UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**MELHORAMENTO GENÉTICO E SELEÇÃO DE
COLMEIAS PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE
PRÓPOLIS VERDE NA APICULTURA COMERCIAL**

OMAR ARVEY MARTÍNEZ CARANTÓN

RIBEIRÃO PRETO
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**MELHORAMENTO GENÉTICO E SELEÇÃO DE COLMEIAS PARA AUMENTO
DA PRODUÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE NA APICULTURA COMERCIAL**

OMAR A. MARTÍNEZ CARANTÓN

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de
concentração: Genética.

RIBEIRÃO PRETO

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**MELHORAMENTO GENÉTICO E SELEÇÃO DE COLMEIAS PARA AUMENTO
DA PRODUÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE NA APICULTURA COMERCIAL**

OMAR A. MARTÍNEZ CARANTÓN

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de
concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. ADEMILSON ESPENCER EGEA SOARES

RIBEIRÃO PRETO
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Martínez, Omar Arvey Carantón

Melhoramento genético e seleção de colmeias para aumento da produção de própolis verde na apicultura comercial. Ribeirão Preto, 2012. 136p, il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares.

1. Seleção. 2. Comportamento higiênico. 3. Melhoramento genético. 4. Produção de rainhas. 5. Própolis verde.

MARTÍNEZ, O. A. C. **Melhoramento genético e seleção de colmeias para aumento da produção de própolis verde na apicultura comercial.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de concentração: Genética.

Aprovado em: _____, _____, _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Dedico a meus pais FLOR MARIA CARANTÓN e ALVARO
MARTÍNEZ PINILLA e de forma muito especial a meu irmão
OSCAR T. MARTÍNEZ.*

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta tese fosse realizada. Há, no entanto alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero.

De forma muito especial ao meu *ORIENTADOR* o Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares. Uma pessoa que sempre acreditou em mim e sempre me motivou durante este trabalho e durante toda minha estadia no Brasil. Grande Professor e amigo.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram, especialmente aos meus pais, Flor Maria Carantón e Alvaro Martínez Pinilla, que me deram não somente a vida, mas a educação e as condições de estudo que me permitiram chegar até aqui. Apesar da distância vocês foram peças fundamentais deste trabalho, sendo meu grande apoio na minha vida e a ajuda que eu preciso para percorrer os meus objetivos. Sem vocês nunca teria sido possível sonhar.

A meu único e inigualável irmão Oscar T. Martínez por ser a pessoa com quem mais aprendi na vida. Pessoa sem a qual eu não seria metade do que sou. Nossas diferenças, brigas, afeto gratuito e amor incondicional me ensinaram muito. Muito ... talvez mais do que ele possa imaginar.

À Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina, departamento de Genética, especialmente ao Bloco A, por permitirem a realização deste trabalho de pesquisa.

Aos Prof (s). Dr (s), Lionel Gonçalves, David De Jong, Zilá Luz Paulino Simões e Márcia Bitondi, por todos esses anos de trabalho e contínuo aprendizado.

Aos todos os colegas do Bloco A e Apilab, pela grande amizade e por todos os bons momentos que compartilhamos juntos.

A Dra. Karina Rosa Guidugli Lazzarini pela sua ajuda durante a elaboração deste documento.

A Marcela Aparecida Framartino Bezerra Laure, pela colaboração durante a fase final deste trabalho e grande amizade.

Ao técnico Jairo de Souza, por todos estes anos de trabalho, uma pessoa fundamental na realização deste trabalho e grande amigo.

Aos técnicos e grandes amigos, Luiz Roberto Aguiar, Roberto Mazzuco e Rogério Pereira. E à técnica de laboratório Vera Lucia Figueiredo.

A todas as secretarias do departamento e em especial a Susie Adriana Penha Nalon por toda a ajuda que sempre me ofereceu.

Às instituições CAPES e CNPQ, pela ajuda financeira que possibilitou a realização deste trabalho.

À empresa *NATUCENTRO Ind. e Apiários C.O. Ltda*, de forma muito especial a César Ramos Junior, pela confiança depositada durante a elaboração deste trabalho.

Ao pessoal da Natucentro, em especial aos apicultores Itamar Gomes de Carvalho e Ricardo Aparecido de Oliveira Costa pela ajuda prestada durante a execução do trabalho de campo. À secretária Sheila Estefânia Soares por toda a sua colaboração para o deslocamento e organização das visitas de coleta nos apiários e a Thiago Remiggi pela montagem das fotos da capa.

A minha namorada Vanessa Bonatti, ofereço um agradecimento mais do que especial, por ter vivenciado comigo passo a passo todos os detalhes deste trabalho, ter me ajudado, por ter me dado todo o apoio que necessitava nos momentos difíceis, todo carinho, respeito, por ter me aturado nos momentos de estresse, e por tornar minha vida cada dia mais feliz.

A todas as pessoas que de alguma forma me esqueço de citar nestes agradecimentos e que fizeram parte deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos

RESUMO

MARTÍNEZ, O. A. C. **Melhoramento genético e seleção de colmeias para aumento da produção de própolis verde na apicultura comercial.** 2012. 136 f. Tese de Doutorado – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O melhoramento genético de abelhas *Apis mellifera* é uma ferramenta essencial e de caráter obrigatório para o sucesso e desenvolvimento do setor apícola. O nosso objetivo principal foi estruturar, estabelecer e fixar um plano de seleção e melhoramento genético com o objetivo de incrementar a produção de própolis por colmeia. Iniciamos este trabalho através da avaliação das características de seleção de comportamento higiênico, taxa de infestação de *Varroa*, incidência de *Nosema* em um grupo inicial de 50 colmeias. Neste grupo 40,4% das colmeias apresentaram um comportamento higiênico acima de 90% com valores de $71 \pm 28,9 \pm 4,22$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP); taxa de infestação de *Varroa* $7,7 \pm 4,0 \pm 0,57$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) e uma média de incidência de *Nosema* < 300.000 esporos/abelha. Após estas avaliações, selecionamos três colmeias com os seguintes parâmetros: $>90\%$ de comportamento higiênico, $<5\%$ de taxa de infestação de *Varroa* e ausência do esporo de *Nosema*. Rainhas virgens dessas três linhagens genéticas foram produzidas e introduzidas nos apiários de produção. Na segunda fase analisamos um total de 263 colmeias, das quais 12,9% eram rainhas filhas das colmeias selecionadas na primeira geração. Avaliando esses apiários através do teste estatístico ANOVA encontramos diferenças estatísticas significantes entre as médias de produção de própolis para colmeias com duas, quatro e seis lâminas ($F = 25,4301$, $(p) < 0,05$). Observamos que 32% das colmeias produziram menos de 50 gramas, 37% entre 50 e 100 gramas e 31% mais de 100 gramas. Embora a troca de rainhas realizada nas colmeias utilizadas somente fosse de 18%, o resultado de produção das 34 rainhas selecionadas que foram aceitas mostrou que a produção destas colmeias, independentemente do apiário no qual estas rainhas foram introduzidas, foi sempre superior a média de produção individual de cada apiário. Do grupo de 263 colmeias selecionamos 60 colmeias segundo os resultados da coleta de própolis. Nestas observamos que o comportamento higiênico apresentou valores de $72,6 \pm 25,0 \pm$

3,9 (média $\pm$ DP $\pm$ EP); taxa de infestação de *Varroa* $7,2 \pm 3,0 \pm 0,5$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) e uma média de incidência de *Nosema* < 500.000 esporos/abelha. Após estas avaliações selecionamos dez colmeias com os seguintes parâmetros: $>95\%$ de comportamento higiênico, $<5\%$ de taxa de infestação de *Varroa* e ausência do esporo de *Nosema* para formar o grupo de rainhas selecionadas durante a segunda geração. Das dez colmeias selecionadas seis possuíam rainhas filhas da primeira geração, reforçando a importância de trabalhar com material previamente selecionado nas colmeias de produção. Apesar de termos selecionado somente a origem genética materna, pela introdução de rainhas virgens, nossos resultados de produção já mostraram ser promissores.

Palavras chave: seleção, comportamento higiênico, melhoramento genético, produção de rainhas, própolis verde.

ABSTRACT

MARTÍNEZ, O. A. C. **Genetic improvement and selection of colonies to increase production of green propolis in commercial beekeeping.** 2012. 136 f. PhD thesis – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Genetic improvement of honey bees (*Apis mellifera*) is an essential and important tool for the success and development of the beekeeping industry. Our main objective was to develop and set in motion a selection and breeding program to increase propolis production. We began by evaluating for hygienic behavior, *Varroa* infestation, and *Nosema* incidence in an initial group of 50 colonies. Twenty of these colonies had a hygienic behavior index above 90%; the mean rate was $71 \pm 28.9 \pm 4.22\%$ (mean $\pm$ SD $\pm$ SE). The mean rate of infestation with *Varroa* was $7.7 \pm 4.0 \pm 0.57$ mites per 100 adult bees (mean $\pm$ SD $\pm$ SE). The mean rate of infection with *Nosema* was <500,000 spores/bee. Following these evaluations, we selected three colonies with the following parameters: >90% hygienic behavior, <5% *Varroa* infestation and no *Nosema* spores. Virgin queens from these three colonies were produced and introduced into production apiaries. In the second phase, we analyzed 263 colonies, of which 12.9% had queens that were daughters of the three colonies selected in the first generation. Evaluating these apiaries through ANOVA, we found significant differences in propolis production for two, four and six pieces of propolis ($F = 25.4301$, $p < 0.05$). We observed that 32% of the colonies produced less than 50 grams, 37% between 50 and 100 grams, and 31% over 100 grams. Although queens were introduced into only 18% of the colonies, the production of the 34 colonies that had selected queens was always superior to the mean overall production, regardless of the apiary in which these queens were introduced. Among the 263 colonies, we selected 60 based on propolis production. The hygienic behavior values of these colonies was $72.6 \pm 25.0 \pm 3.9$ (mean $\pm$ SD $\pm$ SE), the rate *Varroa* infestation was $7.2 \pm 3.0 \pm 0.5$ (mean $\pm$ SD $\pm$ SE), and the mean rate of *Nosema* infection was <500,000 spores/bee. Following these evaluations, we selected 10 colonies with the following parameters: >95% hygienic behavior, <5% rate of *Varroa* infestation, and absence of *Nosema* spores to form the second generation selection group. Of the 10

selected colonies, six were headed by queens that were daughters of the first selected group, demonstrating the importance of working with previously selected material. Although we selected only the maternal genetic line by introducing virgin queens, the improvement in production has been promising.

Keywords: selection, hygienic behavior, breeding program, production of queens, green propolis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de dispersão das abelhas africanizadas nas Américas (Modificado Mistro <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figura 2. Relações familiares em uma colmeia de abelhas melíferas <i>Apis mellifera</i> . O esquema resalta o cruzamento da rainha com quatro zangões diferentes, dentro dos quais somente os identificados com (*) são irmãos (modificado Harbo e Rinderer, 1980).	27
Figura 3. Abelha <i>Apis mellifera</i> coletando própolis na planta <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Foto: Natucentro Propolis).	40
Figura 4. Cronograma de atividades em função do ciclo de produção de própolis..	56
Figura 5. Metodologia utilizada para realizar os testes de comportamento higiênico. A) Área utilizada para a realização do teste (perfuração) a qual continha menor número de células vazias. B) Área controle.....	58
Figura 6. Processo utilizado para a quantificação da taxa de infestação de <i>Varroa</i> em abelhas adultas. A) Identificação da amostra. B) Agitação. C) Contagem de varroas.	60
Figura 7. Metodologia utilizada para conhecer a taxa de infestação de <i>Nosema</i> . A) Abelhas a serem analisadas. B) Maceração em água destilada. C) Filtração em algodão. D) Amostra para contagem dos esporos.	61
Figura 8. Câmara de Neubauer e classificação dos quadrantes.....	62
Figura 9. Procedimento de inseminação instrumental. A) Preparação da rainha para a inseminação. B) Rainha inseminada já aceita na colmeia, a seta mostra a asa cortada após o procedimento de inseminação.	72
Figura 10. Localização dos apiários visitados durante a execução deste trabalho em relação à Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.	78
Figura 11. Comportamento higiênico durante as duas observações realizadas nos apiários de Jacuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.....	81
Figura 12. Taxa de infestação de <i>Varroa</i> em abelhas adultas expressa em porcentagem durante as duas coletas nos apiários de Jacuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	83

Figura 13. Quantidade estimada de esporos de <i>Nosema</i> /abelha durante as duas observações realizadas na região de Jacuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.....	85
Figura 14. Imagem obtida através dos pontos de GPS de cada um dos cinco apiários experimentais e a sua localização mediante o programa Google Earth.	87
Figura 15. Comportamento higiênico nas colmeias produtoras de própolis verde durante as duas observações agrupadas nos cinco apiários localizados na região de Bambuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	88
Figura 16. Comportamento higiênico em cada um dos cinco apiários experimentais localizados na região de Bambuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão..	89
Figura 17. Taxa de infestação de <i>Varroa</i> em abelhas adultas durante as duas observações nas colmeias localizadas na região de Bambuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	90
Figura 18. Taxa de infestação de <i>Varroa</i> nos cinco apiários experimentais. As barras em branco e cinza nos indicam a primeira e segunda observação respectivamente. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	91
Figura 19. Taxa de infestação de <i>Varroa</i> em abelhas adultas nos cinco apiários experimentais localizados na região de Bambuí. * Existem diferenças significativas entre estes apiários. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	92
Figura 20. Quantidade de esporos de <i>Nosema</i> /abelha durante as duas observações nas colmeias localizadas na região de Bambuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.....	93
Figura 21. Quantidade estimada de esporos de <i>Nosema</i> /abelha em abelhas adultas em cada um dos cinco apiários experimentais. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.....	94
Figura 22. Apiários de produção utilizados para a avaliação da coleta de própolis. Imagem obtida através dos pontos de GPS de cada apiário e a sua localização mediante o programa Google Earth.	96
Figura 23. Colmeia de produção de própolis verde, as setas indicam os sarrafos utilizados entre as partes moveis da colmeia, criando espaços laterais usados para a coleta de própolis.	98

Figura 24. Quantidade de colmeias nos dez apiários selecionados para a avaliação da produção de própolis e a quantidade de colmeias com duas, quatro ou seis lâminas em produção respectivamente.	99
Figura 25. Produção de própolis em gramas de acordo com a quantidade de lâminas produzidas por cada colmeia em produção. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	100
Figura 26. Produção de própolis durante as diferentes coletas. * Existem diferenças significativas entre estes grupos. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	101
Figura 27. Produção de própolis nos dez apiários. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	102
Figura 28. Altitude (metros) e produção de própolis (gramas) nos respectivos apiários de produção.	104
Figura 29. Avaliação do comportamento higiênico das colmeias utilizadas na segunda geração. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	107
Figura 30. Taxa de infestação de <i>Varroa</i> em abelhas adultas nas colmeias utilizadas na segunda geração. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	109
Figura 31. Quantidade de esporos de <i>Nosema</i> /abelha nas colmeias utilizadas na segunda geração. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.	110
Figura 32. Padrão de postura de uma rainha inseminada após de aproximadamente cinco meses da inseminação.	113
Figura 33. Quantidade de colmeias com rainhas selecionadas e não selecionadas. A. Total de colmeias utilizadas para a avaliação da produção de própolis por colmeia. B. Quantidade de colmeias selecionadas pela produção de própolis e utilizadas para a avaliação das três características de seleção. C. Quantidade de colmeias selecionadas para a criação das linhagens a utilizar na terceira geração.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de colmeias segundo seu comportamento higiênico na região de Jacuí, primeira observação.	80
Tabela 2. Porcentagem de colmeias segundo seu comportamento higiênico na região de Jacuí, segunda observação.	80
Tabela 3. Porcentagem de colmeias segundo a infestação de <i>Varroa</i> na região de Jacuí durante a primeira observação.	82
Tabela 4. Porcentagem de colmeias segundo a infestação de <i>Varroa</i> na região de Jacuí durante a segunda observação.	82
Tabela 5. Porcentagem de colmeias segundo seu comportamento higiênico na região de Bambuí, primeira seleção.....	87
Tabela 6. Características utilizadas na seleção do material e seus respectivos valores. (*) Indica as colmeias utilizadas e selecionadas como linhagens genéticas. (a) Colmeias que perderam as respectivas rainhas durante o transporte e introdução.	95
Tabela 7. Relação de colmeias com rainhas selecionadas e não selecionadas nos dez apiários utilizados para a avaliação da produção de própolis por colmeia.....	97
Tabela 8. Teste de comparações múltiplas de Tukey, indicando na primeira fileira em negrito as médias de produção de própolis para cada apiário (A-J). Os valores com * (valores p) indicam que existe diferença entre as médias dos apiários em comparação.....	102
Tabela 9. Porcentagem de colmeias segundo a produção de própolis verde durante as três observações.	103
Tabela 10. Valores da média de produção de própolis em gramas das rainhas filhas do material selecionado durante a primeira geração e as médias de produção de própolis e desvio padrão de cada apiário respectivamente..	105
Tabela 11. Porcentagem de colmeias segundo seu comportamento higiênico nas colmeias selecionadas na segunda geração.	107

Tabela 12. Características utilizadas na seleção do material a ser selecionado e seus respectivos valores..... 111

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 APICULTURA BRASILEIRA	21
1.2 ESTRUTURA GENÉTICA.....	25
1.3 MELHORAMENTO GENÉTICO.....	28
1.3.1 Inseminação Instrumental	35
1.4 PRÓPOLIS.....	38
1.5 CARACTERÍSTICAS DE SELEÇÃO.....	44
1.5.1 Comportamento Higiênico.....	45
1.5.2 Incidência de <i>Varroa</i>	45
1.5.3 Incidência de <i>Nosema</i>	46
1.6 CENÁRIO ATUAL	47
2. OBJETIVOS.....	50
2.1 OBJETIVO GERAL:	51
2.1.1 Objetivos Específicos:.....	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 ESTABELECIMENTO DE PARCERIAS	54
3.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SELEÇÃO A SEREM UTILIZADAS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO	54
3.2.1 Metodologias de avaliação das diferentes características de seleção	56
3.3 SELEÇÃO DO MATERIAL PARENTAL	63
3.3.1 Primeira Geração	63
3.3.2 Segunda Geração	64
3.4 AVALIAÇÃO DE MATERIAL NÃO SELECIONADO E PADRONIZAÇÃO DE PRÁTICAS DE MANEJO	67
3.5 REPLICAÇÃO DAS LINHAGENS GENÉTICAS	68
3.5.1 Produção de Rainhas.....	68
3.5.2 Padronização do Procedimento da inseminação	69
3.5 NÚCLEOS DE FECUNDAÇÃO.....	73
4. RESULTADOS.....	74
4.1 ESTABELECIMENTO DE PARCERIAS	75

4.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SELEÇÃO QUE FORAM UTILIZADAS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO	78
4.2.1 Avaliação do comportamento higiênico em colmeias produtoras de própolis verde na região de Jacuí.....	79
4.2.2 Avaliação da taxa de infestação de <i>Varroa</i> em abelhas adultas na região de Jacuí	81
4.2.3 Incidência de <i>Nosema</i> em colmeias produtoras de própolis verde na região de Jacuí e colmeias produtoras de mel na região de Ouro Fino	84
4.3 AVALIAÇÃO DAS COLMEIAS DOS APIÁRIOS DE BAMBUÍ E SELEÇÃO DAS MATRIZES DA PRIMEIRA GERAÇÃO	86
4.3.1 Avaliação do comportamento higiênico nas colmeias produtoras de própolis verde	87
4.3.2 Avaliação da taxa de infestação de <i>Varroa</i>	89
4.3.3 Avaliação da incidência de <i>Nosema</i>	92
4.3.4 Seleção de colmeias e determinação das linhagens genéticas	95
4.4 AVALIAÇÃO DAS COLMEIAS DOS APIÁRIOS E SELEÇÃO DAS MATRIZES DURANTE A SEGUNDA GERAÇÃO	95
4.4.1 Avaliação da produção de própolis verde por colmeia.....	98
4.4.2 Seleção do material segundo a produção de própolis	106
4.4.3 Avaliação do comportamento higiênico nas colmeias produtoras de própolis verde	106
4.4.4 Avaliação da taxa de infestação de <i>Varroa</i>	108
4.4.5 Avaliação da incidência de <i>Nosema</i>	109
4.4.6 Seleção de colmeias e determinação das linhagens genéticas	111
4.5 PROCEDIMENTO DE INSEMINAÇÃO	112
4.6 NÚCLEOS DE FECUNDAÇÃO	113
5. CONCLUSÕES	115
6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	121

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea, dividida em oito famílias com cerca de 20.000 espécies, das quais aproximadamente 3.000 podem ser encontradas no Brasil (Nogueira-Couto e Couto, 2006). Desde a antiguidade estes insetos têm sido valorizados por seus produtos e observadas quanto ao seu comportamento, gerando grande admiração pela humanidade. Existem registros históricos que revelam práticas apícolas há milhares de anos, pinturas em cavernas, folhas de papiros e imagens de abelhas cunhadas em algumas moedas da Grécia podem ser considerados os primeiros registros da apicultura.

As abelhas também possuem relevante função ecológica em todo o ecossistema. Considerada como principal polinizador tanto em ambientes naturais quanto em plantações comerciais, é responsável pela manutenção de populações selvagens de plantas e por aumentar a produção de alimento nos ambientes agrícolas. Apesar de toda sua importância, esse indispensável inseto encontra-se ameaçado em várias regiões do mundo (Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010).

As abelhas melíferas *Apis mellifera* são insetos sociais, no interior de suas colônias podemos encontrar três tipos de indivíduos (rainha, operárias e zangões), que possuem funções bem definidas para a sobrevivência e manutenção do enxame. Nas abelhas *Apis mellifera* a rainha é maior que as operárias, sua função biológica é a postura dos ovos, sendo também responsável pela harmonia, estabilidade social e coordenação dos trabalhos da colônia. Fisicamente seu corpo tem um formato mais fino e alongado em comparação às operárias e zangões, fato que facilita a sua localização ao interior da colmeia (Bevan, 1843).

Conhecida como abelha doméstica, a espécie *Apis mellifera* é considerada um dos insetos mais estudados no mundo. O mel produzido por estas abelhas faz parte do cardápio no mundo moderno, outros produtos apícolas como pólen, própolis, geleia real e cera também são úteis ao homem, embora talvez não sejam de caráter essencial para toda a humanidade. No entanto, as atividades de polinização realizadas pelas abelhas afetam a vida da maioria dos povos ao redor do mundo, já que são considerados polinizadores fundamentais para a agricultura. O valor estimado deste serviço é de 9,5% do valor da agricultura em 2005, equivalente a 153 bilhões de Euros (Gallai *et al.*, 2009). No entanto, a importância

da polinização e sua real dimensão para a vida em nosso planeta é quase sempre ofuscada pela dificuldade em calcular seu valor em áreas naturais e pela falta de estudos. Segundo Cox-Foster (2012) as estimativas referentes à polinização podem chegar até 14,6 bilhões de dólares nos Estados Unidos e 1,7 bilhões de dólares no Canadá.

Avaliações recentes baseadas de dados da FAO (*Food and Agricultural Organization*) confirmam que 33% da alimentação humana dependem, em algum grau, de plantas cultivadas polinizadas pelas abelhas (Klein *et al.*, 2007). Dentro desta abordagem entre agricultura/polinização, foram realizadas outras análises globais, utilizando-se a base de dados de culturas agrícolas da FAO. Os dados das exportações de alimentos entre 1961-2006 evidenciaram que o plantio de culturas agrícolas que dependem de polinizadores está crescendo mais rapidamente do que aquelas que não dependem, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A demanda crescente do uso de polinizadores para um maior rendimento econômico é um fato em países em desenvolvimento, especificamente nos cultivos agrícolas de frutas e verduras, tais países também incrementaram a área agrícola utilizada nos últimos anos (Aizen *et al.*, 2009). Dados da FAO revelaram um aumento de aproximadamente 45% da população mundial de colmeias manejadas nos últimos 50 anos, enquanto a agricultura que depende dos polinizadores obteve um crescimento muito superior (> 300%) (Aizen e Harder, 2009).

