revelaram efeitos significativos. Estes dados sugerem que, neste apiário e sob este regime de seleção, o volume populacional de abelhas adultas não dita, de forma isolada, a magnitude da queda diária de ácaros nas colónias observadas. Do ponto de vista biológico, embora colónias mais populosas tenham mais hospedeiros adultos, mantêm também áreas de criação mais extensas e prolongadas. Por conseguinte, o volume populacional, de forma isolada, não traduz linearmente a carga parasitária total nem garante maior eficácia de auto-limpeza num regime de seleção natural (Branco et al., 2006). De facto, este estudo indica que a estimativa da infestação depende fortemente da distribuição dos ácaros entre criação e abelhas adultas, podendo colónias mais populosas

apresentar níveis aparentes mais baixos devido a um efeito de diluição, sem que isso reflita necessariamente uma menor carga parasitária absoluta (Branco et al., 2006).

Por fim, o **Modelo 3** indicou que o comportamento defensivo das abelhas não modula a dinâmica de queda da varroa. O índice de agressividade não apresentou significância estatística no modelo global ($F = 0,39$; $p = 0,535$), com uma estimativa de efeito próxima de zero ($\beta = -0,027$, $p > 0,05$), o que indica uma variação negligenciável na infestação de varroa por cada incremento no nível de agressividade. Além disso, a ausência de interação significativa entre a agressividade e o mês ($F = 0,38$; $p = 0,537$) reforça que colônias mais reativas não exibem um perfil de queda de varroas distinto das colônias menos reativas ao longo da janela temporal analisada (julho a setembro). Estes dados alinham-se com a literatura, que demonstra a dissociação fenotípica e genética entre a agressividade e os mecanismos de resistência, evidenciando que a defensividade não atua como moduladora da carga de varroa (Arechavaleta-Velasco & Guzmán-Novoa, 2001; Villa et al., 2009). Desta forma, invalida-se a hipótese de que elevado índice de agressividade seja uma consequência direta da pressão parasitária por varroa medida pela queda natural, especialmente em setembro.

5.4. Sobrevivência global e indicadores de risco

A curva de Kaplan-Meier (Figura 18) descreve a trajetória de mortalidade global observada ao longo do segundo ano de Seleção Darwiniana (2025). Das 53 colônias acompanhadas, 50 colapsaram antes do final do ensaio, restando três sobreviventes aquando da conclusão do período experimental, em fevereiro de 2026 (278 dias de vida). A distribuição da sobrevivência das colônias revelou uma assimetria negativa ($Skew = -1,95$), com a mortalidade concentrada nos extremos do estudo e a mediana de 236 dias. A estatística dos dados de sobrevivência somada à curva de Kaplan-Meier evidencia que uma parcela expressiva do apiário conseguiu completar o ciclo de monitorização, não obstante a presença de baixas precoces, reflete a forte pressão de seleção sobre os desdobramentos mais vulneráveis.

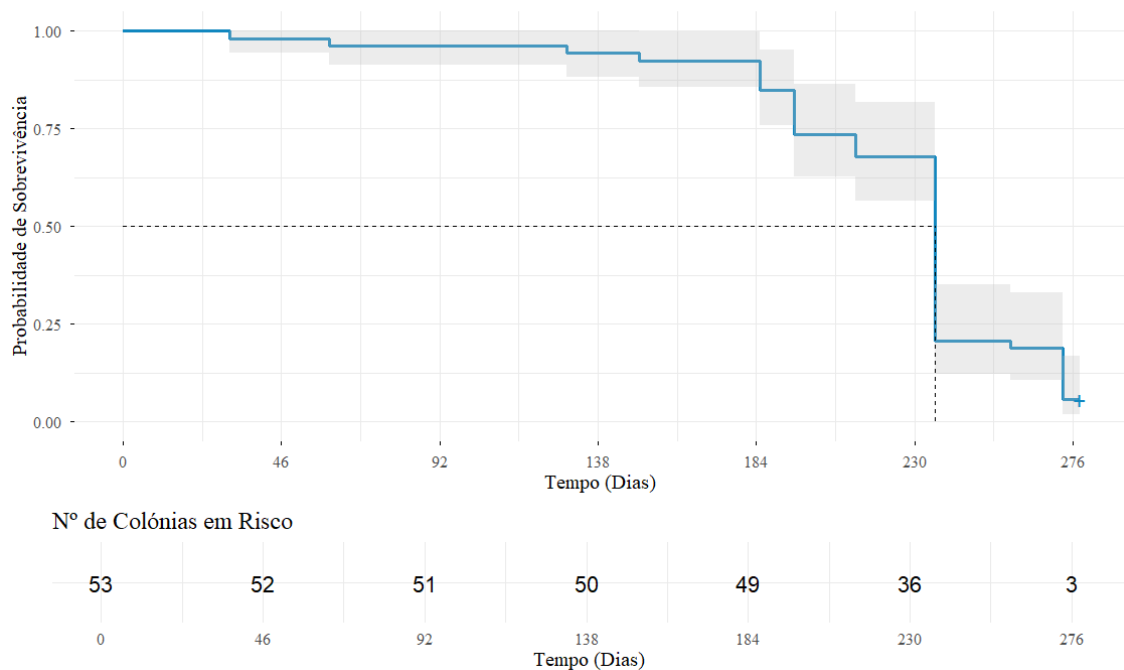


Figura 18: Curva de sobrevivência global (Kaplan-Meier) das colônias ao longo do período experimental (2025/2026).

Após o enquadramento do declínio populacional geral, importou compreender quais os fatores que precipitaram ou retardaram o colapso das colônias. Com esse intuito, a análise de risco e sobrevivência foi estratificada considerando dois critérios: a taxa de infestação inicial ($\geq 3\%$ e $< 3\%$) e a origem materna inicial (rainha fundadora). As dinâmicas de sobrevivência para ambas as variáveis encontram-se representadas na Figura 19.

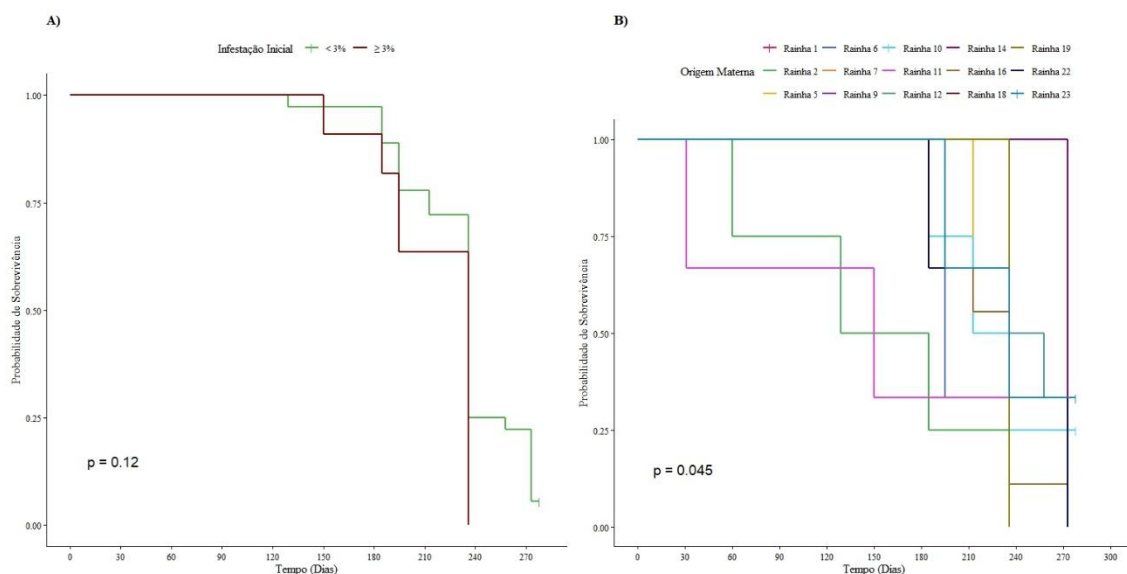


Figura 19: Curvas de sobrevivência estratificadas (Kaplan-Meier) das colónias ao longo do período experimental (2025/2026). (A) Probabilidade de sobrevivência estratificada pela taxa de infestação inicial por varroa ($\geq 3\%$ e $< 3\%$) no início do verão. (B) Probabilidade de sobrevivência estratificada pela origem materna (rainha fundadora).

O teste Log-Rank indicou que o grupo de infestação ($\geq 3\%$ vs. $< 3\%$) não apresentou um efeito significativo na probabilidade de sobrevivência das colónias ($\chi^2 = 2,4$; $p = 0,12$). Este resultado demonstra que a taxa de infestação inicial não determinou isoladamente o tempo de colapso das colónias. Isto sugere que, embora a carga inicial dite a pressão parasitária ao longo do ano (como demonstrado no Modelo 1), não determina isoladamente o momento do colapso da colónia. Esta discrepância explica-se pelo facto de a letalidade da varroa resultar não somente pelo parasitismo direto, mas também pela transmissão de outros patógenos, nomeadamente os vírus que tendem a acumular-se no outono, comprometendo a viabilidade da população de abelhas de inverno (Martin, 2001; Genersch et al., 2010). Consequentemente, o momento do colapso depende da interação entre a carga viral acumulada, o clima e as reservas nutricionais da colónia (Le Conte et al., 2010).

Em contrapartida, o teste Log-Rank para a proveniência das colónias (origem da rainha fundadora) revelou diferença significativa na sobrevivência entre as famílias das colónias ($\chi^2 = 24,1$; $p = 0,045$). A análise comparativa entre os colapsos observados e esperados indicou que as famílias das rainhas 2 e 11 apresentaram uma mortalidade mais precoce, enquanto as famílias 1 e 12 demonstraram maior tempo de sobrevivência. Esta clara segregação inter-famílias corrobora a premissa central de que a resistência/tolerância possui base genética e hereditária (Locke, 2016; Guichard et al.,

2020). Estes dados confirmam o sucesso do protocolo de Seleção Darwiniana como filtro evolutivo, demonstrando que a ausência de tratamentos elimina eficientemente os genótipos suscetíveis, isolando as colônias com aptidão para a sobrevivência a longo prazo (Seeley, 2007).

5.4.1. Dinâmica temporal do risco de mortalidade

No primeiro Modelo de Riscos Proporcionais de Cox avaliado (*MECM*, **Modelo 4**), a análise dos efeitos fixos revelou que a queda natural de varroa não constituiu um preditor significativo para o risco de colapso das colônias (Hazard Ratio [HR] = 0,99; $p > 0,05$). Da mesma forma, a força da colônia não teve efeito significativo sobre a mortalidade (HR = 0,86; $p > 0,05$). A variância estimada para ambos os efeitos aleatórios (colônia e rainha_ID) foi residual (0,0004), não revelando heterogeneidade detectável associada ao agrupamento genético ou às medições repetidas neste modelo.

Para identificar o peso específico de cada variável na mortalidade das colônias ao longo do ensaio, procedeu-se numa primeira fase ao ajuste de modelos de Cox univariados estratificados por mês (Tabela 7). A análise revelou que o comportamento defensivo (agressividade) não apresentou impacto significativo no risco de colapso no período avaliado. Já a força da colônia demonstrou um efeito preditivo isolado no mês de julho (HR = 1,195; $p = 0,0194$), sugerindo que as colônias mais populosas no pico do verão estavam mais vulneráveis aos efeitos da infestação por varroa. A queda diária de ácaros revelou-se como o preditor isolado mais consistente, pois aumentou significativamente o risco de mortalidade das colmeias nos meses críticos de junho (HR = 1,027; $p = 0,0171$) e setembro (HR = 1,031; $p = 0,0083$).

Na literatura o comportamento defensivo é apontado como um indicador de sobrevivência em colônias não tratadas para varroa, uma associação marcada pelo exemplo de resistência das abelhas africanizadas (Locke, 2016). Contudo, neste estudo, a agressividade não modulou o risco de morte das colônias. Embora as limitações da dimensão das amostragens e da análise de dados não permitam excluir em definitivo essa correlação, os dados sugerem que na *A. m. iberiensis* a defensividade e a resistência à varroa sejam traços independentes. Uma vez que o comportamento defensivo evoluiu essencialmente como resposta a macro-predadores (Breed et al., 2004), a co-ocorrência entre agressividade e resistência poderá ser uma particularidade do percurso evolutivo

das abelhas africanizadas, não servindo obrigatoriamente como um preditor de sobrevivência da abelha ibérica.

O impacto significativo da queda natural de varroa no risco de mortalidade em junho e em setembro encontra paralelo no modelo biológico proposto por van Dooremalen et al. (2012). Estes autores demonstraram que o *stress* parasitário exercido pela varroa no final do verão coincide com a transição da população da colónia, na qual ocorre a substituição das abelhas de verão por abelhas de inverno, fisiologicamente adaptadas para uma maior longevidade. A forte associação entre a infestação de setembro e o colapso das colónias neste estudo sugere que a pressão da varroa comprometeu a integridade fisiológica e reduziu drasticamente a esperança média de vida destas abelhas, inviabilizando a sobrevivência das colónias até à primavera seguinte.

Para avaliar o efeito combinado das duas variáveis populacionais (queda natural e força da colónia), ajustou-se um modelo multivariado por mês. Os resultados corroboram os efeitos observados nos modelos univariados: a carga de varroa manteve-se como um fator de risco independente e significativo nos meses de junho ($p < 0,05$) e setembro ($p < 0,05$). Em mais detalhe, a taxa de risco (HR) estimada indica que a cada varroa adicional contabilizada na queda natural diária aumenta a probabilidade de morte da colónia em 2,4% no mês de junho ($HR = 1,024$) e em 3,1% no mês de setembro ($HR = 1,031$), independentemente da dimensão populacional da colmeia.

De igual modo, o risco associado a colónias com maior número de abelhas em julho manteve-se estatisticamente robusto após o ajuste para o modelo multivariado. Neste mês de pico de verão, cada aumento unitário no tamanho da colónia traduziu-se num agravamento direto de 28,7% no risco de mortalidade ($HR = 1,287$; $p = 0,002$). E, para cada aumento unitário de varroa em julho, o risco de morte da colónia aumenta em 3,2% ($HR = 1,032$, $p = 0,005$). De forma cumulativa, estima-se que uma colónia que sofra simultaneamente o incremento de um quadro de abelhas e de uma varroa adicional na queda diária enfrente um aumento combinado do risco de colapso ($HR_{\text{Combinado}} = \text{Queda natural julho} \times HR_{\text{Força da colónia Julho}}$) na ordem de 32,8% ($HR_{\text{Combinado}} = 1,328$). Avaliando o efeito conjunto da força da colónia e da infestação por varroa é possível observar que, neste estudo, o período decisivo para a sobrevivência das colónias foi no mês de julho, no início do verão. Estes resultados corroboram o observado na ilha de Gotland, onde o efeito da infestação por varroa no outono teve efeito na sobrevivência

das colónias (Fries et al., 2006). Entretanto, neste trabalho, o período considerado decisivo para a sobrevivência foi adiantado para o início do verão, enquanto o observado pelos autores ocorreu no outono (Fries et al., 2006). Esta variação entre as épocas críticas, de certa forma, reforça a necessidade de adaptar a avaliação dos parâmetros a cada local onde a seleção natural assistida é conduzida. A análise das causas subjacentes a esta variação deverá ser aprofundada em trabalhos futuros.

Esta dinâmica paradoxal observada em julho, na qual as colónias mais fortes apresentaram maior risco de morte, é contraintuitiva sob o ponto de vista da apicultura comercial. A seleção artificial preconiza a escolha de colónias maiores para maximizar a produção de mel. Contudo, sob condições de Seleção Darwiniana este fenótipo torna-se desadaptativo. Este fenómeno é suportado pelas observações de Locke e Fries (2011) na população de Gotland. Os autores demonstraram que a redução do tamanho da colónia é um traço adaptativo crucial em populações que sobrevivem à infestação por varroa sem tratamentos. Colónias menores limitam a quantidade de alvéolos de criação disponíveis, o que restringe a taxa de reprodução do ácaro. Assim, os resultados deste trabalho ilustram um *trade-off* evolutivo: as colónias de *A. m. iberiensis* que tiveram o pico de desenvolvimento da população no verão proporcionaram maior área disponível para a reprodução da varroa, o que culminou na baixa capacidade de sobrevivência destas colónias.