1.1 APICULTURA BRASILEIRA

A apicultura no Brasil está relacionada com momentos marcantes da agricultura brasileira e transformações significativas ocorreram desde sua implantação. A apicultura racional brasileira iniciou-se em 1845, quando colonizadores alemães trouxeram consigo abelhas *Apis mellifera mellifera* da Alemanha, introduzindo-as no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Entre 1870 e 1880, foram introduzidas as primeiras abelhas *Apis mellifera ligustica* no Sul do Brasil. Estas abelhas foram introduzidas com o objetivo de produzir cera branca

para a confecção de velas destinadas a fins religiosos, visto que a cera produzida pelas abelhas nativas (sem ferrão) possui cor marrom, por ser uma mistura de cera, resina e outros produtos (Nogueira Neto, 1962; Franco, 2007).

Na década de 50, o setor apícola observou uma enorme preocupação com a baixa produtividade de mel das abelhas *Apis mellifera* no Brasil. Embora o país fosse o maior da América do Sul e possuísse excelentes características tropicais propícias à exploração da apicultura, suas produções não eram dignas da situação. Na época, a Argentina apresentava grande destaque internacional, sendo considerada como um dos cinco maiores produtores mundiais de mel, ao passo que o Brasil não figurava nem entre os primeiros vinte países (Kerr, 1967).

Posteriormente durante os anos 50, um pesquisador brasileiro, Dr. Warwick Estevam Kerr, deu início ao que poderíamos reconhecer como os primeiros trabalhos brasileiros sobre melhoramento genético das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. O objetivo principal foi criar um híbrido a partir das abelhas europeias (*Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera mellifera*) já encontradas no Brasil e abelhas importadas de origem africana (*Apis mellifera scutellata*) (Kerr, 1957; 1967).

Em 1957 enxamearam 26 rainhas destas colônias, dando origem ao processo de africanização. A dispersão das abelhas africanizadas ao longo das Américas foi bem documentada, chegando a se dispersar entre 80 e 500 km por ano (Taylor, 1977; 1985; Rinderer, 1986). Colônias de abelhas africanizadas foram detectadas no sul do Texas em 1990 (Sugden e Williams, 1990), no sul do Arizona e na Califórnia no ano de 1995 (Vissscher *et al.*, 1997). Segundo Kerr e colaboradores (1982) a dispersão destas abelhas no sentido sul do continente americano foi completada no ano 1976, quando estas populações encontraram limites climáticos (temperatura) no sul da Argentina que as impediram de continuar se dispersando (Figura 1).

Figura 1. Processo de dispersão das abelhas africanizadas nas Américas (Modificado Mistro *et al.*, 2005).

Analisando populações de abelhas do Sul do Brasil e do Uruguai, Diniz *et al.* (2003) confirmaram a existência de uma zona de transição de populações de abelhas geneticamente distintas na parte sul do Brasil e Uruguai. Este limite para abelhas africanizadas pode ser localizado entre o paralelo 30° e 35° Sul. Algumas regiões da América do Sul ainda possuem abelhas 100% de origem europeia e isto se deve principalmente a algumas barreiras naturais e condições climáticas que têm impedido a chegada das abelhas africanizadas, como é o caso do Chile e o sul da Argentina.

Após todas estas subespécies se cruzarem livremente era esperado que seus descendentes compartilhassem igualmente o mesmo nicho ecológico e que apresentassem uma ampla variabilidade de características intermediárias entre as distintas subespécies, porém sem dominância marcante de uma única subespécie. No entanto, surpreendentemente, nos descendentes poli-híbridos houve uma significativa dominância dos genes africanos na maioria de suas características morfológicas, fisiológicas e comportamentais. Essa dominância trouxe, como consequência, um fenômeno internacionalmente conhecido como Africanização (Gonçalves, 1974; 1992; 2001; Michener, 1975; Schneider *et al.*, 2004).

Embora altamente produtiva, a abelha africanizada no início de sua dispersão causou um impacto muito grande devido a sua alta defensividade, comportamento de pilhagem exacerbado e tendência a enxameação. Os apicultores não tinham ideia de como manejá-las, e como consequência, muitos acabaram abandonando a atividade. Com o passar dos anos, novos estudos sobre a biologia, comportamento e melhoramento genético foram realizados; a apicultura nacional então passou por mudanças radicais e o apicultor foi se adaptando as abelhas africanizadas (Michener, 1975; Gonçalves, 1992; 2006; Winston, 1992; De Jong, 1996; Soares *et al.*, 1996).

Hoje, as abelhas africanizadas são as responsáveis pelo desenvolvimento apícola do país. A defensividade já passou a ser considerada, por muitos apicultores, como um forte aliado para se evitar roubo da sua produção. Além disso, estas abelhas possuem a vantagem de serem tolerantes a várias pragas e doenças que assolam a atividade apícola no mundo todo, fato que não têm acarretado impacto econômico no setor apícola do país. Foi assim que o Brasil conquistou posição de destaque no mercado externo, passando de 2400 toneladas de mel exportadas em 2001, para mais de 25 mil toneladas de mel exportadas em 2009. Porém, o ano apícola de 2012 está apresentando muitas variações nas exportações de mel, no mês de junho deste ano foi observada uma queda de 13,8% e 14,8% em peso líquido em relação a maio deste mesmo ano. Apesar das oscilações o Brasil exportou 1.681 toneladas de mel, gerando uma receita de US\$ 5,1 milhões. O valor médio pago pelo quilo do mel exportado foi de US\$ 3,06/kg (SEBRAE: <http://www.sebrae.com.br>).

1.2 ESTRUTURA GENÉTICA

Embora as abelhas *Apis mellifera* tenham sido propagadas pelo homem há 5.000 anos ou mais, há pouca evidência de algum melhoramento genético realizado, já que o homem nunca teve sucesso em domesticá-las ou em fazê-las mudar seus hábitos de acasalamento. Porém, parece evidente que a definição da domesticação é suficientemente ampla para incluir este inseto. Ao longo dos anos esta espécie foi dividida em raças, e todas essas raças apresentam uma variabilidade considerável. Aparentemente, elas são o produto de muitas gerações de acasalamentos ao acaso dentro das populações que foram parcialmente isoladas por barreiras geográficas. O homem pode ter tido alguma influência na fixação dessas raças pelo manejo destas colônias e alterando assim a frequência de certos fatores hereditários (Roberts e Mackensen 1951a).

A reprodução das abelhas *Apis mellifera* só foi melhor compreendida a partir de 1845, mas neste momento a seleção e melhoramento ainda não eram praticados devido à falta de conhecimento básico. Em 1851, quando este entendimento básico estava começando a ser amplamente aceito, Langstroth desenvolveu a colmeia de favos móveis. De repente os apicultores que conheciam a reprodução das abelhas, podiam manipular a colmeia e assim ter controle sobre a rainha e a área de cria. Estes eventos mudaram drasticamente o cenário apícola mundial, permitindo o crescimento deste setor (Harbo e Rinderer, 1980).

Nas abelhas o sexo é determinado pelo fato dos indivíduos serem haplóides ou diplóides: os embriões diplóides se desenvolvem a partir de ovócitos fertilizados, tornando-se fêmeas; e os embriões que se desenvolvem a partir de ovócitos não fertilizados, tornar-se-ão machos. O fato de determinada fêmea desenvolver-se ou não em uma forma reprodutiva, rainha, dependerá de como ela foi alimentada durante o desenvolvimento. Em um sistema haplo-diplóide de determinação sexual, chamado de partenogênese arrenótoca, os ovócitos são produzidos por meiose na rainha e os espermatozoides são produzidos por mitose no macho. Assim, ovócitos fertilizados (32 cromossomos) terão um número cromossômico diploide e ovócitos não fertilizados terão o número haploide (16 cromossomos). Assim, uma rainha

pode controlar a relação entre machos e fêmeas, regulando a proporção de ovócitos não fertilizados durante a postura. (Hachinohe e Onishi, 1952; Sanderson e Hall 1948; Rothenbuhler *et al.*, 1968; Roberts e Mackensen, 1951b).

As relações familiares dentro de uma colônia de abelhas diferem da maioria dos animais domésticos, características como: hábitos de acasalamento, estrutura social, e a genética dos zangões influenciam diretamente esta relação. A colônia de abelhas encontrada na natureza é um grupo familiar complexo, melhor descrito como uma superfamília. Esta superfamília consiste de: uma rainha/mãe, vários zangões/pais e operárias e zangões filhos destes cruzamentos. Dentro de uma superfamília podemos encontrar várias subfamílias, que simplesmente são um grupo de operárias filhas do mesmo zangão. Ao interior de cada subfamília encontramos operárias irmãs que estão mais estreitamente relacionadas do que irmãs normais de outros indivíduos, estas são chamadas de super irmãs e compartilham 75% de seus genes em comum por descendência. Já operárias pertencentes a subfamílias diferentes compartilham a mesma mãe e são frutos de pais diferentes, são denominadas meias irmãs e têm 25% de seus genes em comum por descendência. Por último podemos encontrar operárias filhas de zangões irmãos que se acasalaram com a mesma rainha, em tais casos, a relação destas operárias é de irmãs completas em vez de meias irmãs (Harbo e Rinderer, 1980) (Figura 2).

Figura 2. Relações familiares em uma colmeia de abelhas melíferas *Apis mellifera*. O esquema resalta o cruzamento da rainha com quatro zangões diferentes, dentro dos quais somente os identificados com (*) são irmãos (modificado Harbo e Rinderer, 1980).

Naturalmente todas as rainhas virgens se acasalam no ar, nunca no interior da colmeia. Este tipo de comportamento reprodutivo das rainhas desencorajou muitos apicultores a criarem abelhas como os demais animais domésticos, por esta razão, o controle dos acasalamentos das rainhas virgens foi um grande anseio dos apicultores por mais de um século antes dele ser alcançado. Entre 1860 e 1940, muitas tentativas de confinamento de rainhas virgens e zangões foram realizadas, estudos iniciais testaram o controle do acasalamento em espaços fechados como caixas de vidro, caixas, barracas ou estufas. Alguns reportaram sucessos, mas não puderam ser confirmados ou repetidos até os dias atuais. O isolamento de rainhas virgens e zangões em ilhas, grandes áreas abertas, grandes elevações ou em regiões isoladas tem sido bem sucedido e ainda é usado como método de controle dos acasalamentos, embora não seja prático para muitos apicultores e ineficiente para estudos genéticos e de criação intensiva (Harbo e Rinderer, 1980).

1.3 MELHORAMENTO GENÉTICO

A maioria dos alimentos consumidos pelo homem é produto de plantas e animais domesticados. O ser humano domesticou alguns animais quando teve contato direto com estes indivíduos. Domesticação implica, na maioria dos casos, uma completa fertilidade dos indivíduos sob novas e diferentes condições de vida. Nos tempos primitivos um animal não seria domesticado se ele não tivesse ou representasse uma utilidade ao homem. O melhoramento genético teve início quando o homem primitivo preservou as melhores sementes e os melhores animais para a reprodução, ao invés de consumi-los, assim os indivíduos superiores foram selecionados para formar parte das gerações seguintes. Gerações e gerações se passaram ao longo de milhares de anos, causando modificações em várias características originais dos seres vivos domesticados, chegando na maioria dos casos ao desenvolvimento de dezenas de raças (Darwin, 1868).

A produção animal resulta da ação conjunta das forças de origem genética e do ambiente. Níveis altos de produção só podem ser alcançados pelo melhoramento constante da composição genética dos animais, além das interações indivíduo/ambiente. A parte genética é a base para o estabelecimento de programas de melhoramento e é o fator que limita a capacidade de resposta dos animais aos processos seletivos, sendo indispensável maximizar a resposta de cada indivíduo, a qual é o resultado da parte genética com as condições ambientais. Dessa forma os níveis de produção dos indivíduos selecionados acabam sendo aspectos dependentes da utilização racional dessas duas forças (Campos, 2008).

De forma natural, as colônias de abelhas *Apis mellifera* substituem suas rainhas através da construção de várias células de rainha, embora exista uma produção extra de rainhas ao interior da colônia, o objetivo final é que reste apenas uma. A taxa de substituição da rainha, por conseguinte, parece ser um fator importante no ciclo de vida das abelhas, fatores como a idade da rainha e a qualidade são determinantes durante este processo (Tarpy *et al.*, 2000).

No início da apicultura, como atividade produtiva, as pessoas que começaram a criar abelhas desfrutaram dos benefícios de ter uma população grande e variável de abelhas com a qual trabalhar. Os apicultores rapidamente descobriram que as abelhas respondiam bem à seleção. Isto pode ser explicado devido ao fato dos seres humanos apenas estarem começando a modificar as abelhas através da seleção e produção controlada de rainhas (Harbo e Rinderer, 1980).

De forma controlada, o apicultor desenvolveu o conhecimento básico e prático para a produção de rainhas. As novas rainhas são produzidas a partir de larvas de operárias entre 12 a 24 horas de idade, estas larvas são transferidas em cúpulas preparadas especialmente para este fim. O desenvolvimento das novas rainhas é realizado ao interior de colmeias preparadas previamente. Rainhas recém-emergidas são introduzidas individualmente e cerca de duas semanas mais tarde, as rainhas jovens já terão se acasalado e iniciado a postura. Geralmente, as rainhas comercializadas são recém fecundadas e são vendidas em gaiolas individuais juntamente com operárias jovens (Tucker, 1980).

Desenvolver o costume de trocar as rainhas anualmente é um passo essencial a ser tomado na implantação de um programa de melhoramento genético produtivo. Desta forma podemos trocar em um pequeno intervalo de tempo toda a genética de cada colmeia. Aprender e aperfeiçoar as técnicas da criação de rainhas é tarefa de alguns apicultores os quais devem se especializar em fornecer rainhas a outros apicultores. A troca de rainhas traz muitas vantagens para os produtores, permitindo um monitoramento mais preciso das colmeias e respostas mais rápidas à seleção.

As características da rainha, tais como: longevidade, capacidade de postura, cria homogênea, resistência a doenças, entre outras, são de fundamental importância para manter o potencial de produção da colônia. Estas características podem ser usadas na seleção de futuras linhagens na produção comercial de mel, pólen, própolis, cera e geleia real (Seabra- Filho, 1996; Soares *et al.*, 1996; Cunha, 2002).

Em climas tropicais a rainha pode realizar postura o ano inteiro, mas seu desgaste é alto e por isso precisa ser trocada por uma nova ao final do período

produtivo. Rainhas velhas e de baixa qualidade genética refletem na baixa produtividade do apiário com colônias improdutivas, este tipo de colmeias aumenta o tempo de trabalho do apicultor e consequentemente os custos de produção, o que altera o preço final de produção em cada sistema produtivo (De Jong, 1996; Soares *et al.*, 1996; Pegoraro *et al.*, 1997). Por esse motivo é muito interessante que o apicultor mantenha em suas colônias rainhas jovens e com características desejadas, para que assim possam transmiti-las para sua prole e futuras rainhas (Alber, 1965; Cobey, 2003; Jianke *et al.*, 2005). Porém, a troca anual de rainhas ainda é uma prática pouco estabelecida pelo apicultor e no Brasil podemos considerar que mais de 90% dos apicultores não substituem suas rainhas. Isso se deve em parte ao tipo de manejo que é realizado nos apiários de produção e em parte ao desconhecimento das vantagens que existem na troca contínua das rainhas (De Jong, 1996; Soares *et al.*, 1996). Quando esta prática começa a ser desenvolvida é comum observar um aumento na produção dos apiários além da possibilidade de manter colônias fortes e homogêneas durante a maior parte do ano (Kostarelou-Demianidou *et al.*, 1995).

Existem vários tipos de seleção que podem ser aplicados ao melhoramento de abelhas. Porém, quatro estratégias de seleção têm mostrado os melhores resultados em populações fechadas, as quais também podem ser aplicadas as populações abertas com bons ganhos genéticos. Estas estratégias são: 1. Seleção dentro da família, na qual se escolhe a rainha filha com o valor fenotípico mais alto de cada rainha matriz; 2. Seleção em massa, onde as novas rainhas matrizes são escolhidas independentes de relações familiares; 3. Seleção em massa combinada com seleção para alta viabilidade da cria; 4. Seleção ao acaso para as novas matrizes (Omholt e Ådnøy, 1994).

Para dar início à seleção massal de colmeias de abelhas *Apis mellifera*, se aconselhava a formação de cooperativas, associações ou grupos de apicultores que pelo menos reunisse um mínimo de 2.000 e um ótimo de 5.000 colmeias, das quais seriam selecionadas 10% para a produção de rainhas e de zangões. Normalmente, na prática é observado que muitos dos apicultores utilizam no máximo cinco colmeias para produzir suas rainhas, sendo que efetivamente utilizam somente uma colmeia para esta finalidade (Kerr e Vencovsky, 1982). Manrique (2001) ressaltou

que a seleção em massa pode ser o primeiro método utilizado em populações que não sofreram nenhum melhoramento. Em abelhas africanizadas resulta em bons ganhos iniciais, graças a sua grande variabilidade genética, mas não deve ser realizado em populações pequenas.

Para acelerar o melhoramento genético Vencovsky e Kerr (1982) sugeriram três métodos diferentes em abelhas *Apis mellifera*:

- I. Uso de rainhas de colmeias selecionadas. Este é um método seletivo onde se identificam 25% das colmeias mais produtivas. Estas colmeias permaneceram inalteradas e serão utilizadas para a produção de rainhas virgens. Estas rainhas virgens serão introduzidas nas colmeias menos produtivas (25%) e substituirão as rainhas destas colmeias as quais foram previamente eliminadas. Neste método as rainhas virgens se acasalam com machos desconhecidos. O potencial de seleção estimando uma seleção de 25% das melhores colmeias pode levar a um aumento significativo de até 20% na produção.
- II. Uso de rainhas e zangões de colmeias selecionadas. Este método substitui uma proporção de rainhas nas colmeias menos produtivas como no método I e adicionalmente, se introduzem nas colmeias mais produtivas quadros de zangões os quais enriqueceram o conjunto de zangões disponíveis para a fecundação das rainhas virgens. O potencial de seleção estimando uma seleção de 25% das melhores colmeias e uma troca de pelo menos 50% dos zangões disponíveis para o acasalamento pode resultar em um aumento significativo de até 30% na produção, neste caso é atribuído um 10% referente à contribuição paterna dos indivíduos selecionados.
- III. Uso de zangões de colmeias selecionadas. Neste método são introduzidos nas colmeias mais produtivas quadros de zangões os quais enriqueceram o conjunto de zangões disponíveis para a fecundação das rainhas virgens. O potencial de seleção estimando uma troca de pelo menos 50% dos zangões disponíveis para o acasalamento pode resultar em um aumento significativo de até 10% na produção.

A implementação destas metodologias descritas não são sempre realizadas nem levadas à prática. Na maioria dos casos, existem muitas diferenças no número de colmeias por apicultor, portanto, os produtores com poucas colmeias estariam excluídos de realizarem o melhoramento genético. Também é inviável e ineficiente para um pequeno produtor destinar 25% das suas colmeias mais produtivas para produzirem machos, sabendo também que a probabilidade destes se acasalarem com rainhas do mesmo apiário é desconhecida.

A seleção dos machos deve ser feita a partir do desempenho de suas irmãs, já que a maioria das avaliações é realizada nas operárias da colmeia (Vencovsky e Kerr, 1982; Manrique, 2001; Fert 2008). Segundo Fert (2010) a produção de zangões tem a finalidade de produzir machos selecionados e de boa qualidade em uma maior quantidade, este mesmo autor recomenda produzir mais zangões que os necessários com o objetivo de saturar as áreas de congregação com material selecionado e assim aumentar a probabilidade de acasalamentos com estes indivíduos.

No Brasil existem vários trabalhos de melhoramento genético. Alves-Junior e colaboradores (2008) realizaram a seleção de rainhas durante três anos consecutivos, a partir de matrizes com produção acima de 50 quilos de mel. No primeiro ano com 243 colmeias, obtiveram 11.154 kg/mel, média de 45,9 kg e produção de até 82 kg/colmeia; no segundo ano devido às chuvas durante as épocas de floração estes valores foram inferiores, com 157 colmeias, 4.429 kg/mel, média de 28,2 kg e produção de até 60 kg/colmeia, já no terceiro ano com 368 colmeias obteve-se 11.862 kg/mel com média de 50,03 kg e produção de até 90 e 114 kg/colmeia, o que torna o processo economicamente rentável. Comparando-se a produção de mel das 243 colmeias da primeira geração (11.154 kg), com a estimativa de produção anual do país (15 kg/colmeia) obteve-se um ganho de produtividade de 67,3%, o ganho para a segunda e terceira geração foi de 46,83% e 53,46% respectivamente. Este trabalho confirma e demonstra que o processo de substituição de rainhas nas colmeias com baixa produtividade por outras oriundas de um processo de seleção traz, ao produtor, um aumento na produção. Um ganho final bastante significativo, agregando valores substanciais a sua renda familiar. Assim, os autores recomendam a divulgação e a adoção desta técnica através de

capacitações dos apicultores relacionados o que pode propiciar uma melhor qualidade de vida dessas famílias.

Outros trabalhos em abelhas africanizadas tiveram como objetivo principal a avaliação de diferentes características para seleção. Faquinello (2007) analisou as estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para produção de geleia real em abelhas africanizadas. Ao analisar as características de porcentagem de aceitação (%), produção de geleia real por mini-recrã (g), produção de geleia real por cúpula (mg) e consumo de suplemento do pólen (g), como possíveis características para seleção, a autora encontrou que a seleção direta com base na produção de geleia real por mini-recrã é a característica que melhor responde a seleção em programas de melhoramento genético para a produção de geleia real.

Ao avaliar algumas características de produção e suas correlações e herdabilidades com algumas características comportamentais foi observado que podemos utilizar algumas características comportamentais que estão diretamente correlacionadas com a produção e que apresentam altos valores de herdabilidade. Foi encontrada uma correlação positiva entre o comportamento higiênico e a produção de mel, também foram observados altos coeficientes de herdabilidade para as características de produção de própolis e para algumas características de comportamento defensivo. Desse modo, este estudo confirma a utilização de diferentes características como critério da seleção do material parental (Pickler, 2009).

O melhoramento genético de abelhas apresenta algumas diferenças em relação a outras espécies animais, estimativas como herdabilidade, semelhança entre parentes e outras estimativas são difíceis de serem obtidas tendo em vista que as colônias apresentam uma estrutura genética interna que dificulta tal procedimento. Nos acasalamentos que ocorrem de forma natural desconhecemos a origem do material que acasalou com as rainhas nos voos de fecundação, além disto, os acasalamentos múltiplos também afetam a predição destas estimativas. Soma-se ainda a condição haplo-diploide das abelhas e dessa forma, pedigrees de abelhas podem se tornar complicados, e as estimativas de endogamia deveriam ser calculadas individualmente. Em alguns programas de melhoramento, especialmente

aqueles que envolvem endocruzamento intensivo, só um ou uns poucos tipos de acasalamento são usados (Page e Laidlaw, 1986).

A quantidade de variabilidade genética dentro de uma população é importante na criação de animais. Mais variabilidade resulta em maior potencial de resposta significativa à seleção e em um melhoramento seletivo muito mais rápido (Page e Kerr, 1991). Os fundamentos da seleção baseiam-se nas disciplinas matemáticas da genética quantitativa e de populações. O ponto de partida básico para compreender a seleção é o conceito do fenótipo (as características de um animal que podem ser observadas), o qual resulta das influências da genética do animal, do ambiente onde o animal se encontra e as interações entre estes dois fatores. Este conceito pode ser estendido a populações de animais. A variação de genótipos pode ser subdividida em vários tipos diferentes de eventos genéticos. A variância devido a eventos genéticos aditivos é especialmente importante, e é a causa genética principal da semelhança entre parentes e, portanto, o determinante principal de quão facilmente uma população pode ser melhorada pela seleção (Rinderer, 1986).