Tabela 7: Razão de Risco (HR) e Intervalos de Confiança (IC = 95%) estimados por Modelos de Riscos Proporcionalis de Cox para o colapso das colônias, estratificados por mês e variável. HR > 1 indica aumento do risco de colapso; HR < 1 indica diminuição do risco. Valores em negrito destacam as variáveis com efeito significativo, acompanhados do respectivo p-valor. n/s = estatisticamente não significativo.

Modelos de Riscos Proporcionalis de Cox						
Variável	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
Modelos Univariados						
Queda natural	0,993 [0,98 - 1,01] n/s	1,027 [1,01 - 1,05] p = 0,0171	1,01 [0,99 - 1,03] n/s	1,005 [0,988 - 1,022] n/s	1,031 [1,008 - 1,056] p = 0,0083	1,021 [0,992 - 1,052] n/s
Força da colônia	1,054 [0,919 - 1,209] n/s	1,110 [0,952 - 1,295] n/s	1,195 [1,029 - 1,387] p = 0,0194	1,140 [0,976 - 1,331] n/s	1,082 [0,934 - 1,253] n/s	0,935 [0,697 - 1,254] n/s
Índice de agressividade	-	-	0,997 [0,984 - 1,011] n/s	1,001 [0,981 - 1,021] n/s	0,992 [0,978 - 1,007] n/s	-
Modelo Multivariado						
Queda natural	0,983 [0,962 - 1,004] n/s	1,024 [1,001 - 1,047] p = 0,0364	1,032 [1,009 - 1,055] p = 0,00541	1,005 [0,989 - 1,021] n/s	1,031 [1,008 - 1,055] p = 0,0083	1,021 [0,992 - 1,050] n/s
Força da colônia	1,178 [0,993 - 1,396] n/s	1,107 [0,927 - 1,321] n/s	1,287 [1,096 - 1,511] p = 0,00209	1,045 [0,865 - 1,261] n/s	0,984 [0,833 - 1,162] n/s	0,706 [0,484 - 1,030] n/s

5.4.2. Dinâmica sazonal de peso e termorregulação

A monitorização contínua das colônias revelou dinâmicas sazonais distintas entre o primeiro (2024) e o segundo ano do estudo (2025), evidenciando que o segundo ano foi marcado por uma instabilidade severa. No ano de 2024, a evolução do peso das colônias seguiu um padrão sazonal relativamente previsível: um ganho de peso contínuo até ao pico do verão (julho), seguido por um declínio gradual até o início do outono (setembro – outubro), em que houve aumento de peso, que pode ser associado à preparação da criação que passaria o inverno, seguida de queda contínua novamente no peso (Figura 20).

Em contraste, o ano de 2025 apresentou uma dinâmica caótica. Algumas colônias apresentaram dinâmicas parecidas com o ano anterior e outras iniciaram a perda de peso mais cedo. A elevada taxa de perda de colônias registada neste segundo ano corrobora a letalidade inerente ao manejo restritivo sem acaricidas. Como sublinhado por Neumann e Carreck (2010) na sua revisão global sobre o colapso de colônias, a infestação por varroa, quando aliada à transmissão de vírus (nomeadamente o vírus das asas deformadas - DWV) assume-se como o motor principal da mortalidade no inverno. Esta instabilidade

observada entre 2024 e 2025 reflete, portanto, a vulnerabilidade das colónias aos limiares críticos de infestação ditados pela variação da pressão ambiental, que impossibilitou as colónias de manterem as suas reservas vitais de forma estável, precipitando o declínio populacional. De facto, a literatura evidencia que as diminuições atípicas de peso captadas por estes sistemas refletem exatamente essa contração severa do efetivo da colmeia (Cota et al., 2023).

As quedas e os aumentos abruptos de peso, bem como a alteração da cor das linhas relativas a cada colónia resultam da passagem da respetiva balança a uma nova colónia em decorrência da morte da colónia anterior. Principalmente durante o inverno, período de maior mortalidade das colónias. Embora estas alterações introduzam descontinuidades temporárias nos dados brutos, a análise focou-se na tendência global de suavização, o que permitiu isolar o ruído metodológico e descrever com maior fiabilidade a dinâmica sazonal da variação de peso médio do apiário, uma vez que as balanças permaneceram a maior parte do período avaliado na mesma colónia.

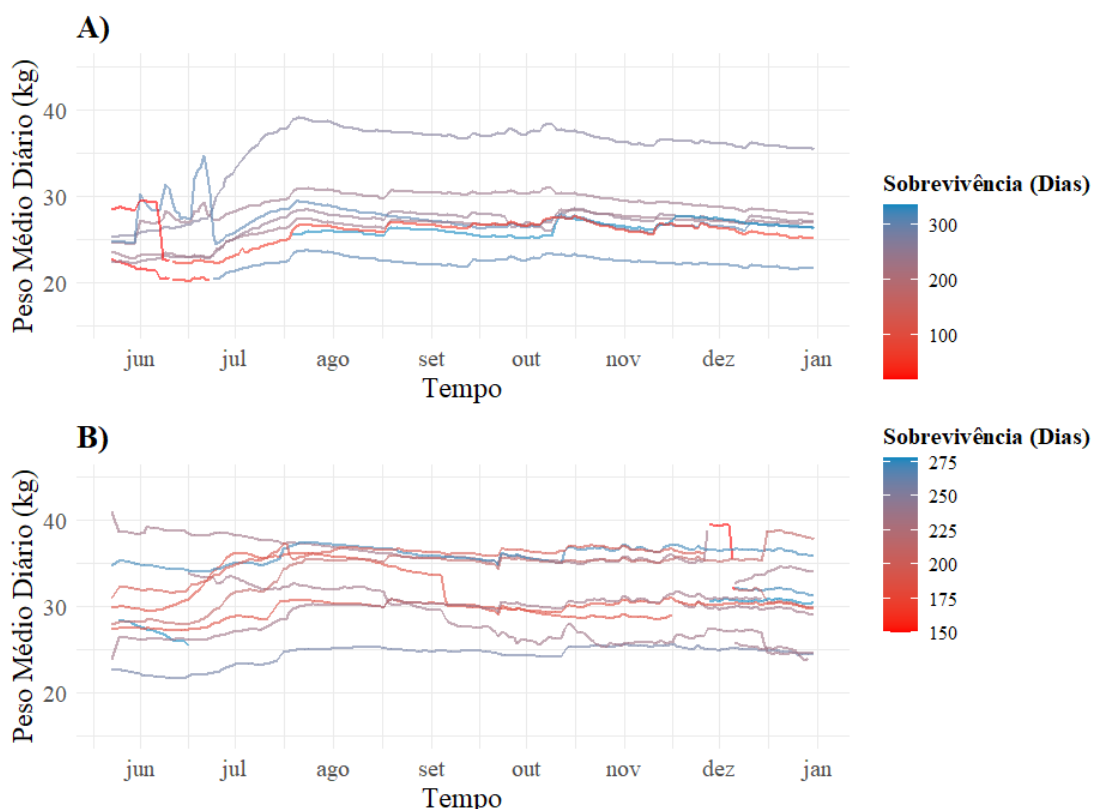


Figura 20: Evolução comparativa do peso médio diário (kg) das colónias em 2024 (A) e 2025 (B). O gradiente de cor ilustra a longevidade total de cada matriz (dias de sobrevivência).