A medida acurada das características é essencial para o sucesso do programa de seleção. A via mais importante para incrementar a acurácia é tomar medidas nas abelhas que se encontram em um ambiente comum e com histórias de manejo semelhante. O grupo de colônias deve ser analisado a partir de um ponto comum no tempo para o início dos registros. Posteriormente, as características de seleção serão avaliadas quando as condições ambientais permitam uma expressão completa da capacidade de cada colmeia individualmente. Por exemplo, a avaliação da produção de mel deve ser feita durante condições de fluxo de néctar que, são condições típicas onde se espera que o estoque melhore demonstrando seu melhor desempenho. Medidas mais precisas ou medidas repetidas como método para aumentar a precisão pode melhorar a acurácia (Rinderer, 1986).

De forma geral, o setor apícola requer com frequência a medida de características no campo. Sem dúvida, as condições de campo incrementam a variância ambiental. A menos que se dê atenção à redução desta variação, as medidas podem ser insuficientemente precisas e a seleção pode não produzir nenhuma melhora significativa. De fato, a herdabilidade pode ser reduzida

substancialmente (Rinderer, 1986). A herdabilidade, h^2 , é uma das mais importantes propriedades de uma característica quantitativa. Representa o grau de relação da variância genética aditiva com o total ou variância fenotípica: Isto é, a proporção da variação total que é atribuível a efeitos aditivos e os efeitos médios de todos os genes que afetam uma característica. O tamanho de h^2 indica a similaridade de organismos relacionados. A função mais importante de h^2 no estudo de características quantitativas é que ela pode prever quão confiável é o valor fenotípico como guia para o valor genético real do indivíduo. Isto é assim porque a h^2 estima a proporção da variância fenotípica que é atribuível a causas genéticas sensíveis à seleção (Collins, 1986).

$$h^2 = VA/VP$$

1.3.1 Inseminação Instrumental

A inseminação instrumental é uma técnica na qual se transfere instrumentalmente espermatozoides do macho para o sistema reprodutivo da fêmea e amplamente praticada em vertebrados para criação de animais com fins econômicos ou para conservação biológica. Porém, em invertebrados só alguns poucos casos foram bem sucedidos (Laidlaw, 2000). Diferentes métodos de controle reprodutivo podem aumentar a taxa de melhoramento genético, mas eles têm o potencial de causar uma maior endogamia, dentro destes métodos a inseminação artificial pode produzir aumento substancial na taxa de melhoramento genético mantendo aceitáveis as taxas de endogamia, assim a inseminação mostrou-se um método que poderia controlar e resolver estes problemas em particular (Nicholas, 1996).

No programa de melhoramento genético de abelhas *Apis mellifera* é necessário o uso de ferramentas como a inseminação instrumental, técnica que permite aumentar os níveis produtivos sem usar os métodos quantitativos tradicionais. Esta ferramenta é essencial para o pesquisador que precisa de cruzamentos específicos e para o apicultor envolvido em um programa de melhoramento genético. As diferentes contribuições de especialistas e cientistas nos

últimos 60 anos possibilitaram o aperfeiçoamento da técnica (Cobey, 2007; Schley, 2008). Esta técnica surgiu em 1920 e foi aperfeiçoada nas décadas de 1940 e 1950 oferecendo ao setor apícola o total controle genético dos cruzamentos nas abelhas *Apis mellifera* (Cobey, 1983; Laidlaw, 1987). A técnica agiliza os programas de melhoramento genético porque permite o controle dos cruzamentos, propiciando a formação de matrizes de boa qualidade permitindo um completo controle da contribuição parental. A inseminação permite a seleção, desenvolvimento e manutenção de características desejadas, sejam elas características produtivas, de comportamento ou de tolerância ou resistência a diferentes doenças, justificando assim a utilização desta tecnologia em programas comerciais de criação e melhoramento de abelhas *Apis mellifera* (Flores *et al.*, 1998; Cobey e Schley, 2002).

A inseminação é uma técnica de melhoramento valiosa que possibilita a seleção de características desejáveis. Permite tipos de acasalamento que não são possíveis com o acasalamento natural como, por exemplo, o acasalamento com um só macho ou com poucos machos específicos, o acasalamento entre rainhas e machos mutantes e o cruzamento de uma rainha com sua própria progênie de machos. Naturalmente, as rainhas podem se acasalar com machos de origem desconhecida e produzirem operárias com características indesejáveis. A inseminação permite que o apicultor se beneficie de programas de melhoramento nos quais se pode manter um isolamento genético total que permite produzir rainhas consistentes e de alta qualidade, selecionadas para uma característica específica e com uma alta variabilidade genética (Cobey, 2007).

Nas abelhas um zangão produz entre seis e dez milhões de espermatozoides o que corresponde a 1,5 microlitros de sêmen aproximadamente. As rainhas se acasalam naturalmente com mais de 10 machos, os quais transferem mais de 100 milhões de espermatozoides no voo de acasalamento. Porém, só de três a cinco milhões destes migram por meios passivos e ativos para a espermateca. Na técnica de inseminação são depositados oito microlitros de sêmen nos ovidutos médios tentando simular a quantidade depositada naturalmente no acasalamento natural, esta quantidade tem se mostrado suficiente para encher completamente a espermateca das rainhas virgens (Page e Laidlaw, 2000).

A técnica tem a flexibilidade necessária para realizar muitos tipos de acasalamentos controlados. Porém, uns dos mais utilizados é a inseminação de rainhas com uma mistura uniforme de espermatozoides. Entre outras possibilidades, esta técnica pode ser usada para manter a heterogeneidade genética no programa de melhoramento ou para produzir inseminações uniformes, mais heterogêneas geneticamente, em um grupo determinado de rainhas (Harbo, 1986).

Hoje as melhorias na técnica e no desenho dos equipamentos possibilitaram que o procedimento se tornasse mais fácil e prático. Assim, é possível se conseguir altas taxas de sucesso e níveis de desempenho das rainhas inseminadas similares aos das rainhas fecundadas naturalmente. Diferenças entre rainhas acasaladas naturalmente e rainhas inseminadas devem-se principalmente a quantidade de sêmen utilizado, idade das rainhas, métodos de introdução, cuidados pré e pós-inseminação (Cobey, 2007).

A inseminação de rainhas não é difícil para aqueles que estão familiarizados com o uso de estereomicroscópios. Além disso, é necessário acrescentar que o equipamento seja adequado, estéril, preciso e que o técnico tenha uma boa habilidade e delicadeza durante a execução desta técnica. Um interesse genuíno é muito útil, mas deve ser enfatizado que o sucesso depende da precisão e de uma esterilidade estrita do material utilizado durante este processo (Laidlaw, 2000).

Alguns complementos importantes a esta técnica na apicultura especializada e que geralmente são ignorados por iniciantes são: criação e maturação dos machos e das rainhas; cuidados na pré e pós-inseminação das rainhas; e a introdução adequada das rainhas inseminadas. O êxito depende de um cuidadoso planejamento de todos estes processos (Cobey, 2007). Adicionalmente, a produção de zangões é uma prática fundamental no programa de inseminação, já que garante a qualidade e a quantidade de zangões imprescindíveis no processo (Fert, 2008).

Em países industrializados esta técnica está muito bem desenvolvida a ponto de praticamente não existirem diferenças entre as rainhas acasaladas naturalmente e as rainhas inseminadas, obtendo assim colônias altamente produtivas as quais podem ser avaliadas diretamente (Al-Qarni *et al.*, 2003). Experiências feitas no Brasil com *Apis mellifera* têm conseguido colônias que variam de um núcleo de cinco favos até colmeias com uma câmara de cria e dez favos, com rainhas que

realizaram postura por quase um ano (Observações pessoais). Porém, Moreno (2006) estabeleceu uma metodologia e protocolo da técnica de inseminação, observando que rainhas inseminadas formam colônias fortes e que podem ser testadas em campo com o objetivo de testar a sua produção.

A técnica de inseminação permite que todo o genótipo materno e paterno seja selecionado e que as colônias com rainhas inseminadas sejam avaliadas diretamente sem a interferência da alta variabilidade da sua progênie. Colônias produtivas com rainhas inseminadas são importantes para o estudo da herança dos caracteres como, por exemplo, a produção de mel, própolis e outros produtos das abelhas (Page e Laidlaw, 1986).

1.4 PRÓPOLIS

Um possível mecanismo de imunização social em abelhas é a coleta e uso no interior da colmeia de resinas ou secreções vegetais que apresentam diversas propriedades antimicrobianas. As abelhas *Apis mellifera* coletam diferentes resinas ou secreções de várias espécies vegetais que usam ao interior da colônia e é denominada na apicultura como própolis. A coleta de componentes antimicrobianos (resinas) a partir do ambiente externo e sua incorporação na arquitetura do ninho como própolis é uma área de estudo interessante, mas relativamente pouco explorada na defesa contra agentes patógenos ao interior de colônias de insetos sociais (Simone-Finstrom e Spivak, 2010).

A própolis é um dos principais produtos que podemos obter da colmeia, juntamente com mel, pólen, cera, veneno e geleia real. É uma substância resinosa, coletada por diversas abelhas, nas abelhas *Apis mellifera*, é coletada de diversas partes da planta como brotos, botões florais e exsudados resinosos. A sua composição química é bastante complexa e variada, de modo geral, contém 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos e vitaminas do complexo B (Ghisalberti, 1979).

Comercialmente a própolis tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Sua inserção se deve, essencialmente, às constatações das inúmeras atividades biológicas atribuídas aos seus principais componentes químicos. Segundo Pereira e colaboradores (2002) o número de pesquisas sobre própolis ao nível internacional teve um aumento exponencial nas décadas de 80 e 90, o interesse global neste produto é devido à importância dos seus componentes químicos, como também, ao preço alcançado no mercado apícola.

No Brasil podemos encontrar uma ampla variabilidade de própolis, as quais foram classificadas em 12 grupos com base nas diferentes características físico-químicas. Cinco encontram-se no sul do Brasil (grupo 3), seis são encontradas no nordeste do Brasil (grupo 6) e um é encontrado no sudeste do Brasil (grupo 12). As origens vegetais destes grupos foram motivo de diversos estudos e utilizando análises químicas se concluiu que as origens botânicas principais destas própolis foram *Populus sp*, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente (Park *et al.*, 2002a).

A composição química de cada tipo de própolis depende principalmente da flora da região onde é produzida e da época do ano em que é coletada (Marcucci, 1995; Marcucci, 1999; Park *et al.*, 2002; Fuentes *et al.*, 1990; Pereira *et al.*, 2002; Gutierrez-gonçalves *et al.*, 2009). A própolis cuja origem botânica é superior a 90% da fonte botânica do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) é conhecida nacional e internacionalmente como própolis verde (Green propolis), Esta própolis é coletada pelas abelhas africanizadas especificamente no broto desta planta (Oliveira e Bastos, 1998; Bankova *et al.*, 1999; Bastos *et al.*, 2000; Bastos 2001; Park *et al.*, 2002b).

Pertencente à família Asteraceae, o gênero *Baccharis* está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México. No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizadas na região sudeste do País, das quais em torno de 30 apresentam estudos de atividade biológica. De modo geral, entre os principais compostos encontramos flavonoides, clerodanos e labdanos, embora também encontremos com certa frequência a presença de kauranos, triterpenos,

germacreno, ácidos cumáricos, tricotecenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontra-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (Verdi *et al.*, 2005). Segundo Bastos *et al.* (2011) esta própolis é produzida fundamentalmente no sul, leste, centro e zona da mata de Minas Gerais.

As folhas de *Baccharis dracunculifolia* são simples e alternas, medem em média 30 mm de comprimento. Possuem consistência herbácea, coloração verde-escura, forma lanceolada, base e ápice agudos. Tratam-se ainda de folhas completas, peninérvias e possuem bordos inteiros com porções denteadas (Pegorini *et al.*, 2008), na Figura 3 podemos ver uma abelha *Apis mellifera* coletando própolis nesta planta.

Figura 3. Abelha *Apis mellifera* coletando própolis na planta *Baccharis dracunculifolia* (Foto: Natucentro Propolis).

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) estabeleceu no mês de maio a primeira denominação de origem para a própolis verde no Brasil, através da Portaria nº 1138 de 2011. Cento e dois municípios mineiros localizados em áreas de produção dos associados da Federação Mineira de Apicultura (FEMAP-MG) compõe a Região da Própolis Verde, denominação que permite conquistar novos

mercados e garante aos apicultores da região produzir um produto com excelente competitividade.

Os 102 municípios que fazem parte inicial da denominação de origem para própolis verde são: Abaeté, Alvinópolis, Acaiaca, Alto Caparaó, Andrelândia, Antônio dias, Arcos, Bambuí, Barbacena, Barão de Cocais, Barra Longa, Bela Vista de Minas, Belo Horizonte, Belo Oriente, Belo Vale, Betim, Bias Fortes, Boa Esperança, Bom Despacho, Bom Jardim, Bom Jesus do Amparo, Bonfim, Brejo Bonito, Brumadinho, Cabo Verde, Cachoeira da Prata, Caetanópolis, Caeté, Campanha, Campo Belo, Campos Gerais, Candeias, Caratinga, Carmo da Mata, Carmo do Paraíba, Carvalhos, Castro, Catas Altas, Catas Altas da Noruega, Caxambu, Citrolândia, Cláudio, Coluna, Conselheiro Lafaiete, Contagem, Coronel Fabriciano, Cristiano Ottoni, Crucilândia, Curvelo, Diogo de Vasconcelos, Dionísio, Divinópolis, Dom Joaquim, Dom Silvério, Entre Rios, Esmeraldas, Ferros, Florestal, Formiga, Guaraciaba, Guimarânia, Guaxupé, Ibirité, Ipatinga, Itabira, Itaguara, Itamonte, Itapeçerica, Itatiaiuçu, Itaúna, Jaboticatubas, Jeceaba, João Monlevade, Lagoa Santa, Lamim, Mariana, Marileia, Mateus Leme, Matias Barbosa, Matipó, Matozinhos, Moeda, Muzambinho, Nepomuceno, Nova Lima, Nova Era, Nova União, Oliveira, Ouro Branco, Ouro Preto, Pará de Minas, Passa Quatro, Passos, Passa Tempo, Patos de Minas, Patrocínio, Piedade Paraopeba, Piedade do Rio Grande, Pimenta, Piracema, Pitangui, Piumhi, Ponte Nova, Prado, Presidente Bernardes, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santa Bárbara, Santa Rita de Caldas, Santa Rita de Ibitipoca, Santana do Jacaré, Santa Luzia, São Gonçalo do Rio Abaixo, São Gonçalo do Sapucaí, São João da Boa Vista, São João del Rey, São José da Varginha, São Pedro da União, São Tiago, Senhora de Oliveira, Rio Manso, Ritópolis, Rezende Costa, Tavares, Timóteo, Três Corações, Três Pontas, Varginha, Vespasiano, Viçosa. Novos estudos estão sendo feitos em outros municípios do estado com a finalidade de incrementar esta lista e confirmar a produção deste tipo de própolis em novas áreas de estudo.

Atualmente a própolis verde coletada na planta *Baccharis dracunculifolia* é um produto tipicamente brasileiro. Devido ao fato de ser altamente eficaz no combate a uma série de microrganismos, há um amplo número de pesquisas que testam e revelam a qualidade e importância deste tipo de própolis (Marcucci, 1995,

1996; Park *et al.*, 2000; Marcucci *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Longhini *et al.*, 2007; Packer e Luz, 2007, Sforcin, 2007).

Hoje por meio de diferentes análises químicos podemos identificar os diferentes componentes dos extratos produzidos a partir desta planta. Na composição do extrato em etanol encontramos principalmente ácido cinâmico e derivados, flavonóides, ácido benzoico e alguns benzoatos, aromáticos não hidroxilados, e acidose ésteres alifáticos. Os constituintes principais do extrato em diclorometano foram: compostos prenilados, alcanos e terpenóides. Isto nos fornece uma completa e inequívoca composição química da amostra de própolis verde, servindo como impressão digital para as amostras de própolis analisadas (Chang *et al.*, 2008).

Curiosamente, poucos estudos examinaram as propriedades antimicrobianas das própolis contra patógenos de abelhas *Apis mellifera* ou suas respostas imunes. É interessante determinar se a sua presença direta ou indiretamente na colmeia afeta determinado patógeno ou parasita. Existe alguma evidência de que ele pode servir como um mecanismo natural contra a resistência da doença. Um recente estudo comparou a atividade antibacteriana de extratos de própolis a partir de própolis de Minnesota dos Estados Unidos e do sudeste do Brasil e descobriu que a própolis verde do Brasil apresentou uma atividade significativamente maior a cepas de *Paenibacillus larvae* in vitro em comparação com própolis de clima temperado do norte de Minnesota (Bastos *et al.*, 2008).

Outros estudos testaram os efeitos da própolis no sucesso reprodutivo de *Varroa destructor* em colônias produtivas. Colmeias com taxas de infestação estabelecidas foram tratadas pela pintura das paredes internas com extratos de própolis (coletados de colmeias nos Estados Unidos e Brasil) ou por pulverização dos favos vazios com o extrato de própolis. Quadros contendo pupas em desenvolvimento infestadas com os ácaros parasitas foram removidos e a taxa de infestações no interior das células foi calculada. Os resultados preliminares sugerem que os tratamentos com a própolis reduzem o número de fêmeas (*Varroa*) maduras produzidas dentro uma única célula. Estas alternativas de controle natural reduziria a necessidade de produtos químicos que atualmente são utilizados como os principais tratamentos contra *Varroa destructor* (Simone-Finstrom e Spivak, 2010).

Existem muitos outros exemplos que analisam a própolis verde e seus componentes químicos, o resultado da importância dos seus componentes principais afetou o mercado internacional deste produto, valorizando o preço de mercado e incentivando a sua produção e comércio. Atualmente somente o Japão movimenta entorno de setecentos milhões de dólares ao ano na importação da própolis verde (Informações pessoais).

Existem várias metodologias que já foram utilizadas pelos apicultores visando uma melhor coleta e produção de própolis por colmeia. Entretanto, a produção de própolis pode variar conforme a técnica de coleta utilizada pelo apicultor (Moura, 2001; Thimann e Manrique, 2002; Lima, 2006; Enoue *et al.*, 2007). Segundo Lima (2006) a metodologia mais prática e rentável ao apicultor é o uso de sarrafos de madeira, o autor também ressalta a facilidade de manejo nas colmeias produtivas em comparação ao uso de telas plásticas, coletor inteligente de própolis, coletor piraçununguense, coletor apis flora e método de asas, os quais precisam uma atenção extra pelo apicultor.

O método de produção de própolis por meio de sarrafos de madeira foi um dos primeiros métodos de coleta desenvolvido por apicultores paranaenses em 1993, que consiste na intercalação das partes móveis da colmeia (ninho, melgueiras e em alguns casos a tampa) com sarrafos de madeira na parte dianteira e traseira da colmeia, criando assim frestas laterais que variam de 2 a 3 centímetros (Lima, 2006).

Algumas colônias de abelhas *Apis mellifera* produzem mais própolis, fato que pode estar relacionado ao tamanho da colmeia. Ao avaliar a produção de três localidades: apiário na usina Bonfim, no município Guariba; apiário em Pradópolis, no município Pradópolis e apiário na Fazenda América, no município Luiz Antônio no Estado de São Paulo, Brasil com 450 colônias (com padrões diferentes, com: C_1 = ninho, C_2 = ninho e sobre ninho e C_3 = ninho e dois sobre ninhos), foram obtidos resultados atípicos. Na primeira localidade C_1 foi estatisticamente inferior com uma média de 35,52 g/colônia, quase duas vezes menor do que os outros padrões. Na segunda localidade as C_1 = 49,16 g/colônia foram superiores ($P<0,05$) das C_2 = 37,70 g/colônia e C_3 = 37,00 g/colônia. E por último as C_2 = 49,95 g/colônias foram estatisticamente superiores as C_1 e C_3 (Manrique e Soares, 2002a).

Ao avaliar a produção de própolis através de três diferentes métodos de coleta (coletor de própolis inteligente (CPI), tela plástica e raspa), verificou-se que a produção média de própolis, não diferiu estatisticamente entre o CPI ($114,8 \pm 70,6$ g), tela plástica ($120,9 \pm 49,8$ g) e raspa ($85,7 \pm 49,2$ g). Com relação ao efeito da sazonalidade sobre a produção de própolis, verificou-se que, na estação da primavera, a tela plástica apresentou produção significativamente maior ($176,7 \pm 54,8$ g) em comparação com o CPI ($68,2 \pm 17,1$ g) e raspa ($42,8 \pm 13,3$ g). Por outro lado, na estação do outono, o CPI apresentou produção significativamente maior ($212,9 \pm 47,7$ g) que a tela plástica ($87,5 \pm 6,0$ g). Para as demais estações do ano não foram observadas diferenças estatísticas entre as produções de própolis (Inoue *et al.*, 2007).

Ao analisar a produção de própolis e verificar a correlação entre produção de própolis e de mel em 100 colônias de abelhas procedentes de enxames capturados na natureza, observou-se que somente 25 colônias produziram própolis com média de 87,45 g e as outras 75 não produziram própolis. As colônias produtoras de própolis foram superiores ($P < 0,001$) na produção de mel, com média de 26,98 kg contra 13,93 kg das colônias não produtoras de própolis. Os resultados mostraram correlação direta entre a produção de própolis e a produção de mel com valores de $r = 0,422$ e $(p) = 0,00001256$, mostrando que as abelhas que mais produziram própolis também produziram mais mel. Tal resultado nos sugere que é possível selecionar abelhas para aumentar a produção das duas características (Manrique e Soares, 2002b).

1.5 CARACTERÍSTICAS DE SELEÇÃO

Considerando a colmeia como indivíduo de seleção e observação, podemos ver que continuamente ela é afetada por diversos fatores como: disponibilidade de recursos naturais, condições climáticas, presença de doenças (bactérias, fungos, vírus, microsporídios), parasitas (ácaros), predadores (pássaros, seres humanos) e pragas (besouros, mariposas). Além das variáveis anteriormente descritas não

podemos esquecer que a colmeia também está diretamente relacionada às diferentes práticas de manejo. O sinergismo e dinâmica destes fatores afeta direta ou indiretamente a produtividade e sobrevivência das colmeias (Morse e Flottum, 1997). Esses fatores permitem que atualmente programas de melhoramento genético utilizem diferentes características como: produção por colmeia, comportamento higiênico, comportamento enxameatorio, comportamento defensivo, incidências de doenças (varroatose, nosemose) além de diversas medidas morfométricas como características principais no programa de seleção.

1.5.1 Comportamento Higiênico

O conceito de comportamento higiênico é definido como a capacidade que tem algumas abelhas para detectar, desopercular os alvéolos com cria morta e/ou doente e efetuar a sua remoção. Este comportamento é avaliado de acordo com a rapidez de detecção, desoperculação e limpeza de cada colônia (Rothenbuhler, 1964; Message, 1979; Spivak *et al.*, 1995; Gramacho e Gonçalves, 1994; Gramacho 1995; 1999).

Gramacho e Gonçalves (2000) mencionaram que colmeias de *Apis mellifera* com um comportamento higiênico superior a 80% são consideradas higiênicas, enquanto colmeias com porcentagens iguais ou inferiores a 20% são consideradas não higiênicas. Assim podemos ressaltar que uma colmeia é mais higiênica quanto maior for a resposta de desoperculação e remoção das crias mortas. Porém, a classificação de uma colmeia higiênica ou não higiênica é relativa à rigidez utilizada no critério de seleção desta característica.

1.5.2 Incidência de Varroa

O ácaro *Varroa destructor* é um ectoparasita de larvas, pupas e adultos das abelhas do gênero *Apis mellifera* e é uma das pragas que mais causam problemas à

apicultura comercial. Denominado como varroatose, afeta abelhas *Apis mellifera* durante seu desenvolvimento e fase adulta. A infestação com *Varroa* causa malformações em diversas estruturas como asas, pernas, abdômen e tórax, além de redução da longevidade, tamanho, peso, atividade de coleta e resistência a outras doenças (De Jong, 1997; Beestma *et al.*, 1999; Sammataro *et al.*, 2000).

No Brasil as infestações por *Varroa* nas abelhas africanizadas são baixas e na maioria dos casos não é necessário o uso de qualquer tratamento de controle. Aparentemente as abelhas africanizadas adaptaram-se rapidamente a este ácaro, apresentando uma maior resistência em comparação às abelhas de origem europeia e seus híbridos com abelhas africanizadas (Shimanuki *et al.*, 1991; Moretto *et al.*, 1991; Moretto *et al.*, 1993; De Jong, 1997).

A mortalidade de indivíduos (pupas e larvas) em colônias de abelhas africanizadas com altos níveis de infestação de *Varroa* (superiores a 10% de infestação em abelhas adultas) foi proporcional ao nível de infestação de cada colônia. A mortalidade de larvas em colmeias com altas taxas de infestação foi de 15,71% a 16,15% em comparação ao grupo controle que apresentou uma taxa de mortalidade de 3,74%. Quando os autores analisaram a mortalidade de pupas em colmeias com altas taxas de infestação observaram 19,27% a 23,28% em comparação a 3,85% referente ao grupo controle (Mattos e Chaud-Netto, 2012).

1.5.3 Incidência de Nosema

A Nosemose é causada pelo desenvolvimento de um dos dois microsporídeos, *Nosema apis* ou *Nosema ceranae* nas células da mucosa do intestino médio de abelhas adultas: operárias, zangões e rainhas (Bailey e Ball, 1991). Nos últimos anos observou-se um aumento na infestação por *Nosema ceranae* em colmeias comerciais. Técnicas como PCR em tempo real facilitam a detecção e quantificação de *Nosema spp* em abelhas *Apis mellifera*. Bourgeois *et al.* (2010) observaram por meio de técnicas moleculares que os índices de infestação tanto de *Nosema apis* como de *Nosema ceranae* podem variar ao longo do tempo,

observando maiores índices de infestação (*Nosema apis*, como *Nosema ceranae*) no mês de novembro em comparação ao mês de março. Ocorrendo no Brasil desde os princípios do século passado (Message, 2010).

1.6 CENÁRIO ATUAL

A perda de colmeias de abelhas *Apis mellifera* em alguns países, mudanças climáticas, diminuição do pasto apícola em determinadas regiões, gargalhos genéticos (endogamia), rainhas não selecionadas e alguns fatores socioeconômicos têm efeitos mensuráveis sobre estas populações de abelhas. Muitos destes fatores influenciam a rentabilidade da apicultura comercial (Vangelsdorp e Meixner, 2010).

Internacionalmente algumas estratégias de melhoramento genético estão sendo desenvolvidas, parcerias entre órgãos governamentais ou nacionais têm ajudado no desenvolvimento de programas em abelhas *Apis mellifera* ao redor do mundo. Nos Estados Unidos, o *United States Department of Agriculture* (USDA) e alguns apicultores locais têm como objetivo em longo prazo desenvolver o valor econômico das abelhas *Apis mellifera*, através de melhoramento genético utilizando principalmente características de produção e de sanidade apícola, assim como também elaborar estratégias de gestão inovadoras para aumentar o estoque geral e a produtividade da polinização.

Um componente essencial do programa de melhoramento genético que esta sendo desenvolvido nos Estados Unidos é facilitar a incorporação, manutenção e distribuição dos estoques importados em populações de abelhas no país. O programa fornece material biológico, o serviço de inseminação e metodologia de seleção para estabelecer e manter várias linhagens comerciais as quais são reforçadas pelos estoques importados. A seleção para aumento da produtividade e identificação das colônias que expressam alto comportamento higiênico e menor prevalência de pragas e doenças vem sendo realizada. Centros capacitados são responsáveis pela distribuição e produção nacional de rainhas as quais são criadas

a partir destes estoques selecionados e distribuídas a diferentes apicultores do país (Pollard *et al.*, 2011).

Atualmente tem crescido o interesse pelo desenvolvimento de programas de melhoramento genético que tenham como principal objetivo o comportamento higiênico. Em 2001, Spivak e Reuter analisaram a resposta à seleção em colmeias produtivas nos Estados Unidos, estes autores observaram que ao utilizar rainhas de colmeias selecionadas pelo alto comportamento higiênico, estas colmeias apresentavam valores inferiores de infestações de *Varroa* em abelhas adultas e em crias operculadas em comparação à linhagem não selecionada mesmo sem receber nenhum tipo de controle químico durante o ano. Os autores também ressaltam que níveis superiores a 15% de infestação mesmo nas colmeias selecionadas precisam de atenção e tratamento.

A Argentina está desenvolvendo o programa nacional de seleção e melhoramento de abelhas (MeGA – PROAPI), baseados principalmente na genética como fator determinante na tecnologia da produção. Características como: adaptação ao meio ambiente; tolerância a diferentes doenças da cria; postura da rainha; defensividade; tolerância ao acaro *Varroa*; comportamento higiênico e produção são as características principais que estão sendo consideradas na elaboração do índice de seleção. Avaliações iniciais revelaram a necessidade de focar os esforços no material genético que chegava ao produtor, a partir desta necessidade o programa desenvolveu um sistema de avaliação da qualidade do material selecionado. Atualmente os apicultores pagam o direito do uso do material genético que é produzido pelo programa (realeiras, rainhas fecundadas, núcleos e pacotes de abelhas), além disto, eles também recebem a assistência técnica de profissionais altamente capacitados. Este programa conta com o apoio direto do governo nacional, instituições de pesquisa e apicultores das regiões de estudo (Palacio *et al.*, 2011).

Atualmente, observamos que no setor apícola nacional é indispensável o desenvolvimento, criação e fixação de programas de seleção de colmeias e melhoramento genético que perdurem ao longo dos anos e que possam servir como programas modelo, estimulando a criação de novos centros de melhoramento genético ao longo do país. Além disto, temos certeza que o setor apícola também

deve desenvolver tecnologias de produção e manejo que em associação a programas de melhoramento genético permitam um aumento dos níveis de produção. Hoje o setor está na fase profissionalizante, o que tem motivado os apicultores a adquirirem novas tecnologias que permitam um crescimento do setor ao nível internacional.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Estruturar, estabelecer e fixar um plano de melhoramento genético e seleção de colmeias com o objetivo de incrementar a produção de própolis por colmeia aumentando as médias de produção por apiário.

2.1.1 Objetivos Específicos:

- Estabelecimento de parcerias com apicultores comerciais;
- Determinação das características de seleção a serem utilizadas no programa de melhoramento genético;
- Avaliação das colmeias dos apiários e seleção das matrizes;
- Avaliação do comportamento higiênico nas colmeias produtoras de própolis verde;
- Avaliação da taxa de infestação de *Varroa*;
- Avaliação da incidência de *Nosema*;
- Seleção de linhas genéticas;
- Inseminação do material selecionado;
- Replicação das matrizes selecionadas (F1);
- Avaliação do material selecionado (F1) nas colmeias em produção;
- Seleção das linhas genéticas para a próxima geração;
- Avaliação de diferentes núcleos de fecundação.

Este programa de seleção de colmeias e melhoramento genético será contínuo ao longo dos anos, com o intuito de fixá-lo na região de estudo e assim continua-lo nas próximas gerações de produção de própolis. Ao longo dos anos esperamos regularizar práticas de manejo que nos permitam a introdução de material genético inseminado nas colmeias produtivas, além de incrementar ou excluir diferentes características de seleção utilizadas para a execução do programa

de melhoramento genético em futuras gerações. Estas características serão determinadas diretamente com os apicultores envolvidos no programa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTABELECIMENTO DE PARCERIAS

Todo programa de melhoramento genético deve ser desenvolvido, testado e realizado com o maior número de colmeias possível. Desta forma, foi indispensável o estabelecimento de parcerias com apicultores comerciais que estivessem interessados e que disponibilizassem colmeias em produção para a realização deste trabalho.

Para buscar essas parcerias, focamos e centralizamos nossas forças na divulgação deste trabalho a diversos grupos de apicultores de diferentes partes do Brasil. Participamos de diversas reuniões de apicultores (congressos, seminários, encontros) e especificamente durante os congressos nacionais de apicultura realizados em Belo Horizonte (2008) e Cuiabá (2010) se fez contato com diferentes apicultores comerciais com o objetivo de estabelecer parcerias de trabalho e assim dar início a um programa de melhoramento genético.

Uma vez feito este primeiro contato, os apicultores interessados em fazer parte deste trabalho foram visitados para se determinar os objetivos do programa de melhoramento genético e analisar algumas características individuais de cada sistema produtivo. Para o estabelecimento deste tipo de programa era indispensável que o apicultor tivesse um manejo adequado nos apiários e possuísse colmeias padronizadas e em perfeito estado de conservação. Pensando nisso, nosso principal interesse foi selecionar apicultores que tivessem uma base teórico/prática bem estabelecida.

3.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SELEÇÃO A SEREM UTILIZADAS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO

Selecionados os apicultores deste trabalho, definimos de forma conjunta as características utilizadas para a seleção do material genético. Com cada apicultor

interessado, se estabeleceu um cronograma de trabalho para facilitar a coleta de informações e diminuir o efeito negativo dos experimentos na produção individual destas colmeias. Devido ao fato de estarmos trabalhando diretamente com colmeias em produção, qualquer tipo de prática e manejo extra que fosse realizado neste material poderia afetar direta ou indiretamente a sua produção.

O principal interesse dos apicultores visitados foi o incremento da produção, independentemente do qual enfoque seria adotado, porém, como não podemos deixar de lado características de importância fundamental na seleção de matrizes, adicionalmente à produtividade determinamos outras como:

1. Produção de própolis
2. Comportamento higiênico
3. Infestação de *Varroa*
4. Incidência de *Nosema*

Determinadas as características que seriam avaliadas nos apiários de produção determinamos o cronograma geral de trabalho estruturado na Figura 4. Neste cronograma podemos observar que somente durante a fase final da produção de própolis as colmeias começaram a ser avaliadas quanto sua produção individual, já durante o período da entre safra iniciamos a avaliação das características de seleção. O trabalho de seleção das linhagens, replicação do material, troca e introdução de rainhas foi realizado de forma paralela durante a o período da entre safra, intervalo de tempo suficiente para trocar as rainhas e toda a população das respectivas colmeias em produção. Este cronograma de trabalho pode variar anualmente e esta sujeito a variações climáticas da região em estudo.

Figura 4. Cronograma de atividades em função do ciclo de produção de própolis.

3.2.1 Metodologias de avaliação das diferentes características de seleção

As colmeias que foram selecionadas e disponibilizadas como grupo inicial do programa de melhoramento genético foram monitoradas e avaliadas levando em consideração os seguintes fatores:

- Qualidade da própolis coletada por cada colmeia
- Quantidade de própolis verde produzida
- Comportamento higiênico
- Taxa de infestação de *Varroa*

➤ Incidência de *Nosema*

3.2.1.1 Qualidade da própolis coletada por cada colmeia: Para determinar a qualidade da própolis produzida nas colmeias foram realizadas observações diretas em campo. Para a colmeia ser selecionada ela deveria estar produzindo única e exclusivamente própolis verde, colmeias que produziam própolis de diferentes cores e de textura resinosa foram descartadas.

3.2.1.2 A quantidade de própolis produzida: A quantidade de própolis (gramas colmeia/semana) foi avaliada durante o período de produção e coletada semanalmente. Durante o processo de coleta a própolis de cada colmeia foi separada e pesada individualmente. Foram feitas três pesagens de própolis no final da safra para cada uma das colmeias nos apiários de produção,

3.2.1.3 Comportamento higiênico: A análise do comportamento higiênico foi feito através do método de perfuração de células de crias, modificado por Gramacho e Gonçalves (1994). Este método é amplamente utilizado em colmeias de abelhas africanizadas e o baixo custo do mesmo permite que qualquer apicultor adote facilmente esta metodologia. Para o teste do comportamento higiênico, de cada colônia avaliada retirou-se um quadro com cria operculada (pupa com olho pigmentado), definindo duas áreas paralelas (A e B), cada uma contendo cem células de cria, dispostas em dez linhas por dez fileiras. Para a identificação dos quadros perfurados utilizou-se alfinetes coloridos. A área escolhida para realizar o teste de perfuração (Área A) foi a que continha o menor número de células de crias vazias (Figura 5).

Figura 5. Metodologia utilizada para realizar os testes de comportamento higiênico. A) Área utilizada para a realização do teste (perfuração) a qual continha menor número de células vazias. B) Área controle.

Para calcular a porcentagem do comportamento higiênico de cada colmeia. Na área A, realizou-se a perfuração das células de crias operculadas com o auxílio de um alfinete entomológico (número 1), que foi inserido no centro do opérculo em direção às crias, perfurando-as e causando a morte das mesmas. Na área A e B foram contadas as células de crias desoperculadas ou vazias. Após o procedimento, o quadro utilizado foi devolvido à respectiva colmeia, permanecendo por 24 horas, tempo utilizado para avaliar o comportamento de desoperculação e remoção das crias mortas ou afetadas pela perfuração do alfinete. Após este intervalo, retirou-se o quadro perfurado e as células removidas foram contadas tanto na área perfurada como na área controle,

Adicionalmente na área B calculou-se o fator de correção Z que corresponde à taxa de limpeza natural da área correspondente, subtraído do valor de células removidas na área A. A estimativa do valor de Z na área B (controle) foi feita da mesma forma que para a área A, considerando que as células operculadas não são perfuradas na área B, e as células vazias ou desoperculadas foram contadas 24 horas após a perfuração das células na área A. O resultado final foi considerado se o valor do fator de correção (área B) fosse igual ou inferior a 10%.

As fórmulas utilizadas para os cálculos de comportamento higiênico (CH) e de Z foram baseadas nos estudos de Gramacho (1999):

$$CH = \frac{(CV\theta - CV)}{CO} - Z \times 100$$

Onde:

CV θ = N° de células vazias 24 horas após a perfuração.

CV = N° de células vazias antes da perfuração.

CO = N° de células operculadas antes da perfuração

Z = Fator de correção obtido no controle.

• Fator de correção Z:

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

Onde:

Z = Porcentagem de células limpas no controle.

A = N° de células com crias operculadas

Y = N° de células vazias ou limpas contendo crias operculadas, removidas naturalmente.

$$Y = C - B$$

C = N° de células vazias na área de controle, após a introdução do favo na colmeia analisada.

B = N° de células vazias na área de controle antes do favo ser introduzido.

3.2.1.4 Taxa de infestação de Varroa: Neste trabalho a taxa de infestação de *Varroa* foi estimada em abelhas adultas e obtida mediante a coleta em álcool de aproximadamente 100 abelhas por colmeia, com o objetivo de verificar a quantidade de varroas em determinado número de abelhas. A taxa de infestação de *Varroa* é expressa em porcentagem.

Cada amostra coletada foi submetida à agitação forte durante um período de aproximadamente cinco minutos, após a agitação, cada amostra foi devidamente filtrada por uma tela fina que não permitia a passagem das abelhas, passando somente os ácaros para um recipiente branco. Para cada amostra foram contadas:

A. Quantidade de abelhas coletadas

B. Quantidade de varroas

Para calcular a porcentagem de abelhas infestadas com *Varroa* utilizamos a seguinte formula:

$$\% \text{ de Infestação} = \frac{100 \times B}{A}$$

Esta metodologia (Figura 6) foi repetida para assim obter uma média de infestação de *Varroa* para cada colmeia.

Figura 6. Processo utilizado para a quantificação da taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas. A) Identificação da amostra. B) Agitação. C) Contagem de varroas.

3.2.1.5 Incidência de *Nosema*: A incidência de *Nosema* foi estimada mediante a contagem de esporos. Com o objetivo de verificar a quantidade de esporos por abelha, foram coletadas 10 abelhas adultas por colmeia. As abelhas de cada amostra coletada foram trituradas e maceradas em 10 ml de água destilada. Cada amostra foi devidamente filtrada (algodão) para passar somente a parte líquida (Figura 7).

Figura 7. Metodologia utilizada para conhecer a taxa de infestação de *Nosema*. A) Abelhas a serem analisadas. B) Maceração em água destilada. C) Filtração em algodão. D) Amostra para contagem dos esporos.

A incidência de esporos de *Nosema* foi estimada mediante a observação da solução líquida no microscópio com ajuda da câmara de Neubauer. Esta câmara consiste de uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, com marcações em quadrantes e de medidas conhecidas. Observando-se ao microscópio, percebe-se que existem três tipos de quadrantes denominados A, B e C, que juntos formam um quadrado maior. Estes quadrantes têm subdivisões diferentes, assim o critério para escolha do quadrante para contagem dos esporos depende do tamanho dos esporos a serem quantificados. Assim, usualmente, esporos muito pequenos são contados no quadrante C, os de tamanho intermediário no quadrante B, enquanto esporos grandes são contados no quadrante A, os esporos de *Nosema* foram contados utilizando os quadrantes tipo C (Figura 8).

Figura 8. Câmara de Neubaeur e classificação dos quadrantes.

Foram contados o número de esporos em cinco sub-quadrantes (*c*) de *C*, os quatro dos cantos e o sub-quadrante central. Como o quadrante *C* (com $0,1 \text{ mm}^3$ de volume) é dividido em 25 sub-quadrantes, ao serem contados os esporos nos cinco sub-quadrantes (*c*), tem-se o número de esporos em um volume de suspensão igual a $0,004 \text{ mm}^3 \times 5 = 0,02 \text{ mm}^3 (= 0,00002 \text{ cm}^3)$. Logo em um sub-quadrante (*c*) temos o n° médio de esporos ($n^\circ \text{ observado} \div 5$) em um volume de $0,00002 \text{ cm}^3 \div 5 = 0,000004 \text{ cm}^3$. Para estimar o número de esporos em *C*, que tem um volume 25 vezes maior que *c*, devemos considerar que temos 25 vezes mais esporos contidos em um volume ($0,000004 \text{ cm}^3 \times 25 = 0,0001 \text{ cm}^3$). Para calcular o número estimado de esporos/ml faz-se o seguinte cálculo:

Exemplo: Contagem 12 12 10 9 15 = **58 Esporos**

Multiplicamos o número de esporos por cinco vezes para obter a quantidade de esporos na área *C* assim teremos:

290 esporos em $0,0001 \text{ cm}^3$ ($0,1 \text{ mm}^3$), isto significa que 290 esporos em $0,0001 \text{ cm}^3$ equivalem a 290×10^4 ou $2,9 \times 10^6$ ou 2.900.000 esporos/ml ou esporos por abelha adulta. Esta metodologia foi repetida para assim obter uma média para cada colmeia.

3.3 SELEÇÃO DO MATERIAL PARENTAL

3.3.1 Primeira Geração

Com o objetivo de diminuir o tempo de trabalho e acelerar o processo de seleção, foram disponibilizadas um total de 50 colmeias, as quais formaram o grupo inicial de colmeias que foi utilizado para a avaliação e primeira seleção das linhagens genéticas deste programa de melhoramento genético.

Estas colmeias foram escolhidas durante a safra de produção de própolis que foi desde novembro de 2010 até maio de 2011. Estas colmeias foram selecionadas diretamente pelos apicultores responsáveis pela coleta e manejo contínuo destes apiários comerciais localizados na região de produção. Para que uma colmeia fosse escolhida, deveria ter apresentado uma boa coleta de própolis verde durante a fase de produção, ou seja, selecionaram-se colmeias que sempre tivessem produzido lâminas de própolis completas e com qualidades típicas da própolis verde.

Posteriormente, as colmeias selecionadas foram individualmente transportadas e redistribuídas em cinco apiários contendo cada um somente dez colmeias para facilitar o manejo e a coleta de dados. Estas colmeias foram monitoradas, passando por observações e testes para a avaliação das características utilizadas para a primeira seleção: Comportamento higiênico, taxa de infestação de *Varroa* e incidência de *Nosema*.

De acordo com os dados obtidos nestes cinco apiários, foram selecionadas as colmeias que apresentaram os melhores indicadores das diferentes características selecionadas, baseando-se no seguinte critério:

- Comportamento higiênico > 90%
- Porcentagem de infestação de *Varroa* < 5%
- Ausência de esporos de *Nosema* ou baixa incidência

Assim, a partir do grupo inicial de colmeias selecionadas na primeira geração, nove colmeias foram escolhidas e estabelecidas como linhagens genéticas. Essas

colmeias tiveram suas respectivas rainhas retiradas e transportadas para a Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto, onde foram identificadas e introduzidas em núcleos de cinco favos no apiário experimental, para assim dar início à produção controlada de rainhas.

A introdução destas rainhas foi realizada por meio de telas para aumentar a aceitação nos núcleos. Após 48 horas da introdução estas telas foram removidas e as rainhas ficaram livres ao interior de cada colmeia. Estes núcleos foram semanalmente alimentados e inspecionados para se acompanhar o crescimento individual e mantê-los nas melhores condições. Assim que estas rainhas iniciaram postura foi iniciado o processo de produção de rainhas virgens destas colmeias.

Devido à falta de padronização de algumas práticas de manejo realizadas nos apiários comerciais de produção de própolis e falta de tempo disponível para realizar os cruzamentos controlados entre as linhagens maternas e paternas (inseminação), foi determinado que a partir deste grupo inicial de colmeias selecionadas, somente utilizaríamos rainhas filhas de três rainhas do total das nove rainhas selecionadas. Para esta primeira parte determinamos que seria inviável trabalhar nos cruzamentos por meio do uso da inseminação devido, principalmente, ao tempo disponível para o envio das rainhas virgens. Desta forma o material selecionado foi utilizado como material genético base para a produção das rainhas no apiário experimental da USP *campus* Ribeirão Preto e imediatamente enviadas e testadas em campo. Assim, foram estabelecidas três linhagens genéticas as quais seriam testadas na próxima safra de produção de própolis.

3.3.2 Segunda Geração

Aproximadamente mais de 100 rainhas virgens (F1) foram produzidas a partir das três diferentes linhagens genéticas. Estas rainhas foram respectivamente marcadas e engaioladas individualmente com o objetivo de serem transportadas e introduzidas em colmeias previamente divididas nos apiários de produção localizadas na região de estudo.

Após a introdução destas rainhas nas colmeias produtivas, a sua aceitação foi confirmada visualmente pela presença da marca no tórax da rainha. As colmeias nas quais não observamos rainhas marcadas foram consideradas como colmeias com rainhas não selecionadas. As rainhas enviadas foram divididas nos diferentes grupos de trabalho de campo, fator que impossibilitou a avaliação de cada uma destas colmeias. Entretanto, durante a fase deste trabalho tentamos avaliar o maior número destas rainhas (F1).

Na segunda seleção do material parental foi avaliado um número maior de colmeias. Foram escolhidos 10 apiários em produção (com um total de 263 colmeias), durante esta fase, a seleção inicial do material se baseou principalmente na produção individual de própolis de cada colmeia. Estes apiários eram formados tanto de colmeias com rainhas filhas da primeira seleção (F1= 34 colmeias), como também de colmeias com rainhas de origem desconhecida (229 colmeias). A avaliação foi realizada após o estabelecimento do material selecionado (rainhas F1) e durante o mês de dezembro de 2011 ao mês de junho de 2012, que corresponde à seguinte safra produtiva.