A análise da amplitude térmica interna, um indicador direto da capacidade de termorregulação e do tamanho do aglomerado de abelhas, corroborou a severidade do ano de 2025 (Figura 21). Em 2024, as colónias conseguiram manter a estabilidade térmica (amplitudes diárias reduzidas, $< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante grande parte da época ativa, com a perda de controlo homeostático a surgir progressivamente apenas nos meses de outono/inverno (setembro a janeiro), culminando no colapso. No entanto, em 2025, observou-se uma perda drástica e precoce da capacidade de termorregulação. A amplitude térmica interna disparou de forma caótica (atingindo frequentemente valores entre os $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $15\text{ }^{\circ}\text{C}$) logo entre agosto e setembro. Este colapso térmico antecipado evidencia que as colónias em 2025 perderam rapidamente a massa crítica de obreiras necessária para termorregular e estabilizar o ninho, refletindo condições de *stress* extremo face ao ano anterior. Como demonstrado por Zacepins et al. (2016), o rigor da termorregulação depende inteiramente da capacidade biológica do aglomerado de abelhas para reter calor. Logo, estas flutuações atípicas captadas pelos sensores não representam apenas as variações ambientais, mas atuam como biomarcadores telemétricos do declínio populacional que atingiu níveis críticos.

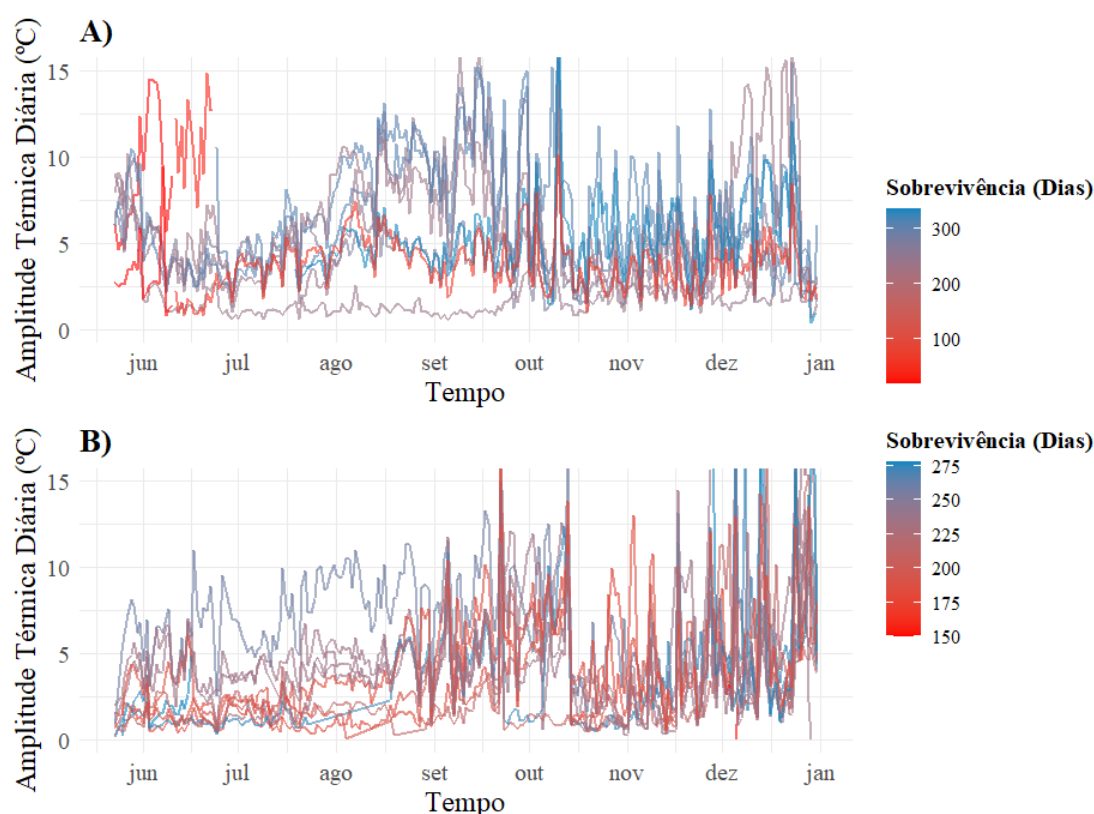


Figura 21: Evolução comparativa da amplitude térmica diária (°C) do ninho em 2024 (A) e 2025 (B). O gradiente de cor ilustra a longevidade total de cada matriz (dias de sobrevivência).

Além disso, esta perda precoce de homeostasia térmica não deve ser interpretada apenas como um sintoma passivo de colapso, mas possivelmente como o desfecho de um mecanismo de defesa levado ao extremo. De acordo com Fries e Bommarco (2007), a redução drástica da criação é uma resposta adaptativa primária da colônia para tentar quebrar o ciclo reprodutivo da varroa sob alta infestação. No entanto, esta plasticidade fenotípica acarreta custos biológicos significativos, nomeadamente a diminuição do recrutamento de novos indivíduos e a consequente diminuição do efetivo populacional. A médio prazo, esta estratégia compromete a capacidade de termorregulação e a coesão funcional da colônia, podendo precipitar o colapso em vez de o evitar.

A instabilidade observada na dinâmica das balanças em 2025, caracterizada por perdas prematuras de peso e pelo colapso precoce da homeostasia térmica, corrobora a sensibilidade temporal da colônia à pressão parasitária. A capacidade de detetar esta falência valida a aplicação de sistemas de apicultura de precisão (*IoT*) no protocolo de seleção. De acordo com Cota et al. (2023), a integração da monitorização do peso e da temperatura altera o paradigma de avaliação, transformando estas quedas abruptas em

indicadores preditivos fiáveis do esgotamento de reservas muito antes do colapso físico ser visível.

Conforme preconizado por van Dooremalen et al. (2012), colónias sujeitas a elevadas taxas de infestação por varroa durante o outono falham no recrutamento de uma massa crítica de abelhas de inverno saudáveis, devido à mortalidade precoce dos indivíduos parasitados na fase de pupa ou abelhas recém-emergidas. No presente trabalho, este fenómeno traduziu-se na rápida contração da população de abelhas em 2025, impossibilitando a manutenção do controlo térmico do ninho e precipitando a perda de peso por incapacidade de retenção e consumo eficiente de reservas.

Adicionalmente, o contraste comportamental entre o declínio gradual em 2024 e o colapso agudo em 2025 sublinha que, sob regimes de seleção Darwiniana (ausência de tratamentos químicos), a resiliência das colónias está fortemente condicionada por limiares ambientais e sanitários anuais. Nos grupos de controlo não tratados de van Dooremalen et al. (2012), a ausência de tratamento para a varroa no final do verão resultou invariavelmente em colapsos inverniais severos, um padrão que se assemelha à dinâmica observada no ano de 2025. Este cenário reforça que a pressão parasitária exercida no outono atua como o principal motor de seleção, eliminando precocemente as colónias incapazes de suprimir a reprodução do ácaro ou de tolerar os danos fisiológicos associados.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a dinâmica populacional entre hospedeiro-parasita e a sobrevivência de colónias de *Apis mellifera iberiensis* sujeitas ao protocolo de Seleção Darwiniana (ausência de tratamentos acaricidas) no Nordeste de Portugal. Tratando-se da componente genética de origem materna, as colónias sobreviventes pertenciam exclusivamente à linhagem africana (Linhagem A), contrastando com o colapso das linhagens europeias (M e C). Contudo, uma vez que a linhagem africana já representava a maioria do apiário (85%), a sua prevalência no final do estudo reflete esta desproporção amostral inicial. Consequentemente, não é possível afirmar que a sobrevivência destas matrizes derive de alguma vantagem adaptativa intrínseca à linhagem sem validação por dados adicionais. Ainda assim, é possível afirmar que o protocolo de seleção natural funcionou como um filtro seletivo rápido e eficaz, eliminando os genótipos susceptíveis

e isolando o material genético adaptado de elevado valor para o melhoramento genético de abelhas.