Das colmeias monitoradas nos dez apiários de produção foi selecionado um total de 60 colmeias, pela normalização dos valores de produção aos valores **Z**. Segundo, as respostas individuais de cada colmeia estas podem então ser transformadas em unidades de desvio padrão e comparadas, com o objetivo de selecionar as matrizes. O valor **Z** foi calculado como:

$$Z = \frac{X - M}{S}$$

Onde:

X = quantidade de própolis coletada por cada colmeia;

M = média de produção de própolis por apiário e

S = desvio padrão por apiário.

As 60 colmeias selecionadas segundo a produção de própolis foram avaliadas individualmente com o objetivo de conhecer as características de seleção que foram utilizadas para a seleção inicial das matrizes (Comportamento higiênico, porcentagem de infestação de *Varroa* e incidência de *Nosema*).

A partir deste grupo de colmeias foram selecionadas 10 colmeias com o objetivo de estruturar cinco linhas genéticas as quais serão testadas na próxima safra de produção de própolis (Dezembro 2012 até junho 2013). A seleção destas colmeias teve o seguinte critério:

- Comportamento higiênico > 95%
- Porcentagem de infestação de *Varroa* < 5%
- Ausência de esporos de *Nosema* ou baixa incidência

Assim como na primeira geração, as rainhas provenientes do material selecionado foram transportadas e instaladas no apiário experimental da USP. Para a segunda geração esperamos poder realizar os devidos cruzamentos entre as linhagens selecionadas utilizando a inseminação. Isto nos permitirá estabelecer as matrizes de seleção. Esperamos para esta fase criar cinco linhas genéticas. Este material será mantido no apiário da USP *campus* Ribeirão Preto e serão replicadas com o objetivo de realizar as devidas substituições das rainhas menos produtivas nos apiários de produção.

Já foi determinado que para esta fase serão produzidas um total de 400 rainhas (F2), filhas das cinco linhas genéticas. Ao longo do tempo esperamos adicionar novos parâmetros de seleção, os quais serão determinados e estipulados durante reuniões diretas com a parte interessada deste programa de melhoramento genético.

3.4 AVALIAÇÃO DE MATERIAL NÃO SELECIONADO E PADRONIZAÇÃO DE PRÁTICAS DE MANEJO

O programa de melhoramento genético que está sendo desenvolvido na região de estudo trabalha com populações abertas, ou seja, além do material selecionado, anualmente serão avaliadas novas e diferentes colmeias. Quando trabalhamos com populações abertas evitamos problemas de endogamia e consanguinidade, aumentando assim a variabilidade genética das colmeias em produção. Ao longo deste trabalho, foi incrementado o número de colmeias avaliadas, e pretendemos aumentá-las futuramente nas novas avaliações.

Atualmente o sistema de produção de própolis que encontramos na região utiliza a captura de enxames em determinadas épocas do ano. Estes enxames também podem ser avaliados e poderiam vir a fazer parte do grupo de colmeias experimentais. Porém, somente os enxames fortes serão monitorados e os melhores enxames entrarão no sistema de avaliação da produção de própolis verde. Durante a seleção e supervisão destes enxames deve-se ter especial cuidado com os enxames que possuam rainhas velhas, é por isto que só os enxames fortes e que tenham condição de formar uma colônia com boa população serão levados para os apiários de produção.

Algumas práticas de manejo serão estabelecidas, entre elas teremos: troca anual de rainhas; marcação e seguimento das rainhas dos apiários; três ou mais avaliações do comportamento higiênico ao longo do ano, além de realizar e desenvolver o mesmo tipo de manejo de forma similar em todos os apiários que fazem parte do programa de melhoramento em desenvolvimento.

3.5 REPLICAÇÃO DAS LINHAGENS GENÉTICAS

3.5.1 Produção de Rainhas

Para a produção de rainhas foram usadas mini-recrias de dois núcleos de cinco favos superpostos os quais foram separados com uma tela excludora. Este tipo de mini-recria traz grandes benefícios para o trabalho rotineiro do apicultor por facilitar o trabalho de “reforma”, permitindo localizar a rainha mãe com rapidez e é considerado um excelente método na produção de rainhas. A alimentação artificial foi realizada individualmente segundo as necessidades e o tamanho da colônia. As “reformas” foram realizadas com um intervalo de oito dias, diminuindo consideravelmente o risco de enxameação das colônias, o qual é um inconveniente nas colmeias recrias de dois corpos.

Para as “reformas” a mini-recria foi desmontada visando descer todos os favos que estivessem vazios no segundo núcleo, subindo quadros com crias abertas. Após esta etapa a mini-recria foi remontada novamente, colocando também um quadro com três sarrafos de dez cúpulas cada para produção de rainhas, totalizando 30 cúpulas plásticas. No dia seguinte à reforma as transferências foram realizadas.

Foram feitas transferências simples usando-se um estilete fino para a coleta das larvas dos quadros das colmeias matrizes, as larvas foram, então, cuidadosamente colocadas sobre uma gota de geleia real diluída em água destilada a 50% de concentração. Todo o ciclo de produção de rainhas foi realizado nas mini-recrias dispensando-se o uso de colmeias iniciadoras e/ou finalizadoras. As realeiras foram retiradas das mini-recrias dez dias após as transferências das larvas para serem mantidas em estufas a 34°C e 65% de umidade relativa. Após o nascimento das novas rainhas estas foram engaioladas ou colocadas nos bancos de rainhas ou núcleos.

3.5.2 Padronização do Procedimento da inseminação

Para obter o máximo controle dos cruzamentos será utilizada a técnica de inseminação instrumental, com auxílio do aparelho de inseminação criado pelo Dr. Peter Schley da Alemanha. Este aparelho foi modificado e atualizado para o modelo II, o qual permite que os procedimentos sejam muito mais precisos e simples. O modelo II traz grandes vantagens devido a fato de possuir um fórceps no lugar do gancho dorsal, permitindo maior rapidez, solidez para prender e levantar a estrutura do ferrão, expondo a abertura abdominal de modo similar ao movimento da fecundação natural, facilitando assim, transpor a válvula da rainha com maior eficiência (Cobey e Schley, 2002). Durante a execução deste trabalho, foram realizadas diversas inseminações no apiário experimental da USP de Ribeirão Preto, buscando padronizar todos os detalhes pré e pós-inseminação das rainhas e desenvolver uma melhor prática no uso da técnica de inseminação.

Previamente ao procedimento da inseminação, foi realizada a respectiva higienização do local de trabalho. A bancada foi limpa com água e detergente. Posteriormente, bancada, lupa, luminária e suportes foram desinfetados com álcool 96%.

Durante a inseminação foi utilizada a seringa Harbo, a qual foi montada sempre com as mãos limpas. Cada uma das partes da seringa foi cuidadosamente lavada com solução salina com antibiótico. Para o preparo desta solução utilizamos 100 ml de água destilada ou do MiliQ, os quais foram misturados com 0,85 g de Cloreto de Sódio (NaCl) e 0,25 g de Dihydrostreptomycina Sulfato. A seringa do micrômetro foi devidamente lavada com a solução, após esta operação, foi montada a seringa com a solução tendo o cuidado para não deixar bolhas.

O aparelho de inseminação montou-se acoplando o cabeçote que segura a seringa na haste do aparelho. O gancho ventral e o fórceps também foram cuidadosamente lavados com solução salina. Sempre checando o ajuste e a posição correta de todos os componentes.

3.5.2.1 Coleta do sêmen

Para manter com vida um maior número de zangões durante a coleta de sêmen, usou-se uma caixa de acrílico com paredes internas cobertas com lâminas de isopor para manter uma temperatura adequada entre 28 e 35°C. Os zangões foram coletados no dia anterior à inseminação, acondicionados a uma gaiola com laterais de tela excludora e mantidos em uma colônia forte e com bastante alimento. No dia da coleta a gaiola foi retirada da colmeia e rapidamente transportada e colocada no fundo da caixa de acrílico. No topo da caixa de acrílico utilizamos uma lâmpada fluorescente de luz negra, assim, os zangões saíram da gaiola e voaram em direção à luz. Isto permitiu escolher os zangões mais maduros, que muitas vezes defecam no interior da gaiola ao invés de fazê-lo no momento da coleta do esperma.

Na maioria das ocasiões o sêmen de cor bege claro fica aglomerado em cima do muco de cor branco, mas em algumas vezes fica espalhado no muco ou em alguma outra parte do endófalo. Para a coleta de forma correta do sêmen o aparelho reprodutor completamente evertido foi posicionado próximo da ponta do capilar e com muita firmeza, mas de forma suave, o sêmen foi coletado. Bolhas de ar e muco não deverão ser sugadas para o interior do capilar, as primeiras afetam a mobilidade do sêmen no sistema e o segundo entope rapidamente a ponta do capilar. Entre cada coleta, umedeceu-se a ponta do capilar com solução salina para evitar o ressecamento do sêmen e a imobilidade do sistema. Este processo se repetiu inúmeras ocasiões até coletar a quantidade necessária de sêmen. Após o término da coleta uma pequena bolha de ar foi deixada e coletou-se um microlitro de solução para evitar o ressecamento do sêmen no capilar.

3.5.2.2 Inseminação

A inseminação começou retirando o tubo de vidro que protege o capilar do seu suporte e colocando-o no suporte do aparelho de inseminação. O fluxo de gás carbônico foi regulado previamente ao posicionamento da rainha no aparelho. Esta foi inserida com a cabeça voltada para o interior de um tubo sem saída que,

imediatamente, foi acoplado ao suporte da rainha, assim, quando a rainha tentar sair ela se deslocara para trás, deixando o abdômen exposto na ponta aberta do suporte. Neste momento posicionamos o suporte no tubo da saída do gás, onde ficou preso firmemente.

Posteriormente, de forma suave e precisa o gancho ventral foi inserido na abertura vaginal. Em alguns casos, quando a rainha adormece expõe o ferrão, o que facilita o trabalho de prendê-lo com o fórceps. Quando tal fato não ocorreu, o fórceps foi primeiramente usado como um gancho dorsal puxando suavemente pela parte interna do dorso da rainha e com um gancho adicional o ferrão foi levantado para logo prendê-lo com o fórceps. Logo depois, o gancho ventral e o fórceps foram manobrados para deixar a rainha na posição distendida e com a abertura abdominal adequada para a inserção da ponta do capilar. A ponta do capilar foi inserida 1 mm, aproximadamente, na vagina, o mais dorsalmente possível, passando suavemente pela válvula da entrada do ducto vaginal. Seguiu-se a este passo um movimento dorso ventral de 1 a 1,5 mm para assim introduzir o capilar mais 1 mm, aproximadamente. Neste momento com a ajuda do micrômetro foi injetada a quantidade de sêmen determinada para cada inseminação.

Finalmente, a rainha foi rapidamente libertada soltando-se o ferrão do fórceps e tirando o gancho ventral. A seguir a rainha recebeu uma marcação com tinta ou com disco plástico colorido e numerado (tipo Opalith), também uma das asas posteriores foi cortada. Vinte e quatro horas após a inseminação, as rainhas foram trazidas novamente para o laboratório para serem expostas ao gás carbônico por aproximadamente 5 minutos, esta metodologia ajuda no processo de migração espermática e estimulou o início da postura.

Na figura 9A podemos observar o posicionamento da rainha antes de fazer a introdução do sêmen, observamos também como o ferrão é levemente puxado, auxiliando assim a abertura da rainha. Na figura 9B observamos uma rainha inseminada e já aceita pela respectiva colmeia, nesta figura também podemos observar que a rainha recebeu uma chapa numerada, além de ter uma asa cortada.

Figura 9. Procedimento de inseminação instrumental. A) Preparação da rainha para a inseminação. B) Rainha inseminada já aceita na colmeia, a seta mostra a asa cortada após o procedimento de inseminação.

3.4.2.3 Bancos de Rainhas

Os bancos de rainhas têm como objetivo a manutenção das rainhas virgens e inseminadas por um período aproximado de dez dias. Devem ser simples e que facilitassem o manuseio individual das rainhas no momento das inseminações. Também as rainhas não podem ter contato físico com as outras rainhas, evitando-se o risco de lutas entre estas e consequentemente a morte de grande quantidade de rainhas.

A metodologia usada para a manutenção das rainhas virgens foi com o uso de gaiolas (teladas metálicas individuais de 2 x 2 x 2,5 cm). Estas gaiolas foram inseridas a um favo com mel, introduzindo assim uma rainha virgem por gaiola. O favo contendo as rainhas foi introduzido na parte superior de uma mini-recrta. Também foram utilizados núcleos normais de cinco favos, neste caso, só uma rainha virgem foi introduzida por núcleo, a qual foi posteriormente retirada e inseminada. Após a comprovação do início da postura estas rainhas foram introduzidas em colmeias com o objetivo de realizar as devidas observações.

3.5 NÚCLEOS DE FECUNDAÇÃO

O objetivo dos núcleos de fecundação é maximizar o uso do material biológico por apiário, com o objetivo de fecundar um maior número de rainhas usando o mínimo de material biológico possível e assim facilitar o trabalho e manejo do apicultor. Atualmente é comum observar o uso de núcleos de quatro o cinco favos para realizar a fecundação das rainhas virgens. Ao trabalhar com núcleos deste tamanho é comum observar o uso de muito material biológico para a fecundação de uma única rainha.

Foram testados três tipos diferentes de modelos para a fecundação de rainhas os quais foram:

- Modelo 1: Núcleo de fecundação de cinco favos possuindo uma divisória ao meio, formando assim dois compartimentos ou núcleos que possuíam dois favos cada um, os alvados destes núcleos eram opostos, e foram pintados individualmente com cores diferentes para facilitar o retorno das rainhas virgens após seus respectivos voos.
- Modelo 2: Mini-núcleos de cinco favos miniatura, este modelo de núcleos é amplamente utilizado em apicultura com abelhas europeias. Cada caixa possuía dois mini-núcleos separados e com alvados opostos e pintados individualmente com cores diferentes para facilitar o retorno das rainhas virgens após seus respectivos voos.
- Modelo 3: Colmeia normal de 10 favos contendo três compartimentos separados fisicamente e com espaço para trabalhar com três favos em cada um. As saídas foram nas laterais e o compartimento do meio com alvado frontal. Da mesma forma esta colmeia foi pintada com três tipos de cores diferentes, para facilitar o retorno das rainhas virgens após seus respectivos voos.

4. RESULTADOS

4.1 ESTABELECIMENTO DE PARCERIAS

Ao todo cinco apicultores comerciais pertencentes a diferentes regiões foram visitados com o objetivo de criar um vínculo apicultor-pesquisador que permitisse estabelecer parcerias de trabalho que pudessem servir como base para nosso objetivo principal de estudo. Desse modo foi possível conhecer de forma detalhada os sistemas produtivos de cada apicultor e analisar algumas características que possibilitassem a estruturação e implantação do programa de melhoramento genético em sua propriedade.

A primeira visita foi realizada, no ano de 2008, a um produtor do estado de Paraná, com os apiários de produção localizados no estado de Amambay/Paraguai, divisa do país. O apicultor possuía aproximadamente 450 colmeias em produção e seu principal objetivo era a produção de mel orgânico. Durante esta visita confirmamos que os apiários cumpriam os requisitos básicos para a implantação do programa de melhoramento genético (bom manejo, material padronizado, excelente material biológico e quantidade suficiente de colmeias), o que possibilitou o início do trabalho na localidade.

Todas as colmeias em produção tinham os seus respectivos históricos e registros detalhados de produção de mel. Com o auxílio destas informações selecionamos três colmeias que serviram como material inicial para os testes. Posteriormente à seleção, retiramos e levamos as rainhas das colmeias selecionadas ao apiário experimental da USP de Ribeirão Preto. Assim que estas rainhas iniciaram postura, demos início à produção controlada de rainhas.

As rainhas filhas das colmeias selecionadas foram respectivamente identificadas, engaioladas e enviadas ao produtor via correios (Sedex). O objetivo foi introduzi-las nas colmeias que apresentaram baixos índices de produção na safra anterior e assim poder avaliar o desempenho do material selecionado nos apiários comerciais. Lamentavelmente por motivos externos, o trabalho de seleção e avaliação do material enviado foi cancelado, fato que gerou a perda dos dados experimentais e impossibilitou a continuação desta atividade na região.

No ano de 2009 visitamos dois apicultores do estado de Minas Gerais, um localizado na região de Ouro Fino, com um total de 150 colmeias utilizadas principalmente para a produção de mel e o outro localizado na região de Guaxupé, com aproximadamente 160 colmeias utilizadas principalmente para a produção de própolis verde.

Durante as visitas aos apiários localizados em Ouro Fino e Guaxupé, foi constatado que estes apicultores não realizavam as trocas periódicas de rainhas nas colmeias. Este tipo de prática é comumente observado na apicultura brasileira e está ligada com o desconhecimento do material genético das colmeias em produção. O único tipo de melhoramento genético realizado por estes apicultores era durante a divisão das colmeias em produção, em que as divisões eram realizadas a partir das colmeias mais fortes e produtivas, deixando que a produção de rainhas nestas colmeias procedesse de forma natural. Apesar deste tipo de metodologia não ser o mais recomendado na apicultura comercial, existe uma forma de seleção do material genético, mas com um baixo impacto ao nível de melhoramento genético.

Observamos durante estas visitas que todo o trabalho referente ao manejo das colmeias em produção como transporte de caixas, instalação de apiários, troca de cera, colheita de própolis, era realizado diretamente pelos proprietários das colmeias, os quais possuíam eventualmente um auxiliar de apicultura para a execução destas tarefas. Estes apicultores realizavam o manejo das colmeias principalmente nos finais de semana, realizando uma apicultura extrativista e não considerada como fonte principal de renda para família. Da mesma forma, observamos que a comercialização da própolis era realizada em natura e vendida aos intermediários da região, responsáveis pelo processamento do produto ou mesmo a sua exportação. Outro ponto negativo que observamos nestes apiários foi o fato deles serem formados por diferentes tipos de material físico e não padronizado. Como a padronização do material de trabalho é considerada peça chave para a implantação e estruturação do programa de melhoramento genético, determinamos que não seria viável dar início ao programa de melhoramento genético com este tipo de material.

No ano 2010 visitamos um apicultor localizado no estado de Minas Gerais, município de Jacuí, com aproximadamente 80 colmeias utilizadas e manejadas principalmente para a produção de própolis verde. Esta localidade é considerada como uma região promissora para a produção de uma própolis verde de excelente qualidade. Foram realizados alguns testes prévios de comportamento higiênico, taxa de infestação de *Varroa* e incidência de *Nosema*. Estes testes foram feitos com o objetivo de se determinar quais características poderiam ser utilizadas para a seleção das colmeias, assim como também, estabelecer um tipo de manejo em campo que facilitasse a coleta das informações diretamente nos apiários em produção.

Posteriormente, observamos durante os trabalhos em campo que este apicultor era totalmente extrativista, ou seja, não realizava manejo adequado de troca de favos, troca de rainhas e/ou alimentação artificial nas colmeias. Adicionalmente, este apicultor tinha a apicultura como uma tarefa a ser realizada somente nos finais de semana, parando todas as atividades de manejo em alguns períodos do ano. Além disto, o material apícola utilizado por este apicultor era muito velho e em más condições, o que dificultava o manejo nas colmeias produtivas. Por estas razões, não demos continuidade as visitas e avaliações do material em produção.

No ano de 2010 visitamos um apicultor com uma escala comercial maior, com mais de 1500 colmeias utilizadas e manejadas principalmente para a produção de própolis verde na região do município de Bambuí, estado de Minas Gerais. Durante a primeira visita observamos ótimas características particulares do sistema produtivo como colmeias padronizadas, suportes individuais para cada colmeia, mão de obra suficiente, alimentação artificial em épocas de escassez de alimento, além da seriedade e profissionalização da apicultura nestes apiários. As características observadas no sistema produtivo cumpriram inicialmente os critérios de seleção para a estruturação e implantação do programa de melhoramento genético. Durante as primeiras visitas pudemos notar grande interesse por parte do proprietário em estabelecer e dar início a um programa de seleção das colmeias para aumentar os índices de produção de própolis verde. Foi assim que demos

início a esta parceria e após o primeiro contato produtor-pesquisador determinamos os objetivos deste trabalho.

Assim esta pesquisa baseou-se na seleção e melhoramento genético das colmeias produtoras de própolis verde na região de Bambuí, graças à parceria o trabalho foi iniciado em 2010 e atualmente continua sendo avaliado. A localização de todos os apiários visitados durante este projeto em relação a USP de Ribeirão Preto pode ser observada na Figura 10.

Figura 10. Localização dos apiários visitados durante a execução deste trabalho em relação à Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SELEÇÃO QUE FORAM UTILIZADAS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO

Baseados nos trabalhos de melhoramento genético, que estão sendo desenvolvidos na Argentina, Estados Unidos e México, consideramos três

características de principal importância na seleção do material utilizado durante este programa (comportamento higiênico, taxa de infestação de *Varroa* e incidência de *Nosema*), já que nosso objetivo era selecionar colmeias que apresentassem excelentes características de sanidade, além de apresentar excelentes índices de produção. Assim, foi realizado um estudo prévio em colmeias em produção de própolis verde na região de Jacuí, e colmeias para a produção de mel na região de Ouro Fino com o objetivo de avaliar estas características em campo.

4.2.1 Avaliação do comportamento higiênico em colmeias produtoras de própolis verde na região de Jacuí

O comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* é um tema que ganhou muita importância nas últimas décadas. Quando falamos que uma colmeia é higiênica nos referimos na capacidade que as abelhas possuem em monitorar, identificar e retirar crias mortas das células operculadas. Com o impacto da perda e desaparecimento das abelhas a nível mundial, o uso de características ligadas à sanidade de abelhas tem se tornado uma ferramenta fundamental na seleção de colmeias nos programas de melhoramento genético.

Foram realizadas duas visitas para realizar as observações das diferentes características em algumas das colmeias em produção. A primeira observação realizada na região de Jacuí foi durante o mês de junho, no final da temporada de produção de própolis. De um total de 80 colmeias, apenas 51 foram avaliadas devido a pouca quantidade de cria para realização dos testes, colmeias muito fracas, e em alguns casos, colmeias que tinham os favos trançados entre si. Observamos que 49% destas colmeias apresentaram comportamentos higiênicos no intervalo de 90 – 100%; 39% destas colmeias apresentaram comportamentos higiênicos no intervalo de 60 – 89%; e 12% destas colmeias apresentaram comportamentos higiênicos inferiores a 59% (Tabela 1). Foi constatado, durante a avaliação em campo, que as colmeias que apresentaram valores intermediários e inferiores de comportamento higiênico eram colmeias que não estavam produzindo uma boa quantidade e qualidade de própolis.

Tabela 1. Porcentagem de colmeias segundo seu comportamento higiênico na região de Jacuí, primeira observação.

% Comportamento higiênico	< 59%	60 - 89%	90 - 100%
Número de colmeias	6	20	25
Porcentagem de colmeias	12	39	49

A segunda observação foi realizada no início da safra de produção de própolis, no mês de novembro do ano 2010. Durante o manejo em campo observamos que a maioria das colmeias apresentavam células reais, indicando a ocorrência natural de troca de rainhas, fato que impossibilitou gerar uma média do comportamento higiênico por colmeia durante as duas coletas. A segunda observação mostrou uma alta porcentagem de colmeias com valores altos de comportamento higiênico, observando que 86% destas colmeias apresentaram comportamentos higiênicos no intervalo de 90 – 100%; 10% destas colmeias apresentaram comportamentos higiênicos no intervalo de 60 – 89%; e somente 4% destas colmeias apresentaram comportamentos higiênicos inferiores a 59% (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de colmeias segundo seu comportamento higiênico na região de Jacuí, segunda observação.

% Comportamento higiênico	< 59%	60 - 89%	90 - 100%
Número de colmeias	2	5	44
Porcentagem de colmeias	4	10	86

Mesmo com algumas colmeias tendo realizado a troca de rainhas durante o intervalo entre as duas observações, realizamos a comparação das médias de todas as colmeias durante a primeira e segunda observação para o comportamento higiênico. O teste de comparação de médias *t student*, não encontrou diferenças significativas entre as duas observações feitas com um nível de significância de 95% ($t\text{-value} = 1,593427$; $(p) = 0,115702$) (Figura 11). Durante avaliação desta característica encontramos valores de $90,72 \pm 20,36 \pm 3,44$ (média $\pm$ Desvio padrão

(DP) $\pm$ Erro padrão (EP)) durante a primeira observação e valores de $81,80 \pm 26,14 \pm 4,442$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) para a segunda.

Figura 11. Comportamento higiênico durante as duas observações realizadas nos apiários de Jacuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

4.2.2 Avaliação da taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas na região de Jacuí

Além da característica de comportamento higiênico, consideramos a taxa de infestação de *Varroa* como uma característica de avaliação e seleção de colmeias importante durante a implantação e desenvolvimento do programa de melhoramento genético com abelhas africanizadas. É amplamente conhecido no setor apícola internacional, que abelhas *Apis mellifera* africanizadas têm certa tolerância ao acaro *Varroa*, não sendo obrigatório o uso de pesticidas para seu controle (De Jong *et al.*, 1984; Moretto *et al.*, 1991; Page, 1998; Martin e Medina, 2004). Porém, na prática

encontramos uma ampla variabilidade na taxa de infestação de *Varroa* nas colmeias africanizadas, causando mortalidade sob altas taxas de infestação (Mattos e Chaud-Netto, 2012). Embora estas abelhas apresentem tolerância a este acaro, podemos guiar a seleção para colmeias que apresentem baixas taxas de infestação, evitando possíveis problemas sanitários no futuro.

Na primeira observação (Tabela 3) podemos notar que 55,31% destas colmeias apresentaram uma taxa de infestação menor que 1%; 38,30% destas colmeias apresentaram uma taxa de infestação no intervalo de 1 – 5%; e somente 6,38% destas colmeias apresentaram uma taxa de infestação no intervalo de 5 – 8%.

Tabela 3. Porcentagem de colmeias segundo a infestação de *Varroa* na região de Jacuí durante a primeira observação.

% de Infestação de <i>Varroa</i>	< 1%	1 - 5%	5 - 8%
Número de colmeias	26	18	3
Porcentagem de colmeias	55,31	38,30	6,38

Na segunda observação (Tabela 4) observamos que somente quatro colmeias apresentaram uma taxa de infestação menor que 1%; a grande maioria das colmeias (31) apresentou uma taxa de infestação no intervalo de 1 – 5%; e 25,53% destas colmeias apresentaram uma taxa de infestação acima 5%.

Tabela 4. Porcentagem de colmeias segundo a infestação de *Varroa* na região de Jacuí durante a segunda observação.

% de Infestação de <i>Varroa</i>	< 1%	2 - 5%	>5%
Número de colmeias	4	31	12
Porcentagem de colmeias	8,51	65,96	25,53

Ao analisar as médias da taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas durante as duas observações, o teste de comparação de médias *t student*, encontrou que existem diferenças significativas entre as duas amostragens (t-value=-4,52782; (p)= 0,000018) (Figura 12).

Figura 12. Taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas expressa em porcentagem durante as duas coletas nos apiários de Jacuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Durante as observações encontramos que a taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas foi de $1,65 \pm 1,92 \pm 0,28$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP); $3,58 \pm 2,22 \pm 0,32$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) durante a primeira e segunda observação respectivamente, indicando um aumento na média da taxa de infestação em abelhas adultas. Segundo Moretto e Mello (1999), a taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas de uma colmeia pode oscilar ao longo do tempo, assim como foi observado durante estas avaliações.

Apesar de termos encontrado diferenças entre as observações, as médias encontradas para cada observação são consideradas como valores baixos de infestação. Alguns autores mencionam que a baixa infestação em abelhas africanizadas pode ser resultado das condições climáticas, da baixa fertilidade deste parasita na cria de abelhas operárias e ao comportamento de limpeza e

comportamento higiênico destas abelhas em particular (Moretto e Mello, 2001; Calderón *et al.*, 2010).

4.2.3 Incidência de *Nosema* em colmeias produtoras de própolis verde na região de Jacuí e colmeias produtoras de mel na região de Ouro Fino

Nosema é um tipo de patógeno emergente e altamente virulento em abelhas *Apis mellifera* e têm se propagado rapidamente nas últimas décadas. Após as primeiras notícias sobre o desaparecimento das colmeias, esse microsporídeo vem sendo motivo de inúmeras pesquisas a nível mundial. Embora não exista uma evidência conclusiva que afirme uma correlação entre o desaparecimento das abelhas e níveis altos de incidência de *Nosema* (Paxton, 2010; Forsgren e Fries, 2010; Fries 2010), consideramos que esta característica de sanidade complementar a seleção das colmeias para o programa de melhoramento genético.

O resultado da taxa de infestação de *Nosema* em abelhas adultas coletadas em abelhas produtoras de própolis na região de Jacuí apresentou uma baixa presença do esporo de *Nosema*. Quando analisamos as médias da incidência de *Nosema* durante as duas observações, o teste de comparação de médias *t student*, encontrou diferenças significativas entre as duas amostragens ($t\text{-value} = 2,563186$; $(p) = 0,012070$), observando que houve uma diminuição significativa na média durante a segunda observação (Figura 13).

Figura 13. Quantidade estimada de esporos de *Nosema*/abelha durante as duas observações realizadas na região de Jacuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Durante a segunda observação 96% das colmeias analisadas não apresentaram a presença do esporo, somente três colmeias do total de amostras analisadas apresentaram a presença do esporo e este foi encontrado em baixas concentrações. Das amostras que apresentaram o esporo temos 105×10^4 , 65×10^4 e 45×10^4 esporos por ml ou esporos por abelha adulta.

Adicionalmente analisamos um total de 60 colmeias localizadas na região de Ouro Fino e após os respectivos testes somente encontramos uma colmeia com a presença de esporos de *Nosema*, e uma incidência de 210×10^4 esporos/ml ou esporos por abelha adulta. Podemos considerar que os valores de infestação de *Nosema* podem variar dentro da mesma colmeia ao longo do tempo e é considerada uma infestação alta quando quantificamos mais de dez milhões de esporos por abelha, ou seja, 1.000×10^4 (Oliver, 2008; 2011).

Após as avaliações das três características, pudemos organizá-las de acordo com sua importância dentro do nosso programa de melhoramento genético. Assim determinamos o comportamento higiênico como principal característica a se avaliar, seguida da taxa de infestação de *Varroa* e posteriormente pela incidência de *Nosema*. Os dados coletados na região de Jacuí e Ouro Fino referentes ao comportamento higiênico, infestação de *Varroa* e incidência de *Nosema* foram dados preliminares e devido às condições de manejo das colmeias não foi possível continuar com os experimentos com estes apicultores.

4.3 AVALIAÇÃO DAS COLMEIAS DOS APIÁRIOS DE BAMBUÍ E SELEÇÃO DAS MATRIZES DA PRIMEIRA GERAÇÃO

As 50 colmeias disponibilizadas para este trabalho, que foram selecionadas previamente pelo grupo de apicultores responsáveis pelo manejo em campo, foram individualmente transportadas e instaladas em cinco apiários (com dez colmeias cada) para facilitar os testes de comportamento higiênico e coleta do material para estimar a taxa de infestação de *Varroa* e a incidência de *Nosema*. Estes apiários encontravam-se relativamente perto entre si, isto permitiu diminuir as diferenças ambientais entre eles durante as análises e coleta de material, além de facilitar o manejo e diminuir o tempo de trabalho nestas colmeias (Figura 14).

Após a instalação destas colmeias, foram feitas duas observações com um intervalo de tempo de dois meses para avaliar as três características utilizadas para a seleção. O nosso objetivo era realizar o máximo de observações possíveis nestas colmeias, mas, devido à falta de tempo e as condições ambientais somente foi possível realizar duas observações.

Figura 14. Imagem obtida através dos pontos de GPS de cada um dos cinco apiários experimentais e a sua localização mediante o programa Google Earth.

4.3.1 Avaliação do comportamento higiênico nas colmeias produtoras de própolis verde

Ao analisar os dados coletados durante a primeira observação, encontramos que 40,4% das colmeias iniciais apresentaram um excelente comportamento higiênico (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de colmeias segundo seu comportamento higiênico na região de Bambuí, primeira seleção.

% Comportamento higiênico	< 59%	60 - 89%	90 - 100%
Número de colmeias	13	15	19
Porcentagem de colmeias	27,66	31,91	40,43

Do grupo inicial selecionado (50 colmeias) foram analisadas 47 colmeias quanto ao comportamento higiênico, já que foi impossível realizar este tipo de

metodologia em três colmeias do grupo inicial devido a pouca quantidade de cria ou favos trançados. Ao realizar o teste de comparação de médias *t student*, não encontramos diferenças significativas entre as duas observações feitas com um nível de significância de 95% ($t\text{-value} = -0,127642$; $(p) = 0,898711$) (Figura 15).

Durante avaliação do comportamento higiênico encontramos valores de $70,57 \pm 31,47 \pm 4,59$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) durante a primeira observação e valores de $71,42 \pm 32,70 \pm 4,77$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) para a segunda.

Figura 15. Comportamento higiênico nas colmeias produtoras de própolis verde durante as duas observações agrupadas nos cinco apiários localizados na região de Bambuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Ao comparar as médias do comportamento higiênico de cada apiário à análise de variância não revelou diferenças significativas entre eles ($F=0,4723$; $(p)=$

0,7558). Na Figura 16 podemos observar a distribuição das médias do comportamento higiênico em cada um dos cinco apiários.

Figura 16. Comportamento higiênico em cada um dos cinco apiários experimentais localizados na região de Bambuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

4.3.2 Avaliação da taxa de infestação de Varroa

Foram feitas duas observações com um intervalo de tempo de dois meses com o objetivo de observar a média da porcentagem de infestação de *Varroa* em abelhas adultas e assim usar este valor para a seleção. Segundo o teste de comparação de médias *t student*, existem diferenças significativas entre as duas amostragens ($t\text{-value} = -3,80123$; $p = 0,000253$). Podemos ver que na segunda observação existe um aumento na média de infestação nas colmeias (Figura 17).

Durante as duas observações as colmeias apresentaram uma taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas de $5,94 \pm 3,75 \pm 0,54$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP); $9,50 \pm 5,39 \pm 0,77$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) durante a primeira e segunda observação respectivamente, indicando um aumento na média da taxa de infestação em abelhas adultas durante a segunda avaliação das colmeias analisadas.

Figura 17. Taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas durante as duas observações nas colmeias localizadas na região de Bambuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Ao comparar as médias das duas observações podemos observar que cada um dos cinco apiários apresentou um aumento na média em comparação à primeira observação (Figura 18).

Figura 18. Taxa de infestação de *Varroa* nos cinco apiários experimentais. As barras em branco e cinza nos indicam a primeira e segunda observação respectivamente. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Estes resultados são similares aos encontrados no estudo prévio realizado na região de Jacuí, onde observamos um aumento da taxa de infestação de *Varroa* nas colmeias avaliadas. A Figura 18 nos revela um aumento em cada um dos cinco apiários experimentais utilizados durante a realização destas avaliações.

Ao comparar as médias de infestação de *Varroa* em abelhas adultas em cada um dos cinco apiários experimentais, encontramos diferenças significativas entre eles ($F = 2,6606$; $p = 0,0450$). Na Figura 19 podemos observar as médias de infestação de cada um destes apiários. O teste de Tukey somente revelou que existem diferenças entre as médias do apiário A e o apiário E com um nível de significância de $p = 0,042922$.

Figura 19. Taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas nos cinco apiários experimentais localizados na região de Bambuí. * Existem diferenças significativas entre estes apiários. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Ao comparar o comportamento higiênico e a infestação de *Varroa* em abelhas adultas podemos ver que existe uma correlação moderada negativa entre estas variáveis ($r = -0,3097$; $p = 0,0341$).

4.3.3 Avaliação da incidência de *Nosema*

Também foram realizadas duas observações com um intervalo de tempo de dois meses para avaliar a incidência de *Nosema* em abelhas adultas. Segundo o teste de comparação de médias *t student*, não existem diferenças significativas entre as médias das duas amostragens ($t\text{-value} = 0,485529$; $p = 0,628407$) (Figura 20).

Figura 20. Quantidade de esporos de *Nosema*/abelha durante as duas observações nas colmeias localizadas na região de Bambuí. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

A análise de variância também revelou que não existem diferenças significativas entre os diferentes apiários ($F= 2,03228$; $p= 0,106332$) na quantidade de esporos *Nosema*/abelha. Na Figura 21 podemos observar os resultados em cada um dos apiários, evidenciando um grande desvio padrão para os apiários A, B, e D, acreditamos que a análise estatística não encontrou diferenças significativas devido a estes desvios.

Ao observar detalhadamente a incidência de *Nosema* encontramos uma variação muito ampla entre as colmeias durante cada uma das observações realizadas, com valores de 0 há 2.600.000 esporos/abelha, 324.490 ± 671.296 (média $\pm$ DP) esporos de *Nosema*/abelha durante a primeira observação. Já na

segunda observação observamos valores de 0 há 4.250.000 esporos/abelha, 259.375 ± 768.575 (média $\pm$ DP) esporos de *Nosema*/abelha.

Figura 21. Quantidade estimada de esporos de *Nosema*/abelha em abelhas adultas em cada um dos cinco apiários experimentais. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Após as avaliações das características de seleção, as colmeias passaram pela temporada de chuvas e período de falta de alimento que na região ocorre entre os meses agosto a setembro. Após este período designado como entre safra da produção de própolis observamos uma perda de colmeias de 26%, fato comumente observado nos apiários da região. A partir das colmeias restantes, e se baseando nas melhores médias obtidas para as duas observações de cada uma das características, escolhemos as melhores colmeias para ser a base de nosso programa de melhoramento genético.

4.3.4 Seleção de colmeias e determinação das linhagens genéticas

Das colmeias avaliadas selecionamos nove colmeias, as respectivas rainhas destas colmeias foram retiradas e transportadas ao apiário experimental da USP de Ribeirão Preto para dar início à produção controlada de rainhas. Na Tabela 6, podemos observar a média dos valores das diferentes características avaliadas nas colmeias selecionadas.

Tabela 6. Características utilizadas na seleção do material e seus respectivos valores. (*) Indica as colmeias utilizadas e selecionadas como linhagens genéticas. (ª) Colmeias que perderam as respectivas rainhas durante o transporte e introdução.

NUMERAÇÃO DAS RAINHAS TRANSPORTADAS À USP RIBEIRÃO PRETO			
Colmeia	Comportamento higiênico	Taxa infestação Varroa	Incidência de Nosema
2*	96,391	4,329	0
15	98,958	5,686	0
16	100	9,414	2.550.000
24ª	100	2,606	150.000
25*	98,295	1,575	325.000
33*	98,485	4,455	275.000
36ª	100	2,353	750.000
39ª	100	5,633	0
41	100	5,925	0

As rainhas virgens produzidas a partir das rainhas selecionadas das colmeias número 2, 25, e 33 receberam uma marcação laranja, verde e azul, respectivamente. Diferenciando desta forma as três linhagens genéticas.

4.4 AVALIAÇÃO DAS COLMEIAS DOS APIÁRIOS E SELEÇÃO DAS MATRIZES DURANTE A SEGUNDA GERAÇÃO

Rainhas virgens filhas das colmeias selecionadas na primeira geração foram enviadas via correios (Sedex) ao apicultor e distribuídas em diversos apiários para a produção de própolis verde. Posteriormente, com o objetivo de coletar as

informações e avaliar o máximo de colmeias em produção, selecionamos o maior número de apiários possíveis. Para esta seleção nos baseamos na facilidade de manejo e recursos humanos para a realização dos testes em campo, na Figura 22 podemos ver a localização destes apiários. Adicionalmente, tentamos selecionar apiários que tivessem o máximo de rainhas previamente enviadas e já estabelecidas.

Figura 22. Apiários de produção utilizados para a avaliação da coleta de própolis. Imagem obtida através dos pontos de GPS de cada apiário e a sua localização mediante o programa Google Earth.

Na Tabela 7 observamos a relação de colmeias com rainhas selecionadas e não selecionadas nos dez apiários. Embora a porcentagem de troca de rainhas nestes apiários não tenha superado 25% do total de colmeias, sugerido por Vencovsky e Kerr (1982), a porcentagem de aceitação das rainhas virgens enviadas por correio foi moderadamente aceitável. Se analisarmos que foi a primeira prática de troca de rainhas realizada por estes apicultores podemos afirmar que uma

aceitação de 72,34% é um bom resultado, motivando o grupo a aperfeiçoar esta prática e assim aumentar esta porcentagem.

Tabela 7. Relação de colmeias com rainhas selecionadas e não selecionadas nos dez apiários utilizados para a avaliação da produção de própolis por colmeia.

Número de apiários	10
Número total de rainhas	263
Quantidade de rainhas não selecionadas	216
Quantidade de rainhas selecionadas	47
Porcentagem de troca de rainhas	17,87
Quantidade de rainhas aceitas	34
Porcentagem de aceitação	72,34

O tipo de sistema utilizado para a produção de própolis foi o método de sarrafo, o mesmo considerado por Lima (2006) como o método mais utilizado na produção de própolis comercial. Este sistema tem se mostrado muito eficiente nos apiários comerciais, facilitando tanto a coleta como a produção em geral, além de ser um sistema bastante acessível pelo seu baixo custo. Na Figura 23 podemos observar uma colmeia em produção e o método de produção de própolis por meio de sarrafos. As setas indicam os sarrafos localizados na parte posterior da colmeia, na imagem podemos ver também dois sarrafos localizados na parte frontal da mesma colmeia. Esta colmeia de produção foi denominada com quatro lâminas, duas lâminas de cada lateral da colmeia.

Figura 23. Colmeia de produção de própolis verde, as setas indicam os sarrafos utilizados entre as partes moveis da colmeia, criando espaços laterais usados para a coleta de própolis.

4.4.1 Avaliação da produção de própolis verde por colmeia

Ao analisar a produção de própolis nos dez apiários comerciais (263 colmeias) encontramos colmeias produzindo duas, quatro ou seis lâminas por colmeia. Na Figura 24 podemos ver a distribuição destas colmeias nos dez apiários avaliados. Nestes apiários encontramos 41,6% das colmeias em produção com duas lâminas, 46,76% das colmeias com quatro lâminas e 11,78% das colmeias com seis lâminas.

Figura 24. Quantidade de colmeias nos dez apiários selecionados para a avaliação da produção de própolis e a quantidade de colmeias com duas, quatro ou seis lâminas em produção respectivamente.

A quantidade de lâminas influenciou o valor de própolis coletado em cada um destes grupos de colmeias, assim quando agrupamos as colmeias temos em média uma produção de própolis de 56 gramas, 82,7 gramas e 115,4 para colmeias com duas, quatro e seis lâminas respectivamente (Figura 25). A análise de variância revelou diferenças significativas entre estes grupos ($F = 25,4301$; $p = 0,000000$). O teste de comparações múltiplas Tukey revelou diferenças significativas entre as médias de duas e quatro lâminas ($p = 0,000031$; duas e seis lâminas ($p = 0,000022$ e entre quatro e seis lâminas ($p = 0,000599$).

Figura 25. Produção de própolis em gramas de acordo com a quantidade de lâminas produzidas por cada colmeia em produção. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Para conhecer a produção de própolis em cada colmeia foram realizadas três coletas com intervalos de um mês. Quando comparamos a produção de própolis entre as três coletas, observamos que as médias de produção têm um comportamento de diminuição. Isto está relacionado com o final da safra de produção de própolis. A análise de variância encontrou diferenças significativas entre as diferentes coletas quando elas foram comparadas entre si ($F=5,6718$; $p=0.00358$), o teste de Tukey revelou diferenças significativas entre as médias da coleta A e a coleta C ($p=0,002382$) (Figura 26).

Figura 26. Produção de própolis durante as diferentes coletas. * Existem diferenças significativas entre estes grupos. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Ao analisar as médias da própolis produzida em cada apiário durante as três coletas, a ANOVA encontrou que existem diferenças significativas nas médias de produção de própolis quando eles foram comparados entre si ($F= 5,2676$; $p= 0,00000$) (Figura 27).

Figura 27. Produção de própolis nos dez apiários. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

O teste de comparações múltiplas de Tukey nos indica entre quais apiários existe diferença significativas ao comparar as respectivas médias (Tabela 8).

Tabela 8. Teste de comparações múltiplas de Tukey, indicando na primeira fileira em negrito as médias de produção de própolis para cada apiário (A-J). Os valores com * (valores p) indicam que existe diferença entre as médias dos apiários em comparação.

	61,198	74,96	121,45	70,333	72,163	52,88	55,733	80,397	75,5	95,853
A		0,983	0,000	0,999	0,993	1,000	1,000	0,861	0,988	0,132
B	0,983		0,008	1,000	1,000	0,761	0,880	1,000	1,000	0,816
C	*0,000	*0,008		0,002	0,001	0,000	0,000	0,033	0,028	0,571
D	0,999	1,000	*0,002		1,000	0,935	0,979	0,999	1,000	0,591
E	0,993	1,000	*0,001	1,000		0,789	0,908	0,999	1,000	0,525
F	1,000	0,761	*0,000	0,935	0,789		1,000	0,448	0,824	0,022
G	1,000	0,880	*0,000	0,979	0,908	1,000		0,611	0,915	0,045
H	0,861	1,000	*0,033	0,999	0,999	0,448	0,611		1,000	0,965
I	0,988	1,000	*0,028	1,000	1,000	0,824	0,915	1,000		0,899
J	0,132	0,816	0,571	0,591	0,525	*0,022	*0,045	0,965	0,899	

Ao observar a produção de própolis nos dez apiários podemos notar que 32,06% das colmeias produzem menos de 50 gramas, 37,41% das colmeias produzem entre 50 e 100 gramas e 30,53% produzem mais de 100 gramas (Tabela 9). Os dados de produção encontrados nos revelam uma alta porcentagem de colmeias não produtivas, chegando a quase um terço do tamanho da amostra. Os dados de produção são referentes a 262 colmeias, já que uma das colmeias morreu durante este período. Lima (2006) comentou que a produção de própolis está muito influenciada por colmeias não produtivas que deslocam a média a valores mais baixos. Este mesmo autor também menciona que o melhoramento genético deve ser realizado neste tipo de material, homogeneizando assim a produção de própolis e aumentando a média de produção por apiário.

Tabela 9. Porcentagem de colmeias segundo a produção de própolis verde durante as três observações.

Produção de própolis (g)	<50 gramas	50 – 100 gramas	>100 gramas
Número de colmeias	84	98	80
Porcentagem de colmeias	32,06	37,41	30,53

A produção de própolis pode ser influenciada pela altitude do local onde as colmeias foram instaladas. Segundo alguns estudos realizados por Lima (2006), apiários com altitudes acima de 1.300 metros produzem uma menor quantidade de própolis em comparação a apiários instalados entre 800 e 1.100 metros. Quando observamos a altitude dos respectivos apiários de produção e a média de produção de própolis durante as três coletas, podemos observar que não existe uma correlação significativa entre estas variáveis ($r= 0,0986$; $(p)= 0,7864$) provavelmente devido aos poucos apiários analisados. Embora nossos resultados não tenham sido conclusivos em relação à correlação entre a altitude e a produção de própolis, esperamos ampliar nossa amostra em estudos futuros. Na figura 28 podemos observar detalhadamente os apiários com suas respectivas altitudes e média de produção de própolis por apiário.

Figura 28. Altitude (metros) e produção de própolis (gramas) nos respectivos apiários de produção.