A comparação entre os dois primeiros anos do protocolo de Seleção Darwiniana evidenciou o efeito cumulativo e progressivo da pressão de seleção exercida pela varroa. O ano de 2024 caracterizou-se como um período estável, com progressão contínua da morte das colônias. Em contrapartida, o segundo ano (2025) representou a fase crítica de seleção, marcado pela resistência das colônias ao longo ano e colapso repentino no inverno. Provando que a ausência contínua de tratamentos químicos permitiu a acumulação de parasitas e seus efeitos sobre a saúde das abelhas, de forma a ultrapassar o limiar de resiliência da maioria das colônias e a desencadear o colapso generalizado do apiário.

No que concerne à pressão parasitária, os resultados evidenciaram que a taxa de infestação forética inicial no início do verão dita diretamente a magnitude da queda natural de varroa ao longo da temporada, determinando a intensidade dos picos populacionais do ácaro registados no verão. Contudo, confirmou-se que os desdobramento efetuado na primavera funcionou como um método de controlo mecânico de grande impacto, capaz de mitigar o crescimento populacional do parasita ao introduzir uma pausa temporária no ciclo de criação das colônias.

Os modelos de riscos proporcionais de Cox contrapõem a premissa de que colônias mais fortes são mais resilientes. Identificou-se que um maior tamanho da colônia em julho (verão) associado à infestação por varroa aumenta o risco de morte das colônias no inverno em 32,8% (HR Combinado = 1.0,328), onde cada quadro de abelha e cada varroa a mais têm efeito de 28,7% (HR = 1.0,287) e 3,2% (HR = 1.032), respetivamente, sobre o risco de morte das colônias. Este padrão explica-se pela dinâmica reprodutiva da varroa, uma vez que colônias maiores oferecem uma área maior de criação operculada, que funciona como incubadoras ideais para o ácaro.

Os modelos de Cox foram igualmente sensíveis ao detalhar a sazonalidade da letalidade da varroa, provando que a queda natural de ácaros não é linearmente letal ao longo do ano, mas concentra o seu risco de mortalidade especificamente nos meses de junho, julho e setembro. O risco em junho (2,4% para cada varroa a mais caída, HR = 1.0,024) sinaliza o impacto do parasita sobre a longevidade das abelhas de verão, comprometendo a recolha de reservas, enquanto o risco em setembro (3,1% para cada

varroa a mais caída, $HR = 1.0,031$) ataca diretamente a janela de nascimento da geração de abelhas de inverno. O parasitismo neste mês crítico degrada os corpos adiposos e as reservas de vitelogenina destas abelhas, condenando a colónia à falência homeostática meses mais tarde.

Em contrapartida, demonstrou-se que o comportamento defensivo das abelhas não possui qualquer associação com infestação por varroa ou com a maior longevidade das colónias. Esta dissociação sugere que a defesa da colónia contra predadores e os mecanismos internos de resistência sanitária (como o *Grooming* ou comportamento higiénico) poderão não estar diretamente associados, apontando para uma possível independência funcional entre estes caracteres. Tal abre perspectivas interessantes para programas de seleção, ao sugerir que a redução da reatividade comportamental não implica necessariamente uma diminuição da aptidão de sobrevivência.

Os dados de telemetria do sistema BEEP corroboram o declínio fisiológico das colónias. Contrariando a estabilidade térmica e de peso observada em 2024, o ano de 2025 registou perdas precoces de peso e flutuações térmicas internas de até 15 °C, evidenciando a perda de capacidade de termorregulação das abelhas de inverno, prejudicadas pelos efeitos da varroa. Em suma, apesar da mortalidade global de 94%, o protocolo permitiu isolar as matrizes mais aptas (rainhas 1 e 12).

Para investigações futuras, recomenda-se a monitorização da descendência destas rainhas para quantificar a herdabilidade real destes traços de resistência, bem como a incorporação de análises moleculares para mapear a carga viral latente (e.g., DWV), consolidando o entendimento dos mecanismos fisiológicos que ditam o desfecho da sobrevivência no ecótipo ibérico.

7. REFERÊNCIAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 165–189.
- Arechavaleta-Velasco, M. E., & Guzmán-Novoa, E. (2001). Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie*, 32(2), 157–174.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- BEEP Foundation. (s.d.). [Fotografia da interface da BEEP app e dispositivo BEEP base] [Fotografia]. BEEP - Bijenmonitoring. Recuperado de <https://beep.nl/measurement-system-2>.
- Blacquièrre, T., & Panziera, D. (2018). A Plea for Use of Honey Bees' Natural Resilience in Beekeeping. *Bee World*, 95(2), 34–38. <https://doi.org/10.1080/0005772x.2018.1430999>.
- Blacquièrre, T., Boot, W., Calis, J., Moro, A., Neumann, P., & Panziera, D. (2019). Darwinian black box selection for resistance to settled invasive *Varroa destructor* parasites in honey bees. *Biological Invasions*, 21(8), 2519–2528. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02001-0>.
- Boot, W. J., Calis, J. N. M., Boot, W. J., Calis, J. N. M., & Beetsma, J. (1993). Invasion of *Varroa jacobsoni* into honey bee brood cells: A matter of chance or choice? *Journal of Apicultural Research*, 32(3–4), 167–174. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101302>.
- Branco, M. R., Kidd, N. A. C., & Pickard, R. S. (2006). A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population estimation. *Apidologie*, 37(4), 452–461. <https://doi.org/10.1051/apido:2006010>.
- Breed, M. D., Guzmán-Novoa, E., & Hunt, G. J. (2004). Defensive behavior of honey bees: Organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annual Review of Entomology*, 49, 271–298. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123155>.
- Catania, P., & Vallone, M. (2020). Application of a precision apiculture system to monitor honey daily production. *Sensors* (Switzerland), 20(7). <https://doi.org/10.3390/s20072012>.
- Chávez-Galarza, J., Garnery, L., Henriques, D., Neves, C. J., Loucif-Ayad, W., Jonhston, J. S., & Pinto, M. A. (2017). Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis*: further insights from a large-scale study using sequence data of the tRNA^{Leu}-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., Azevedo, J. C., Patton, J. C., Muñoz, I., de La Rúa, P., & Pinto, M. A. (2013). Signatures of selection in the Iberian honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) revealed by a genome scan analysis of single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, 22(23), 5890–5907. <https://doi.org/10.1111/mec.12537>.
- Chen, C., Liu, Z., Pan, Q., Chen, X., Wang, H., Guo, H., Liu, S., Lu, H., Tian, S., Li, R., & 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>.
- Cota, D., Martins, J., Mamede, H., & Branco, F. (2023). BHiveSense: An integrated information system architecture for sustainable remote monitoring and management of apiaries based on IoT and microservices. *Journal of Open Innovation: Technology, Market, and Complexity*, 9(3). <https://doi.org/10.1016/j.joitmc.2023.100110>.
- De Miranda, J. R., Bailey, L., Ball, B. v., Blanchard, P., Budge, G. E., Chejanovsky, N., Chen, Y. P., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D. C., Ribière, M., Ryabov, E., de Smet, L., & van der Steen, J. J. M. (2013). Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 52, Issue 4). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>.
- Delaplane, K. S., van der Steen, J., & Guzmán-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52(1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., & Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 52, Issue 1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>.
- Dogantzis, K. A., Tiwari, T., Conflitti, I. M., Dey, A., Patch, H. M., Baumgarten, S. D., Ament, S. A., Brown, B. A., Grozinger, C. M., & Zayed, A. (2021). Thrice out of Asia and the adaptive radiation of the western honey bee. *Science Advances*, 7(49). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj2151>
- Downs, S. G. & Ratnieks, F. L. W. (2000). Adaptive shifts in honey bee (*Apis mellifera* L.) guarding behavior support predictions of the acceptance threshold model. In *Behavioral Ecology* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/beheco/11.3.326>.
- Engel, M. S. (1999). The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). *Journal of Hymenoptera Research*, 8(2), 165–196.
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. In *Insect Molecular Biology* (Issue 5).
- Fries, I. & Bommarco, R. (2007). Possible host-parasite adaptations in honey bees infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 38(6), 525–533. <https://doi.org/10.1051/apido:2007039>.

- Fries, I., Camazine, S., Sneyd, J. (1994). Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World*, 75(1), 5–28.
<https://doi.org/10.1080/0005772X.1994.11099190>.
- Fries, I., Imdorf, A., & Rosenkranz, P. (2006). Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie*, 37(5), 564–570. <https://doi.org/10.1051/apido:2006031>.
- 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, 1016–1021.
- Gebremedhn, H., Lefebvre, R., Chemurot, M., Amakpe, F., Amssalu, B., Smet, L. de, & de Graaf, D. C. (2025). Occurrence and allele frequencies of genetic variants associated with Varroa drone brood resistance (DBR) in African *Apis mellifera* subspecies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 209.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2025.108276>.
- Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., & Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. In *Apidologie* (Vol. 41, Issue 3, pp. 332–352). <https://doi.org/10.1051/apido/2010014>.
- Geospiza, Inc. (2004). *FinchTV* (Versão 1.4.0) [Software de computador]. Digital World Biology. <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>.
- Giacobino, A., Molineri, A., Bulacio Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Pacini, A., Salto, C., & Signorini, M. (2016). Key management practices to prevent high infestation levels of *Varroa destructor* in honey bee colonies at the beginning of the honey yield season. *Preventive Veterinary Medicine*, 131, 95–102.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.07.013>.
- Guedes, H. I. A. C. (2010). Avaliação dos padrões de diversidade genética nas populações de abelha melífera do território interior Português: a rusticidade posta à prova [Dissertação de mestrado, Instituto Politécnico de Bragança].
- Guichard, M., Dietemann, V., Neuditschko, M., & Dainat, B. (2020). Advances and perspectives in selecting resistance traits against the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees. In *Genetics Selection Evolution* (Vol. 52, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00591-1>.
- Guzmán-Novoa, E., Page Jr., R. E., Spangler, H. G., & Erickson Jr., E. H. (1999). A comparison of two assays to test the defensive behaviour of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 38(3-4), 205–209.
<https://doi.org/10.1080/00218839.1999.11101011>
- Guzmán-Novoa, E., Prieto-Merlos, D., Uribe-Rubio, J. L., & Hunt, G. J. (2003). Relative reliability of four field assays to test defensive behaviour of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 42(3), 42–46.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2003.11101088>.

- Hepburn, H. R., & Radloff, S. E. (1998). *Honeybees of Africa*. Springer-Verlag.
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-03604-4>.
- Ilyasov, R. A., Lee, M. Iyeol, Takahashi, J., Kwon, H. W., & Nikolenko, A. G. (2020). A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 27, Issue 12, pp. 3615–3621). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.001>.
- Kassambara, A. (2017). Survival Analysis Basics: Extracting Information from Event Data. Statistical Tools for High-throughput Data Analysis (STHDA). Recuperado de <https://www.sthda.com/english/wiki/survival-analysis-basics>.
- Kruitwagen, A., van Langevelde, F., van Dooremalen, C., & Blacqui re, T. (2017). Naturally selected honey bee (*Apis mellifera*) colonies resistant to *Varroa destructor* do not groom more intensively. *Journal of Apicultural Research*, 56(4), 354–365. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1329797>.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263.
- La Tienda del Apicultor. (s.d.). Centro de fecundação APIDEA [Imagem].
<https://www.latiendadelapicultor.com/pt/nucleos/centro-de-fecundacao-apidea.html>.
- Le Conte, Y., Ellis, M., & Ritter, W. (2010). Varroa mites and honey bee health: Can Varroa explain part of the colony losses? In *Apidologie* (Vol. 41, Issue 3, pp. 353–363). <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>.
- Locke, B. & Fries, I. (2011). Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie*, 42(4), 533–542.
<https://doi.org/10.1007/s13592-011-0029-5>.
- Locke, B. (2016). Natural Varroa mite-surviving *Apis mellifera* honeybee populations. In *Apidologie* (Vol. 47, Issue 3, pp. 467–482). Springer-Verlag France.
<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0412-8>.
- Martin, S. (1998). A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. In *Ecological Modelling* (Vol. 109).
[https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(98\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(98)00059-3).
- Martin, S. J. (2001). The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. In *Journal of Applied Ecology* (Vol. 38).
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x>.
- Meikle, W. G., & Holst, N. (2015). Application of continuous monitoring of honeybee colonies. In *Apidologie* (Vol. 46, Issue 1, pp. 10–22). Springer-Verlag France.
<https://doi.org/10.1007/s13592-014-0298-x>.
- Meikle, W. G., Weiss, M., & Stilwell, A. R. (2016). Monitoring colony phenology using within-day variability in continuous weight and temperature of honey bee hives. *Apidologie*, 47(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0370-1>.
- 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, 425–437.

- Mondet, F., Beaufrepaire, A., McAfee, A., Locke, B., Alaux, C., Blanchard, S., Danka, B., & le Conte, Y. (2020). Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 50, Issues 6–7, pp. 433–447). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>.
- Moro, A., Blacqui re, T., Panziera, D., Dietemann, V., & Neumann, P. (2021). Host-parasite co-evolution in real-time: Changes in honey bee resistance mechanisms and mite reproductive strategies. *Insects*, 12(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/insects12020120>.
- Neumann, P., & Blacqui re, T. (2017). The Darwin cure for apiculture? Natural selection and managed honeybee health. *Evolutionary Applications*, 10(3), 226–230. <https://doi.org/10.1111/eva.12448>.
- Neumann, P., & Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 49, Issue 1, pp. 1–6). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01>.
- Nouvian, M., Reinhard, J., & Giurfa, M. (2016). The defensive response of the honeybee *Apis mellifera*. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 219, Issue 22, pp. 3505–3517). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jeb.143016>.
- Panziera, D., van Langevelde, F., & Blacqui re, T. (2017). Varroa sensitive hygiene contributes to naturally selected varroa resistance in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 635–642. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1351860>.
- Pinto, M. A., Henriques, D., Neto, M., Guedes, H., Muñoz, I., Azevedo, J. C., & De La R a, P. (2013). Maternal diversity patterns of Ibero-Atlantic populations reveal further complexity of Iberian honeybees. In *Apidologie* (Vol. 44, Issue 4, pp. 430–439). <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0192-y>.
- Posit team. (2025). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.
- Promega. (2025). *Maxwell  RSC PureFood GMO and Authentication Kit: Technical Manual*. Promega Corporation, Madison, WI.
- R Core Team. (2025). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>.
- Ruttner, F. (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-72649-1>.
- Schäfer, M. O., Ritter, W., Pettis, J. S., & Neumann, P. (2011). Concurrent parasitism alters thermoregulation in honey bee (Hymenoptera: Apidae) winter clusters. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(3), 476–482. <https://doi.org/10.1603/AN10142>.

- Seeley, T. D. (2007). Honey bees of the Arnot Forest: A population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie*, 38(1), 19–29. <https://doi.org/10.1051/apido:2006055>.
- Sheppard, W. S., & Meixner, M. D. (2003). *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34(4), 367–375.
- Sokolov, N. A., Boots, M., & Bartlett, L. J. (2025). Avoiding the tragedies of parasite tolerance in Darwinian beekeeping. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 292, Issue 2040). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rspb.2024.2433>.
- Sumpter, D. J. T., & Martin, S. J. (2004). The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. In *Journal of Animal Ecology* (Vol. 73). [10.1111/j.1365-2656.2004.00776.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2004.00776.x).
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931–949 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature05260>.
- Therneau, T. M. (2024). A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.5-8. URL <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
- Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A. Y., Chantawannakul, P., & McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. In *Trends in Parasitology* (Vol. 36, Issue 7, pp. 592–606). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>.
- van Dooremalen, C., & van Langevelde, F. (2021). Can colony size of honeybees (*Apis mellifera*) be used as predictor for colony losses due to *Varroa destructor* during winter? *Agriculture (Switzerland)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/agriculture11060529>.
- van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J. J. M., van Langevelde, F., & Blacqui re, T. (2012). Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036285>.
- van Houwelingen, H. C. (2007). Dynamic Prediction by Landmarking in Event History Analysis. *Scandinavian Journal of Statistics*, 34(1), 70–85. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9469.2006.00529.x>.
- Villa, J. D., Danka, R. G., & Harris, J. W. (2009). Simplified methods of evaluating colonies for levels of Varroa Sensitive Hygiene (VSH). *Journal of Apicultural Research*, 48(3), 162–167. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.03>.
- Whitfield, C. W., Behura, S. K., Berlocher, S. H., Clark, A. G., Johnston, J. S., Sheppard, W. S., Smith, D. R., Suarez, A. V., Weaver, D., & Tsutsui, N. D. (2006). Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314, 642–645. <https://doi.org/10.1126/science.1132772>.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis* (2nd ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>.
- Zacepins, A., Kviesis, A., Stalidzans, E., Liepniece, M., & Meitalovs, J. (2016). Remote detection of the swarming of honey bee colonies by single-point temperature

monitoring. *Biosystems Engineering*, 148, 76–80.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.05.012>.