Quando observamos os valores de produção de própolis das colmeias com rainhas filhas do material selecionado na primeira fase, podemos notar que todas as colmeias apresentaram valores acima da média de produção de cada apiário respectivamente, confirmando assim a necessidade de trabalhar com rainhas filhas de colmeias previamente selecionadas (Tabela 10). Nesta tabela também podemos observar o tipo de marcação utilizado para identificar a descendência da linhagem materna selecionada durante as observações da primeira geração.

Tabela 10. Valores da média de produção de própolis em gramas das rainhas filhas do material selecionado durante a primeira geração e as médias de produção de própolis e desvio padrão de cada apiário respectivamente.

Apiário	Colmeia Número	Marcação	Produção em gramas	Média do Apiário	Desvio Padrão
A	4	Azul	86,00	61,20	44,63
A	6	Azul	126,00		
A	11	Azul	65,67		
A	19	Azul	73,33		
A	23	Azul	79,33		
A	25	Verde	69,67		
B	2	Azul	129,33	74,96	56,32
B	4	Verde	103,67		
B	12	Azul	104,00		
B	23	Azul	100,00		
B	24	Azul	83,67		
B	25	Azul	182,67		
D	1	Azul	89,00	70,33	30,11
D	2	Azul	76,33		
D	3	Azul	99,33		
D	4	Laranja	71,33		
D	8	Azul	149,33		
D	11	Azul	90,33		
D	12	Azul	82,00		
D	13	Verde	70,67		
D	14	Verde	71,00		
D	15	Verde	102,67		
D	17	Laranja	72,33		
D	20	Verde	71,00		
E	24	Verde	87,66	72,16	41,89
E	25	Verde	84,67		
E	32	Laranja	140,00		
E	37	Verde	85,33		
E	40	Verde	92,00		
E	41	Verde	174,67		
F	4	Laranja	58,67	52,88	27,83
F	9	Laranja	113,33		
F	11	Laranja	59,00		
I	7	Laranja	88,33	75,50	34,50

4.4.2 Seleção do material segundo a produção de própolis

Das 263 colmeias monitoradas nos dez apiários de produção foram selecionadas um total de 60 colmeias, esta seleção foi realizada normalizando os valores de produção das respectivas colmeias a valores **Z** (Ver Apêndice).

Das 34 colmeias com rainhas filhas das colmeias selecionadas, 13 colmeias apresentaram excelentes coletas de própolis, conformando desta forma o grupo de 60 colmeias selecionadas. No apêndice também identificamos a linhagem genética da qual cada rainha respectivamente é filha.

4.4.3 Avaliação do comportamento higiênico nas colmeias produtoras de própolis verde

Durante o primeiro, segundo e terceiro teste de comportamento higiênico só foram analisadas respectivamente 50, 47 e 40 colmeias do total das 60 colmeias previamente selecionadas para avaliação das diversas características. Essa diminuição foi devido à condição trançada dos favos de cria e posteriormente à falta de cria operculada suficiente para realizar o teste de perfuração. Durante estas observações encontramos valores de $73,30 \pm 31,95 \pm 4,52$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP); $72,92 \pm 29,72 \pm 4,33$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) e $71,27 \pm 27,13 \pm 4,40$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) durante a primeira, segunda e terceira observação respectivamente.

Ao observarmos o comportamento higiênico de forma geral, encontramos alta variabilidade entre as colmeias, cabe ressaltar que 37,5% das colmeias avaliadas durante as três observações apresentaram um excelente comportamento higiênico como podemos ver na Tabela 11.

Tabela 11. Porcentagem de colmeias segundo seu comportamento higiênico nas colmeias selecionadas na segunda geração.

% Comportamento higiênico	< 59%	60 - 89%	90 - 100%
Número de colmeias	11	14	15
Porcentagem de colmeias	27,5	35	37,5

Ao comparar as médias do comportamento higiênico entre as diferentes coletas a ANOVA não encontrou diferenças significativas ($F=0,0909$; $p=0,91320$) (Figura 29).

Figura 29. Avaliação do comportamento higiênico das colmeias utilizadas na segunda geração. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

4.4.4 Avaliação da taxa de infestação de *Varroa*

Foram feitas três observações com um intervalo de tempo de um mês com o objetivo de observar a média da porcentagem de infestação de *Varroa* em abelhas adultas e assim usar este valor para a seleção. Os dados referentes a esta avaliação são baseados em 45 colmeias.

Ao analisar os dados coletados durante as três observações, encontramos valores relativamente altos de infestação de *Varroa* em abelhas adultas, chegando até 27% em uma colmeia durante a terceira observação. Os valores registrados durante as três observações foram: $7 \pm 3,74 \pm 0,56$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP); $6,06 \pm 3,21 \pm 0,48$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) e $8,44 \pm 5,93 \pm 0,88$ (média $\pm$ DP $\pm$ EP) durante a primeira, segunda e terceira observação respectivamente.

Segundo a análise de variância não existem diferenças significativas entre as três amostragens ($F= 2,4959$; $(p)= 0,086109$). Podemos ver que na segunda observação existe uma diminuição na média de taxa de infestação de *Varroa*, porém, aumentando novamente durante a terceira observação (Figura 30).

Figura 30. Taxa de infestação de *Varroa* em abelhas adultas nas colmeias utilizadas na segunda geração. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

Ao estimar a correlação entre o comportamento higiênico e a infestação de *Varroa* em abelhas adultas encontramos mais uma vez uma correlação negativa moderada entre estas variáveis ($r = -0,363191$; $p = 0,021100$), este valor é muito similar ao encontrado durante as avaliações realizadas durante a primeira avaliação de colmeias.

4.4.5 Avaliação da incidência de *Nosema*

Foram feitas três observações com um intervalo de tempo de um mês com o objetivo de observar a média da incidência de *Nosema* em abelhas adultas e assim

usar este valor para a seleção. Os dados referentes a esta avaliação são baseados em 45 colmeias as mesmas utilizadas para avaliar a taxa de infestação de *Varroa*.

Ao observar detalhadamente a incidência de *Nosema* encontramos uma variação muito ampla entre as colmeias selecionadas. Com valores de $466.296,3 \pm 1.239.086$ (média $\pm$ DP) esporos de *Nosema*/abelha. Chegando a apresentar um valor máximo de 14.450.000 esporos/abelha. A análise de variância não encontrou diferenças significativas entre as três amostragens ($F= 0,1099$; $(p)= 0,8960$) (Figura 31).

Figura 31. Quantidade de esporos de *Nosema*/abelha nas colmeias utilizadas na segunda geração. (EP) Erro padrão. (DP) Desvio padrão.

4.4.6 Seleção de colmeias e determinação das linhagens genéticas

Após realizadas as avaliações das três características utilizadas para a seleção do material genético, foram calculadas as médias de cada colmeia para cada uma das três características. Do total de colmeias avaliadas, selecionamos um total de dez colmeias (Tabela 12), das quais foram retiradas suas rainhas para serem transportadas ao apiário experimental da USP de Ribeirão Preto. Notamos que seis destas rainhas pertencem às linhagens selecionadas durante a primeira geração.

Tabela 122. Características utilizadas na seleção do material a ser selecionado e seus respectivos valores.

Api	Colm	Marcação	Produção de própolis	Comportamento higiênico (%)	Taxa infestação de Varroa (%)	Nosema Esporos/abelhas
A	5	Sem marca	170,67	100	1,68	750000
B	2	Azul	129,33	100	4,40	0
B	4	Verde	103,67	100	1,46	0
B	23	Azul	100,00	90,19	3,27	0
B	25	Azul	182,67	100	4,49	0
D	3	Azul	99,33	100	6,90	0
E	10	Sem marca	109	98,17	3,59	0
F	9	Laranja	113,33	95,45	4,98	0
G	4	Sem marca	90,33	100	3,81	0
H	4	Sem marca	152,67	100	6,51	0

Durante este período de observação, coleta e avaliação das colmeias nos dez apiários utilizados durante esta fase do trabalho, registramos uma mortalidade de colmeias de 23,57%, valor é ainda considerado alto e será cuidadosamente analisado e controlado no futuro. Embora esta porcentagem seja menor à observada durante a primeira seleção do material genético que foi de 27%.

4.5 PROCEDIMENTO DE INSEMINAÇÃO

Atualmente a técnica de inseminação instrumental já é considerada uma técnica rotineira e muito bem desenvolvida no departamento de Genética da USP de Ribeirão Preto sem nenhuma barreira ou dificuldade nos períodos pré e pós inseminação das rainhas. Isso se deve às diversas inseminações realizadas durante o transcurso deste trabalho, que possibilitaram aperfeiçoar e desenvolver habilidades suficientes para realização da técnica de inseminação instrumental.

As inseminações realizadas nos permitiram conhecer o comportamento das rainhas inseminadas nas respectivas colmeias. Na Figura 32 observamos o padrão de postura de uma rainha inseminada instrumentalmente durante a realização deste trabalho, apresentando um excelente padrão de cria, o que nos permite garantir a utilização da técnica pode e deve ser utilizada em colmeias produtivas. Isto nos reforça a padronização do trabalho de manejo em campo para poder trabalhar com um material muito mais selecionado.

Figura 32. Padrão de postura de uma rainha inseminada após de aproximadamente cinco meses da inseminação.

4.6 NÚCLEOS DE FECUNDAÇÃO

Dos três modelos de núcleos utilizados e testados concluímos que o modelo 3 (colmeia com duas divisões e três núcleos de três favos cada) foi o que apresentou melhores resultados (>90% de aceitação e fecundação das rainhas).

Este tipo de modelo maximiza o material biológico utilizado para a fecundação de rainhas. Também observamos que utilizando este modelo podemos incrementar facilmente o número de núcleos por apiário de fecundação sem ter uma saturação de abelhas na área. Ao utilizar compartimentos para o uso de três favos

ampliamos o espaço interno do núcleo, isto facilita a procura da rainha nestes núcleos além de manter uma boa população em cada uma destas unidades.

Outra vantagem deste tipo de modelo, é que o apicultor facilmente pode modificar o material já usado nos apiários de produção para montar este tipo de modelo de núcleo de fecundação. Isto diminui os custos adicionais de aquisição de novo material apícola. Caso este núcleo não seja mais utilizado pelo apicultor, seus favos podem ser facilmente reutilizados em colmeias de produção novamente. Desse modo, não existe perda na inversão, pois o tipo de favos usados é igual ao normal de uma câmara de cria, tal fato também facilita o manejo na hora de reforçar algum destes núcleos. Adicionalmente o interior de cada compartimento foi pintado com tinta branca, facilitando a procura da rainha ao interior dos mesmos. Cada lateral da colmeia também recebeu tinta de cores diferentes para facilitar a orientação das rainhas durante os respectivos voos de acasalamento.

O modelo 1, apresentou porcentagens de aceitação e fecundação de rainhas normais (> 85%), porém na hora de realizar a busca da rainha, o espaço do núcleo contendo só dois favos dificultou a tarefa. Por esta razão este núcleo foi descartado como modelo de núcleo de fecundação, já que dificulta o trabalho do apicultor na hora da busca da rainha. Observamos também nestes núcleos que a população de abelhas facilmente pode aumentar, facilitando a enxameação destas abelhas, gerando assim perdas para o apicultor.

O modelo 2, é um modelo que utiliza um material específico enquanto a suas medidas. Para este modelo o apicultor precisa adquirir um tipo específico de material, além de utilizar um tipo específico de manejo. Este tipo de núcleo pode ser muito utilizado em colmeias com abelhas europeias, porém, em abelhas africanizadas não consideramos que seja o modelo que mais se adapta aos apicultores brasileiros.

5. CONCLUSÕES

A produção de própolis na apicultura brasileira é uma prática que vem ganhando mais seguidores nas últimas décadas. Dessa forma, a implantação de um programa de melhoramento genético que tenha como objetivo o aumento nas médias de produção desta característica é de caráter fundamental, para favorecer não só o mercado nacional e internacional, mas também os próprios apicultores que podem explorar de forma maximizada os apiários de produção.

Assim como já relatado por De Jong (1996) e Soares *et al.* (1996) pudemos constatar durante as visitas a diversos apicultores uma alta porcentagem de apicultores extrativistas e/ou pouco manejo realizado nas colmeias em produção. Fato que vem prejudicando o desenvolvimento do setor apícola do país. Também notamos que ainda existe receio por parte de muitos apicultores em relação a sua inserção em programas de melhoramento genético. Acreditamos que isso seja devido à implementação de determinadas práticas de manejo como troca de rainhas, troca de favos e padronização de material, que são fundamentais para a instalação, execução e funcionamento do programa de melhoramento genético, ou, possivelmente seja devido ao desconhecimento que o apicultor tem relação ao custo/benefício do programa de melhoramento genético.

Ao mesmo tempo também existem apicultores que estão dispostos a melhorar suas próprias práticas de manejo com o intuito de aumentar as suas produções, facilitando a troca de informação e a parceria entre as partes. Atualmente o número de apicultores que estão interessados em participar e desenvolver trabalhos de melhoramento genético tem aumentado notoriamente. Isto pode ser devido a uma maior interação entre Universidades e produtores, além da motivação por parte de organizações governamentais que subsidiam recursos para o desenvolvimento da apicultura no país, envolvendo diretamente o apicultor rural em trabalhos que melhorem o setor.

Durante a realização do trabalho, sentimos dificuldades quanto ao planejamento de coleta de dados nas colmeias de produção, isto foi principalmente devido às condições ambientais as quais tem mudado e estão variando continuamente na região. Estas variações ambientais têm obrigado os apicultores de algumas regiões de Minas Gerais a instalar os coletores de própolis somente

após a temporada de chuvas, ou mesmo parar a produção antes da data prevista. Lamentavelmente as condições climáticas são um fator chave na produção de própolis, temporadas de muita chuva afetam diretamente a produção, diminuindo a quantidade e a qualidade da própolis coletada. Este tipo de problemática também foi relatada nos trabalhos de melhoramento genético realizados por Alves-Junior e colaboradores (2008) os quais realizaram a seleção e avaliação de rainhas durante três anos consecutivos na região de Mato Grosso do Sul.

Foi constatado neste trabalho que as práticas de manejo, que foram padronizadas para realização do trabalho em campo e transferidas para que os apicultores executassem durante a divisão das colmeias, aceleram o tempo que uma colmeia precisa para entrar em processo de produção. Dessa forma as práticas de introdução de rainhas, desenvolvimento e alimentação das colmeias divididas se mostraram fatores importantíssimos durante a realização e avaliação deste material. Após deste trabalho, consideramos como peça chave a troca de informação com o apicultor que esteja interessado no programa de melhoramento genético, assim como também, a capacitação de apicultores no manejo de colmeias em campo, o que facilita e garante a avaliação das colmeias durante o processo de seleção.

Os resultados obtidos com os núcleos de fecundação mostram que facilmente qualquer tipo de apicultor pode modificar algumas das suas colmeias para começar e instalar um apiário de fecundação. Uma vez que o apicultor domine a técnica de produção de rainhas, ele pode iniciar os apiários de fecundação de forma rápida e com o mínimo de gastos adicionais. Lembrando que como qualquer sistema de produção, é necessário que o apicultor domine totalmente todo o processo, conhecendo detalhadamente cada uma das suas partes. Isto permite a tomada de decisões nos momentos que o sistema esteja passando por algum problema de manejo ou técnico, com o objetivo de evitar perdas nas colmeias tanto de produção como nos núcleos de fecundação.

A ampla variabilidade nos resultados das avaliações das características de seleção do comportamento higiênico, taxa de infestação de *Varroa* e incidência de *Nosema* obtidas nos apiários de Jacuí, e Bambuí, nós permitem afirmar que o programa de melhoramento genético partiu de uma população bastante diversa.

Inicialmente não encontramos nenhuma homogeneidade em nenhuma característica avaliada e em todos os casos encontramos valores muito dispersos. Esta diversidade favorece a implementação de programas de melhoramento genético, auxiliando a seleção e identificação das melhores linhagens genéticas, pois permite que o programa guie a seleção para determinados objetivos devidamente planejados.

Embora a troca de rainhas realizada nas colmeias utilizadas para avaliar a produção de própolis não tenha superado o 25% sugerido por Vencovsky e Kerr (1982), o resultado de produção das 34 rainhas que foram aceitas mostrou que a produção destas colmeias, independentemente do apiário no qual estas rainhas foram introduzidas, sempre foi superior à média de produção individual de cada apiário. Estes resultados concordam com o proposto por Kostarelou-Demianidou *et al.* (1995) que mencionou que existe um melhoramento genético simplesmente com o fato de introduzir rainhas selecionadas. Os resultados da produção de própolis das rainhas selecionadas nos reforçam a necessidade de estabelecer este tipo de prática nas colmeias em produção.

Do total de colmeias avaliadas (263) quanto à produção de própolis, somente 12,9% destas colmeias possuíam rainhas selecionadas. Após a avaliação e seleção das colmeias enquanto a sua produção de própolis, comportamento higiênico, taxa de infestação de *Varroa* e incidência de *Nosema* foram selecionadas as dez melhores colmeias, ressaltando que seis destas dez rainhas faziam parte do grupo inicial de colmeias com rainhas selecionadas (Figura 33).

Figura 33. Quantidade de colmeias com rainhas selecionadas e não selecionadas. A. Total de colmeias utilizadas para a avaliação da produção de própolis por colmeia. B. Quantidade de colmeias selecionadas pela produção de própolis e utilizadas para a avaliação das três características de seleção. C. Quantidade de colmeias selecionadas para a criação das linhagens a utilizar na terceira geração.

Os dados da Figura 33 demonstram a importância de trabalhar com material selecionado previamente nas colmeias de produção, confirmando que embora só tenhamos selecionado a origem genética materna introduzindo rainhas virgens, os resultados de produção destas rainhas são promissores. Devido à falta de costume que os apicultores têm em trocar as suas rainhas periodicamente, espera-se que com a implementação desta prática nas colmeias os resultados obtidos neste trabalho e a seleção do material utilizado como linhagens genéticas de multiplicação, o avanço genético nos primeiros anos seja facilmente observado. Ressaltamos que a troca de rainhas nas colmeias não produtivas, por rainhas previamente selecionadas é uma prática obrigatória e de caráter fundamental a ser adquirida por apicultores que tenham como objetivo o aumento na produção.

Quando analisamos a produção de própolis por colmeia na região de Bambuí percebemos que existem colmeias em produção que apresentaram ótimas coletas de própolis, acima de 200 gramas, podendo, em alguns casos, chegar até 266 gramas de própolis em um intervalo de tempo de uma semana. No entanto, também foi constatada uma alta porcentagem (32,06%) de colmeias com uma produção menor de 50 gramas. Para aumentar as médias de produção e diminuir esta porcentagem de colmeias será realizada uma troca controlada de rainhas,

introduzindo assim material selecionado nas colmeias que nos identificamos com baixas produções. Nossa meta é poder incrementar as médias de produção de própolis por apiário a 100 gramas colmeia. Mas, para poder atingir este valor, devem ser desenvolvidas algumas práticas de manejo como troca de rainhas nas colmeias não produtivas, troca de favos, monitoramento de produção as quais serão responsabilidade do apicultor.

Ressaltamos que devido aos resultados alcançados, atualmente existe grande interesse por parte do apicultor em continuar o programa de melhoramento genético, com o objetivo de expandi-lo a uma maior porcentagem nas colmeias do seu plantel, como também compartilhá-lo com outros apicultores comerciais da região. Desta forma continuaremos este trabalho de seleção e melhoramento genético. Para a próxima geração esperamos avaliar cinco linhagens genéticas das quais duas fazem parte do material selecionado durante a primeira geração. Adicionalmente ao longo dos anos incrementaremos o número de colmeias avaliadas, com o objetivo de introduzir colmeias com rainhas de genética diferente, prevenindo problemas futuros de consanguinidade.

A união de avaliações genéticas e econômicas complementa o estudo do melhoramento genético animal, determinando as características a serem selecionadas e sua importância real dentro do sistema de produção. Toda atividade produtiva deve ter por premissa básica a busca por resultados eficientes em termos produtivos e, sobretudo em termos econômicos (Brumatti *et al.*, 2011). Nosso próximo desafio é desenvolver um modelo bioeconômico para a determinação de ponderadores econômicos utilizados em índices de seleção em programas de melhoramento genético de colmeias produtoras de própolis verde.

6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- AIZEN, M. A., GARIBALDI, L. A., CUNNINGHAM, S. A e KLEIN, A. M. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. **Ann. Bot.** v. 103, p. 1579-1588, 2009.
- AIZEN, M. A e HARDER, L. D. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current Biology.** v. 19, p. 915-918, 2009.
- ALBER, M. A. A study of queen-rearing methods. **Bee World**, v. 46, n. 1, 1965.
- AL-QARNI A. S., SMITH B. H., COBEY S. W., Performance Evaluation of Naturally Mated and Instrumentally Inseminated Honeybee (*Apis mellifera* L.) Queens in Field Colonies. **Pakistan Journal of Biological Sciences.** v. 6, p. 1476-1481, 2003.
- ALVES-JUNIOR, V. V., CARBONARI, V., CARBONARI, O e ROSSINI, F. L. Seleção de rainhas: uma opção rentável aos apicultores de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia.** v.3, p. 23-26, 2008.
- BAILEY, L e BALL, B.V. Honey Bee Pathology. 2nd Edition. Academic Press. 208p. 1991.
- BANKOVA, V., KRASTEVA, G. B., SFORCIN, J. M., FRETE, X., KUJUMGIEEV, A., RODELLA, R. M e POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. **Z Naturforsch.** v. 54, p. 401-405, 1999.
- BASTOS, E. M. A. F., SANTANA, R. A., CALAÇA-COSTA, A. G e TIAGO, P. S. Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. **Braz J Biol.** v. 71, n. 3, p. 727-34, 2011.
- BASTOS, E. M. A. F. Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Brasil. 137p. 2001.

- BASTOS, E. M. A. F., OLIVEIRA, V. D. C e SOARES, A. E. E. Microscopic characterization of the green propolis, produced in Minas Gerais State, Brazil, **Honeybee Sci.** v. 21, p. 179-180, 2000.
- BASTOS, E. M. A. F., SIMONE, M., JORGE, D. M., SOARES, A. E. E. e SPIVAK, M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian and Minnesota, USA propolis against *Paenibacillus* larvae, **J. Invertebr. Pathol.** v. 97, p. 273–281, 2008.
- BEESTMA, J., BOOT, W. J e CALIS, J. Invasion behaviour of *Varroa jacobsoni* Oud.: from bees into brood cells. **Apidologie.** v. 30, p. 125-140, 1999.
- BEVAN, E. The honey bee: its natural history, physiology, and management. Cheap Edition. PRICK 311 CENTS. With thirty-five engravings on wood. By R. S. Gilbert. Philadelphia. Carey e Hart. 128p. 1843.
- BOURGEOIS, A. L., RINDERER, T. E., BEAMAN, L. D e DANKA, R. G. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. **Journal of Invertebrate Pathology.** v. 103, p. 53-58, 2010.
- BRUMATTI, R. C., FERRAZ, J. B. S., ELER, J. P e FORMIGONNI, I. B. Development of selection index in beef cattle under the focus of a Bio-economic model. **Arch. Zootec.** v. 60, n. 230, p. 205-213, 2011.
- CALDERÓN, R. A., VAN VEMM, J. W., SOMMEIJER, M. J e SANCHEZ, L. A. Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Experimental and Applied Acarology.** v. 50, p. 281–297, 2010.
- CAMPOS, J. C. P. Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal. FEPMVZ Editora. 617p. 2008.
- CHANG, R., PILÓ-VELOSO, D., MORAIS, S. A. L e NASCIMENTO, E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v.18, p. 549-556, 2008.