8. ANEXOS

8.1. Especificações técnicas do hardware (Base BEEP)

A aquisição telemétrica do peso da colmeia é efetuada por uma célula de carga de alta precisão (capacidade de 150 kg e resolução de 10 g). O equipamento dispõe de capacidade de expansão para até cinco sondas de temperatura digitais e integra um microfone dedicado à captação do espectro acústico da colónia, o qual atua como indicador de estados fisiológicos anómalos (e.g., enxameação ou orfandade).

A eficiência energética é assegurada por um microcontrolador de ultra baixo consumo, que mantém o sistema em hibernação profunda entre os ciclos de aquisição de 15 minutos (duração de 2 segundos de atividade). A salvaguarda da informação face a potenciais falhas de rede é garantida por uma memória *flash* local (64 MB) acoplada a um relógio de tempo real (RTC), capaz de reter medições com marcação temporal exata por até dois anos. A transmissão primária de dados para a nuvem utiliza o protocolo LoRaWAN (rádio de longo alcance e baixo consumo energético), suportado secundariamente por conectividade *Bluetooth* para calibração biométrica da balança e atualizações de *firmware*.

8.2. Detalhes sobre a interface digital do sistema BEEP

A interface BEEP *app* v3 constitui a plataforma digital de gestão telemétrica do sistema, estruturando as suas funcionalidades operacionais em quatro módulos principais: visão geral das colmeias, registo parametrizado de inspeções, visualização de dados e alertas e grupos colaborativos.

Na interface inicial é apresentada uma visão geral das colmeias. A aplicação permite uma organização hierárquica das colmeias, agrupando-as por apiários físicos ou grupos de colaboração. A nível individual, o *software* possibilita a organização da disposição no apiário e a modelação digital da arquitetura de cada colmeia por meio de um sistema de camadas (Figura 22). O usuário pode adicionar, remover ou reordenar visualmente componentes estruturais, como caixas de alimentação, excludores de rainha e diferentes alças, refletindo com exatidão a configuração física de cada colmeia. Além disso, é possível adicionar informações referentes à rainha (Figura 23), como número e cor de identificação, data de nascimento, dentre outras características.

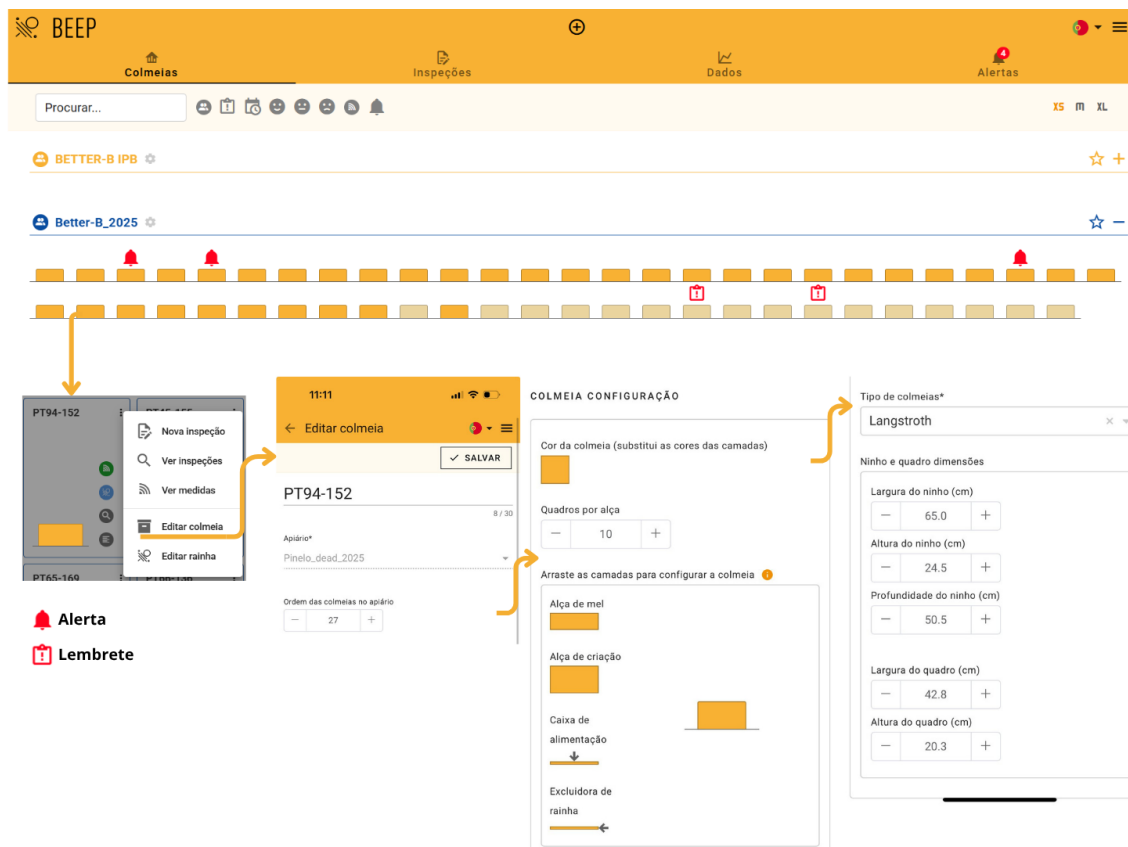


Figura 22: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização geral e as funcionalidades da aba “Editar colmeia”. As setas indicam a ordem de disposição das funcionalidades na aplicação.

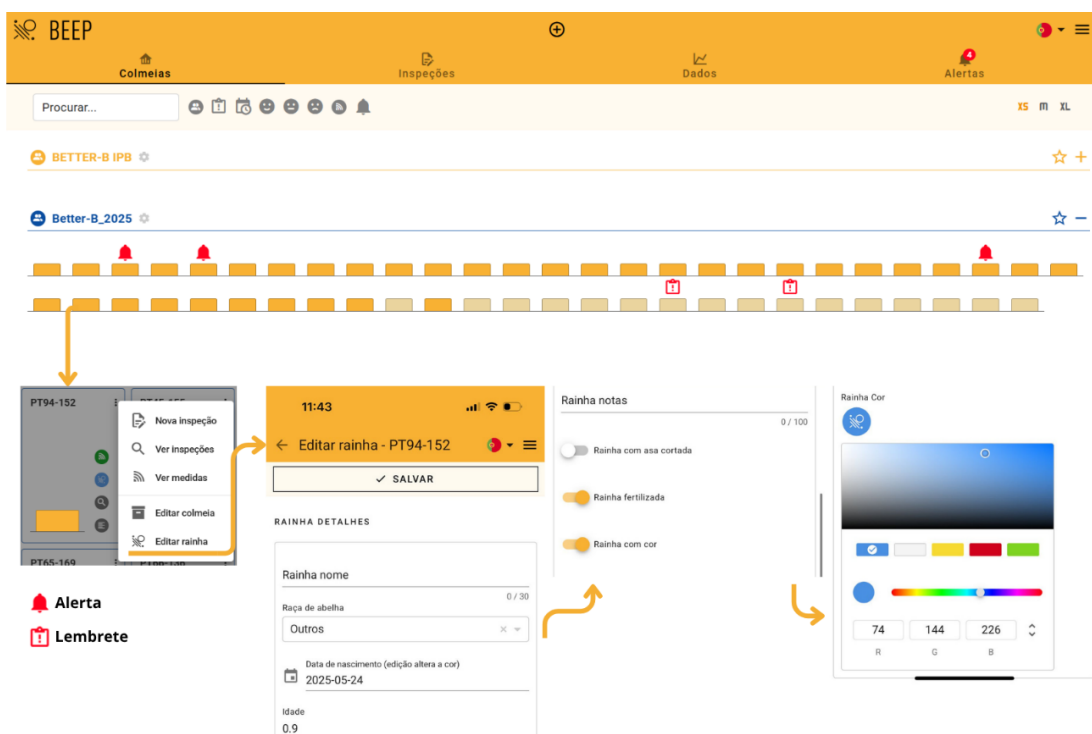


Figura 23: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização geral e as funcionalidades da aba “Editar rainha”. As setas indicam a ordem de disposição das funcionalidades na aplicação.

A substituição dos cadernos de campo tradicionais é garantida por um módulo de inspeções altamente parametrizado (Figura 24 e Figura 25). O sistema permite o registo detalhado de avaliações individuais ou a realização de inspeções em massa, aplicando a mesma observação ou maneo a múltiplas colmeias simultaneamente num determinado apiário. Cada registo categoriza o estado da colónia, permitindo a inclusão de notas, lembretes agendados e a sinalização visual de "impressão geral" (boa, neutra ou má) e "necessidade de atenção". As inspeções podem ser configuradas por uma lista de verificação auditável, com registos da colónia, comida, problemas, produção, clima, dentre outros. Qualquer alteração física na estrutura da colmeia é também automaticamente guardada como uma inspeção, mantendo um histórico cronológico e auditável.



Figura 24: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando a visualização do cabeçalho do histórico de inspeções de uma colmeia, na aba “Ver inspeções”.

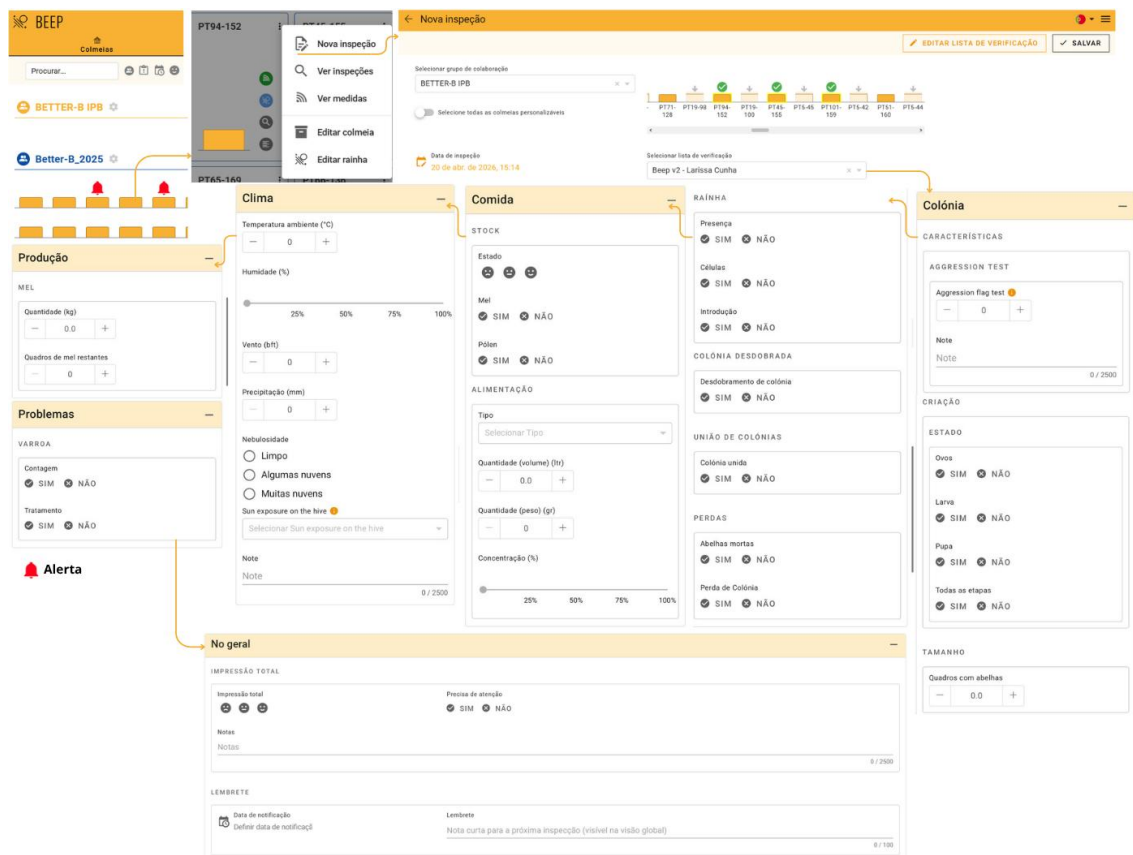


Figura 25: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização geral e as funcionalidades da aba “Nova inspeção”. As setas indicam a ordem de disposição das funcionalidades na aplicação.

As medições de peso, temperatura e informações sobre o aparelho (força do sinal e bateria) são organizadas em gráficos lineares. Já a representação dos dados acústicos (captados pelo microfone da base) se dá por um mapa de calor, no qual as frequências sonoras detetadas com maior incidência são ilustradas com cores mais quentes, facilitando o reconhecimento de padrões acústicos específicos da colônia. A aplicação gere igualmente um sistema de alertas, que notifica o utilizador mediante a ocorrência de anomalias nos dados dos sensores (Figura 27), que podem ter suas regras configuradas para status, via de notificação, nome e frequência. Os alertas configurados para as bases BEEP deste trabalho foram para baixa temperatura do ninho e da colmeia, enxameação, estabilidade da colmeia e roubos e sem medições.

As flutuações temporais de peso e temperatura são renderizadas em séries cronológicas lineares, enquanto os dados acústicos, quando aplicável, geram mapas de calor espectrais das frequências sonoras. Neste painel, o sistema mostra medições mais recentes obtidas e organiza os dados coletados em gráficos para cada categoria de medição (peso, temperatura, som e informações sobre o aparelho) (Figura 26). O usuário consegue personalizar o intervalo de medições que deseja visualizar e acessar informações detalhadas de cada medição ao colocar o cursor em um ponto do gráfico gerado. Para suportar projetos de grande escala ou gestão partilhada, o sistema integra a criação de "Grupos de Colaboração". Esta funcionalidade permite que propriedades de colmeias e apiários sejam partilhadas entre diferentes utilizadores, garantindo que múltiplos investigadores ou técnicos possam aceder, monitorizar e inserir dados nas mesmas unidades experimentais, consolidando a informação numa base de dados única.



Figura 26: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização das medições de uma base BEEP.



Figura 27: Interface digital da aplicação BEEP (BEEP app v3), ilustrando o painel de visualização de Alertas.

Ademais, o sistema BEEP disponibiliza duas modalidades distintas para a exportação da informação, desenhadas para separar os registos de manejo das leituras dos sensores, ambas em formato CSV. A primeira é a exportação de dados de manejo; esta função permite a extração de todo o histórico de registos qualitativos submetidos pelo utilizador. O sistema compila a informação num ficheiro Excel, segmentado em diferentes secções: dados pessoais, localizações físicas dos apiários, configuração das colmeias e o registo integral de todas as inspeções realizadas. A segunda modalidade é destinada à extração das leituras quantitativas captadas pela base BEEP, gerando ficheiros Excel na resolução temporal máxima. Para garantir a precisão da recolha, o investigador pode parametrizar a exportação seleccionando o dispositivo específico, a janela temporal (período), os tipos de medição pretendidos e o formato do separador de colunas do ficheiro. Todos os registos temporais provenientes da exportação dos sensores são exportados no fuso horário GMT (Tempo Médio de Greenwich), adotando a norma de formatação internacional de data e hora RFC 3339.