- COBEY, S. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. **Apidologie**. v. 38, p. 390-410, 2007.
- COBEY, S. The extraordinary honey bee mating and a simple field dissection of the spermatheca – Part 1. **American Bee Journal**, v. 143, n. 1, p. 67-69, 2003.
- COBEY, S e SCHLEY, P. Innovations in instrumental insemination. The compact, versatile right and left handed Schley model II instrument. **American Bee Journal**. p. 433-435, 2002.
- COBEY, S. The development of instrumental insemination. **American Bee Journal**. v. 123, p. 108–111, 1983.
- COLLINS, A., Quantitative genetics. in **Bee genetics and breeding**. Academic Press, Inc. p. 361-389, 1986.
- COX-FOSTER, D. Disappearing keystone of agriculture??? Role of pathogens and stress in the decline of honey bee colonies and potential impact on other pollinators. X Encontro sobre Abelhas. Um século de pesquisas no Brasil. Ribeirão Preto. São Paulo Brasil, 2012.
- CUNHA, J. G. C. Melhoramento de abelhas e produção de rainhas. In: XIV CONGRESSO NACIONAL DE APICULTURA. Campo Grande. Anais. Campo Grande: CBA, p. 185-187, 2002.
- DARWIN, C. The variation of animals & plants under domestication. In Two Volumes – Vol II. London: MURRAY, J e STREET, A. 486p. 1868.
- DE JONG, D., GONCALVES, L e MORSE, R. Dependence of climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. **Bee World**. v. 65, p. 117-121, 1984.
- DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, p. 67-70, 1996.
- DE JONG, D. Mites. Varroa and others parasites of brood. In: MORSE, R. A., FLOTTUM, K. (Eds.), Honey Bee Pests, Predators and Diseases. A.I. Root Company, Medina, p. 279-328, 1997.

- DINIZ, N. M., SOARES, A. E. E., SHEPPARD, W. S e DEL LAMA, M. A. Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. **Genetics and Molecular Biology**. v. 26, p. 47-52, 2003.
- FAQUINELLO, P. AVALIAÇÃO GENÉTICA EM ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS PARA PRODUÇÃO DE GELÉIA REAL. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Zootecnia. Universidade de Estadual de Maringá. Paraná. Brasil. 67p. 2007.
- FERT, G. El rol de la crianza de zánganos en el manejo de la cría de reinas para mejorar la calidad de las reinas. 2nd World Symposium of Queen Bees and Artificial Insemination. Apimondia 2008. Nuevo Vallarta, Nayarit. Mexico. p. 101, 2008.
- FERT, G. Cría de reinas: Selección de la raza, Métodos de cría, La producción de jalea real. 128p. 2010.
- FLORES, J. M., RUÍZ, J. A., RUZ, J. M., PUERTA, F., CAMPANO, F., PADILLA, F e BUSTOS, M. Inseminación Artificial de Abejas Reinas. **Arch. Zootec**. v. 47, p. 343-345, 1998.
- FORSGREM, E e FRIES, I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 212–217, 2010.
- FRANCOY, T. M. Variabilidade genético – morfológica em populações neotropicais de *Apis mellifera*, Ph.D. **Thesis**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, Brazil, 163p. 2007.
- FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 103, p. 73-79, 2010.
- FUENTES, A. M. O; HERNANDEZ, N. R. Acción antimicrobiana de los extractos alcoholicos de propóleo. **Revista Cubana de Farmacia**, v.24, n.1, p.34-44, 1990.

- GALLAI, N., SALLES, J. M., SETTELE, J. e VAISSIERE, B. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture con-fronted with pollinator decline. **Ecol. Econ.** v. 68, p. 810-821, 2009.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, n. 2, p.59-84, 1979.
- GONÇALVES, L. S. The introduction of the African Bees (*Apis mellifera scutellata*) into Brazil and some comments on their spread in South America. **American Bee Journal**. v. 114. n. 11, p. 414, 415, 419, 1974.
- GONÇALVES, L. S. Africanização das abelhas nas Américas, Impactos e perspectivas de Aproveitamento do Material genético. Anais do Encontro Brasileiro de Abelhas e Outros Insetos Sociais. Homenagem aos 70 anos de Warwick Estevam Kerr. **Naturalia**. Ed. Unesp. São Paulo. p. 126-134. 1992.
- GONÇALVES, L. S. Africanized Honey Bee: Introduction, Adaptation and Benefits. In: International Apicultural Congress-Apimondia, 36. proceedings in Document Transformation Techonologies-CD. Durban-South Africa, Book of Abstracts. p. 32, 2001.
- GONÇALVES, L. S. Meio Século de Apicultura com Abelha Africanizada no Brasil. **Mensagem Doce**. v. 87, 2006.
- GRAMACHO, K. P. Estudo do comportamento higiênico em *Apis mellifera* como subsídio a programas de seleção e melhoramento genético em abelhas. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Brasil. 108p. 1995.
- GRAMACHO, K. P. Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas *Apis mellifera*. Tese de Doutorado apresentada da à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Brasil. 225p. 1999.
- GRAMACHO, K. P e GONÇALVES, L. S. Fatores que interferem nas atividades de abelhas *Apis mellifera* relacionado ao comportamento higiênico. Anais IV Encontro sobre abelhas. Ribeirão Preto, São Paulo. Brasil, p. 58-65, 2000.

- GRAMACHO, K. P e GONÇALVES, L. S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para a avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: Congresso Latinoiberoamericano de Apicultura, 4. **Anais...**Córdoba – Argentina. 45p. 1994.
- GUTERREZ-GONÇALVES, M. E. J e MARCUCCI, M. C. Atividade Antimicrobiana e Antioxidante da Própolis do Estado do Ceará. **Revista Fitos**. v.4, n. 1, p. 81-86, 2009.
- HACHINOHE, Y e ONISHI, N. On the meiosis of the drone of honey bee (*Apis mellifica*). **Bull. Natl. Inst. Agr. Sci., Ser. G**, (Animal Husbandry). v. 3, p. 83-87, 1952.
- HARBO J. R., Propagation and instrumental insemination. in Bee genetics and breeding. Academic Press, Inc. p. 361-389, 1986.
- HARBO J. R., RINDERER T. E. Breeding and genetics of honeybees. Beekeeping in the United States. Agriculture Handbook, n. 335, p. 49-57, 1980.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L e NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**. v. 10, p. 59-62, 2010.
- INOUE, H. T., DE SOUSA, E. A., DE OLIVEIRA, O. R., CUNHA, F. S. R., CARELLI, B. L. M. R e DA SILVA, D. A. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Arch Latinoam Prod Anim**. v. 15, p. 65-69, 2007.
- JIANKE L., LAN Z., BOXIONG Z e SHENGLU C. How royal jelly maintains its quality within the colony. **America Bee Journal**, v. 145, n. 9, p. 736-738, 2005.
- JORGE JUNIOR, J., CARDOSO, V. L e ALBUQUERQUE, L. G. Modelo bioeconômico para cálculo de custos e receitas em sistemas de produção de gado de corte visando à obtenção de valores econômicos de características produtivas e reprodutivas. **R. Bras. Zootec**. v. 35, n. 5, p. 2187-2196, 2006.
- KERR, W. E. Introdução de abelhas africanas no Brasil, **Brasil Apic**. v. 3, p. 211-213, 1957.

- KERR, W. E. The history of introduction of African bees to Brazil, **S. Afr. Bee J.** v.39, p. 3-5, 1967.
- KERR, W. E., DE LEON DEL RIO, S e BARRIONUEVO, M. D. The southern limits of the distribution of the Africanized honey bee in South America. **American Bee Journal.** v. 122, p. 196-198, 1982.
- KERR, W e VENCOVSKY, R. Melhoramento Genético em Abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. **Revista Brasileira de Genética.** v. 2, p. 279-285, 1982.
- KLEIN, A. M., VAISSIÈRE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C e TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B.** v. 274, p. 3030-313, 2007.
- KOSTARELOU-DAMIANIDOU, M., THRASYVOULOU, A., TSELIOS, D e BLADENOPOULOS, K. . Brood and honey production of honeybee colonies requeened at various frequencies. **Journal Apicultural Research**, v. 34, p. 9-14, 1995.
- LAIDLAW, H. H., Production of queens and package bees. in The hive and the honeybee. Ed. Bookcrafters. p. 235-267, 2000.
- LAIDLAW H. H. Instrumental Insemination of honey bee queens: Its origin and development, **Bee World.** v. 68, p. 17–36, 1987.
- LIMA, M. G. A Produção de Própolis no Brasil. Impressos São Sebastião Editora e Gráfica Ltda. 120p. 2006.
- LONGHINI, R., RAKSA, S. M., OLIVEIRA, A. C. P., SVIDZINSKI, T. I. E e FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 17, p. 388-395, 2007.
- MANRIQUE A. J. Seleção de abelhas africanizadas para a melhoria na produção de própolis. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Brasil. 108p. 2001.

- MANRIQUE A, J e SOARES A. E. E. Seleção de abelhas africanizadas para produção de própolis. **Zootecnia Tropical**. v. 20, 2002a.
- MANRIQUE A, J e SOARES A. E. E. Início de um programa de seleção de abelhas africanizadas para a melhoria na produção de própolis e seu efeito na produção de mel. **Interciencia**. v. 27, p. 312-316, 2002b.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. v. 26, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades Biológicas e Terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**. v. 19, p. 529-536, 1996.
- MARCUCCI, M. C e BANKOVA, V. S. Chemical composition: plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Curr Top Phytochem**. v. 2, p. 115–123, 1999.
- MARCUCCI, M. C., FERRERES, F. G. C., BANKOVA, V. S., CASTRO, S. L., DANTAS, A. P., VALENTE, P. H. M e PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol** v. 74, p. 105-112, 2001.
- MARTIN, S. J e MEDINA, L. M. Africanized honeybees have unique tolerance to *Varroa* mites. **TRENDS in Parasitology**. v. 20, n. 3, p. 112-114, 2004.
- MATTOS, I. M e CHAUD-NETTO J. Analysis of mortality in Africanized honey bee colonies with high levels of infestation by *Varroa destructor*. **Sociobiology**. v. 59, p. 369-380, 2012.
- MESSAGE, D. Efeito de condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas *Apis mellifera*. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão, Universidade de São Paulo, Brasil, 1979.
- MESSAGE, D. Principais problemas sanitários em apiários do Brasil. Memórias **10º Congresso Íberoamericano de apicultura**. 11 a 14 de outubro de 2010. Natal, RN, Brasil. 2010.

- MICHENER, C. D. The Brazilian Bee Problem. **Annual Review of Entomology**. v. 20, p. 399-416, 1975.
- MISTRO, D. C., DÍAZ, L. A e FERREIRA, W. C. The Africanized honey bee dispersal: a mathematical zoom. **Bulletin of Mathematical Biology**. v. 67, p. 281-312, 2005.
- MORENO, U. V. Inseminação instrumental em rainhas africanizadas de *Apis mellifera* (Apidae: Apini) como subsídio para o melhoramento genético. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Brasil. 65p. 2006.
- MORETTO, G., GONÇALVES, L. S e DE JONG, D. Africanized bees are more efficient at removing *Varroa jacobsoni* - Preliminary data. **American Bee Journal**. v. 131, p. 434, 1991.
- MORETTO, G., GONÇALVES, L. S e DE JONG, D. Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. **Revista. Brasileira de Genetica**. v. 16, p. 71-77, 1993.
- MORETTO, G e MELLO, L. J. *Varroa jacobsoni* infestation of adult africanized and italian honey bees (*Apis mellifera*) in mixed colonies in brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 22, n. 3, p. 321-323, 1999.
- MORETTO, G e MELLO, L. J. Infestation and distribution of the mite *Varroa jacobsoni* In africanized honey bee (*Apis mellifera*) colonies **Interciencia**. v. 26, n. 9, p. 394-396, 2001.
- MORSE, R. A e FLOTTUM, K. Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA, 1997.
- MOURA, L. P. P. 2001. Longevidade, produção de própolis e áreas de desenvolvimento de colmeias de *Apis mellifera* africanizada, submetida a quatro técnicas de coleta, em quatro períodos do ano. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Brasil. 111p, 2001.

- NICHOLAS, F. W. Genetic improvement through reproductive technology. **Animal Reproduction Science**. v. 42, p. 205-214, 1996.
- NOGUEIRA-COUTO, R. H e COUTO, L. A. Apicultura: manejo e produtos, 3e ed., FUNEP, Jaboticabal. 2006.
- NOGUEIRA-NETO, P. The beginning of beekeeping in Brazil. **Boletim de Agricultura (Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo)**. p, 5-14, 1962.
- OLIVEIRA, V. D. C E BASTOS, E. M. F. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis. **Acta Bot Bras** v. 12, p. 431-439, 1998.
- OLIVER, R. The Nosema Twins: Part 2 - Detection & Microscopy. Scientificbeekeeper.com. January. 2008. Disponível em: <http://scientificbeekeeping.com/the-nosema-twins-part-2-detection-microscopy/>. Acesso em: 20 Janeiro 2012.
- OLIVER, R. Sick Bees: Part 13 – Simple Microscopy of Nosema for Beekeepers. Scientificbeekeeper.com. November. 2011. Disponível em: <http://scientificbeekeeping.com/sick-bees-part-13-simple-microscopy-of-nosema/>. Acesso em: 20 Janeiro 2012.
- OMHOLT, S. W., ÅDNØY, T., Effects of various breeding strategies on diploid drone frequency and quantitative traits in a honey bee population. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 89, n. 6, p. 687-692, 1994.
- PAGE, R. E., LAIDLAW, H. H., Mating designs. in Bee genetics and breeding. Academic Press, Inc. p. 305-321, 1986.
- PAGE, R. E. Varroa mite impacts Africanized bee spread and beekeeping. **California Agriculture**, v. 52, n. 2, p. 9-13, 1998.
- PAGE, R. E., LAIDLAW, H. H., Honey bee genetics and breeding. in The hive and the honeybee. Ed. Bookcrafters. p. 235-267, 2000.

- PAGE, R. E., KERR, W. E., Honey bee genetics and breeding. in "The African honeybee". Ed. West view press. p. 157-186, 1991.
- PARK , Y. K., IKEGAKI. M., ALENCAR, S. M e MOURA, S. M. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Sci.** v. 21, p. 85-90, 2000.
- PARK , Y. K., ALENCAR, S. M., SCAMPARINI, A. R. P e AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural.** v.32, p. 997-1003, 2002a.
- PARK, Y.K., ALENCAR, S. M e AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J Agr Food Chem.** v. 50, p. 2502-2506, 2002b.
- PACKER, J.F e LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 17, p. 102-107, 2007.
- PALACIO, M. A., FIGINI, E., ANDERE, C., GARCIA, C., AGRA, M., LANZAVECCHIA, S., MARTINEZ, A e BEDASCARRASBURE, E. L. Programa nacional de selección y mejoramiento de abejas en Argentina. Apimondia. 2011.
- PAXTON, R. J. Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)? **Journal of Apicultural Research.** v. 49, n. 1, p. 80-84, 2010.
- PEGORINI, F., MARANHO, L. T e ROCHA, L. D. Organização estrutural das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Rev. Bras. Farm.** v. 89, p. 272-275, 2008.
- PEREIRA, A. D. S., SEIXAS, F. R. M. S. E NETO, F. R. D. A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.
- PICKLER, M. A. Defensividade, higiene, produção de própolis e mel com duas gerações de abelhas *Apis mellifera*. Dissertação de Mestrado apresentada à

Faculdade de Zootecnia. Universidade Estadual do Oeste de Paraná. Brasil. 59p., 2009.

POLLARD, J., PLANTE, C e COBEY, S. Testing Protocols For The Safe International Exchange Of Honey Bee Stocks To Enhance Proven Commercial Lines Through Selection and Increased Genetic Diversity. The National Honey Board. **Research Project Report**, 9p. 2011.

RINDERER, T. E., Selection. in Bee genetics and breeding. Academic Press, Inc. p. 305-321, 1986.

ROBERTS, W. C e MACKENSEN, O. Breeding improved honey bees. I. Bee Breeding and Animal Breeding. **American Bee Journal**. v. 91, p. 328–330, 1951.

ROBERTS, W. C e MACKENSEN, O. Breeding improved honey bees. 3. Sex Determination and Bee Breeding. **American Bee Journal**. v. 91, p. 382–384, 1951b.

ROTHENBUHLER, W. C. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV, Responsens of F₁ and backcross generations to disease-killed brood. **Am. Zoologist**. v. 4, p. 111–123, 1964.

ROTHENBUHLER, W. C., KULINCEVIC, J. M e KERR, W. E., Bee Genetics, **Annual Review of Genetics**. v. 2, p. 413–438, 1968.

SAMMATARO, D., GERSON, U e NEEDHAM, G. Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. **Annual Review Entomology**. v. 45, p. 519–548, 2000.

SANDERSON, A. R e HALL, D. W. The cytology of the honey bee, *Apis mellifica* L. **Nature**. v. 162, p. 34-35, 1948.

SANTOS, F. A., BASTOS, E. M. A. F., MAIA, A. B. R. A., UZEDA, M., CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L. M e MOREIRA, E. S. A. Brazilian Propolis: Physicochemical Properties, Plant Origin and Antibacterial Activity on Periodontopathogens. **Phytotherapy Research**. v. 17, p. 285–289, 2003.

- SCHLEY P., Short instructions to instrumental bee insemination. Disponível em: < http://www.besamungsgeraet.de/___en/the-insemination-process/ >. Acesso em 2008.
- SCHNEIDER, S. S., DEGRANDI-HOFFMAN, G e SMINTH, D. R. The African honey bee: Factors contributing to successful biological invasion. **Annual Review of Entomology**. v. 49, p. 351-376, 2004.
- SEABRA-FILHO, J.R. Geléia real. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Teresina. Anais. Teresina: CBA. p. 117-119, 1996.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Agência SEBRAE de Notícias, os pequenos negócios em pauta. <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/mercado/exportacoes>. Acesso 2012.
- SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 113, p. 1-14, 2007.
- SHIMANUKI, H., KNOX, D e DE JONG, D. Bee diseases, parasites and pests. In: The African Honey Bee. SPIVAK, M., FLETCHER, D. J. C e BREED, M. D., Eds. Westview Press, Boulder, CO, p.283-296, 1991.
- SIMONE-FINSTROM, M e SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**. v. 41, p. 295-311, 2010.
- SOARES, A. E. E., ALMEIDA, R e BEZERRA-LAURE, M. A. Avanços no melhoramento genético e na inseminação instrumental em *Apis mellifera*. In: 11 CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA. Teresina. Anais. Teresina: CBA, p. 59-61, 1996.
- SPIVAK, M., REUTER, G. S e LAMB, M. Frequency of hygienic behaviour in naturally mated daughters of a hygienic breeder queen. **American Bee Journal**. v. 135, p. 830-831, 1995,
- SPIVAK, M e REUTER, G. S. *Varroa destructor* Infestation in Untreated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies Selected for Hygienic Behavior. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 326-331, 2001.

- SUGDEN, E. A e WILLIAMS, K. R. October 15: the day the bee arrived. **Glean. Bee Cult.** v. 119, p. 12-21, 1990.
- TARPY, D. R., HATCH, S e FLETCHER, D. J. C. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. **Animal Behaviour.** v. 59, p. 97–101, 2000.
- TAYLOR, O. R. The past and possible future spread of Africanized honeybees in the Americas. **Bee World.** v. 58, p. 19–30, 1977.
- TAYLOR, O. R. African Bees: Potential Impact in the United States. **Bulletin of the ESA.** v. 31, p. 15-24, 1985.
- THIMANN, R e MANRIQUE, A. Recolección de propóleo en colonias de abejas africanizadas durante la temporada de lluvias en el apiário de la UNELLEZ, Guanare, Venezuela. **Zootecnia Tropical.** v.20, n.4, 2002.
- TUCKER, K. W. Queens, Package Bees, and Nuclei: Production and Demand. Beekeeping in the United States. Agriculture Handbook, n. 335, p. 58-63, 1980.
- VANENGELSDORP, D e MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology.** v. 103, p. 80-95, 2010.
- VENCOVSKY, R e KERR, W. Melhoramento Genético em Abelhas. II. Teoria e avaliação de alguns métodos de seleção. **Revista Brasileira de Genética.** v. 3, p. 493-502, 1982.
- VERDI, L.G., BRIGHENTE, M. C e PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. **Química Nova.** v. 28, p. 85-94, 2005.
- VISSCHER, P. K., VETTER, R. S e BAPTISTA, F. C. Africanized bees, 1990-1995: initial rapid expansion has slowed in the U.S. **Calif. Agric.** v. 51, p. 22-25, 1997.
- WINSTON, M. L. The Biology and Management of the Africanized Honey Bee. **Annual Review of Entomology.** v. 37, p. 173-193, 1992.

Apêndice

Total de colmeias selecionadas nos dez apiários de produção segundo a produção de própolis por colmeia e os valores Z. Também podemos observar as colmeias com rainhas selecionadas durante a primeira geração.

Apiário	Colmeia	Marcação	Quantidade lâminas	Média de produção/colmeia	Z Geral	Z por lâmina
A	5		Seis	170,67	2,453	1,612
A	6	Azul	Quatro	126,00	1,452	1,470
A	8		Quatro	111,33	1,123	1,098
A	14		Quatro	111,67	1,131	1,107
A	17		Seis	71,67	0,235	1,355
A	27 ^a			104,33	0,966	0,921
B	2	Azul	Quatro	129,33	0,965	0,957
B	4	Verde	Quatro	103,67	0,510	0,926
B	12	Azul	Quatro	104,00	0,516	0,479
B	16*			107,00	0,569	0,535
B	18		Seis	198,00	1,338	1,353
B	20*			150,33	2,185	1,493
B	23	Azul	Quatro	100,00	0,445	0,856
B	25	Azul	Quatro	182,67	1,912	1,964
C	1		Seis	140,67	0,325	0,878
C	3*			249,33	0,449	1,032
C	10		Seis	148,00	2,162	1,289
C	11		Seis	139,00	0,297	0,843
C	19 ^b			205,33	1,418	0,566
C	20		Seis	207,33	1,452	0,599
C	23		Seis	230,00	1,835	0,971
D	1	Azul	Quatro	89,00	0,668	0,742
D	3	Azul	Duas	99,33	0,994	1,076
D	8	Azul	Duas	149,33	2,568	2,690
D	15	Verde	Duas	102,67	1,099	1,183
D	16		Quatro	102,33	1,088	0,645
D	24		Seis	110,00	1,329	0,841
E	3		Quatro	144,67	1,731	1,108
E	4 ^a			131,33	1,413	1,149
E	10		Duas	109,00	0,879	1,665
E	27		Quatro	137,67	1,564	1,290
E	32	Laranja	Quatro	140,00	1,620	1,341
E	41	Verde	Quatro	174,67	2,447	2,109
F	8		Duas	93,33	1,453	1,976
F	9	Laranja	Quatro	113,33	2,172	1,499

F	10		Quatro	93,67	1,465	0,978
G	4		Quatro	90,33	0,931	1,116
G	8		Duas	132,67	2,070	1,439
G	18*			119,33	1,711	1,155
G	19		Duas	130,67	2,016	2,286
G	20		2	108,00	1,406	0,914
G	23		1	85,00	0,787	0,961
H	3		2	168,67	1,867	0,707
H	4		2	152,67	1,529	1,610
H	8*			131,33	1,078	1,102
H	13		2	144,00	1,346	1,404
H	17		2	122,67	0,894	0,896
H	18		2	166,00	1,811	1,927
H	21		3	131,33	1,078	-0,707
H	22		2	103,33	0,485	0,436
I	2		1	103,67	0,816	1,383
I	4		2	151,33	2,198	0,986
I	14*			115,33	1,155	1,811
J	3		1	216,00	2,317	2,453
J	6		3	185,33	1,725	1,142
J	11		1	149,67	1,038	0,981
J	13		1	126,67	0,594	0,471
J	15		3	150,00	1,044	0,504
J	23		2	147,67	0,999	0,462
* Colmeia com pouca cria, ^a , Colmeia com favos trançados ^b , colmeia com realeiras						