

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

MARCIANI BALBINOTTI FRANÇA

**PRODUÇÃO DE ZANGÕES de *Apis mellifera* L. AFRICANIZADA
(HYMENOPTERA: APIDAE): ADAPTAÇÕES PARA
PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE ABELHAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2021

MARCIANI BALBINOTTI FRANÇA

**PRODUÇÃO DE ZANGÕES de *Apis mellifera* L. AFRICANIZADA
(HYMENOPTERA: APIDAE): ADAPTAÇÕES PARA
PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE ABELHAS**

**Africanized drone production *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:
Apidae): adaptations to honey bee breeding programs**

Trabalho de conclusão de curso de graduação,
apresentada como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Zootecnia/Programa da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Martins Costa
Maia

Coorientadora: M^a Fernanda Raulino
Domanski

DOIS VIZINHOS

2021



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Curso de Zootecnia



**FOLHA DE APROVAÇÃO
TCC**

**PRODUÇÃO DE ZANGÕES de *Apis mellifera* L. AFRICANIZADA
(HYMENOPTERA: APIDAE): ADAPTAÇÕES PARA
PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE ABELHAS**

Autora: Marciani Balbinotti França

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Martins Costa Maia

Coorientadora: M^a Fernanda Raulino Domanski

TITULAÇÃO: ZOOTECNISTA

APROVADA em 07 de maio de 2021.

Prof^ª. Dr^ª. Michele Potrich

M^a Rúbia Santana Andrade

Eng. Agr.^a Vitória Alves Pereira

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Martins Costa Maia
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois sem a Sua graça não seria capaz de alcançar a conclusão deste trabalho.

À **Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)**, agradeço de coração também esta instituição por toda a ajuda e pela educação dada. Tenho este lugar meu segundo lar.

Ao **CNPq pela concessão de bolsa de iniciação tecnológica**, e à **Diretoria de Graduação da UTFPR** pelo fomento com a ajuda de custo para a realização deste trabalho.

À professora e orientadora **Dra. Fabiana Martins Costa Maia**, agradeço pela paciência, pela amizade, pela dedicação, por nunca ter desistido de mim. E acima de tudo, pelo incentivo, pois muitas vezes foi o empurrão que precisava.

A todos os integrantes do grupo **GPMApis**, agradeço por todo apoio, trabalho e parceria durante a realização do mesmo.

À minha **Família** tenho um agradecimento muito especial porque acreditaram em mim desde o primeiro instante. Sou quem sou porque vocês estiveram e estão sempre ao meu lado. A vocês devo tudo.

E a tantos outros que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu agradecimento.

RESUMO

FRANÇA, M. B. **Produção de zangões de *Apis mellifera* L. africanizada (Hymenoptera: Apidae): adaptações para programas de melhoramento genético de abelhas.** 29 f. Trabalho (Conclusão de Curso) – Programa de Graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2021.

A padronização de protocolos de produção controlada de machos, pode ser útil para programas de melhoramento genético no Brasil que visam estudos sobre a variação genética aditiva e consanguinidade em abelhas. Conhecendo a origem do zangão, é possível realizar o controle e a padronização da produção de zangões, deste modo a produção pode ser realizada em qualquer época do ano, tendo uma seleção com genética superior. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar um protocolo de produção de zangões por meio da oviposição de rainhas virgens, induzidas com dióxido de carbono (CO₂). O estudo foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos com um grupo de 30 rainhas submetidas ao tratamento com CO₂ (20) e sem CO₂ (10) por 24 horas. Em seguida foram introduzidas em colônias orfanadas, e monitoradas por 20 dias quanto à aceitação e oviposição de ovos que deram origem a machos. Apesar da baixa aceitação das rainhas pelas colônias nos dois tratamentos, o gás não teve influência nenhuma neste processo. Quanto à oviposição, o tratamento com CO₂ parece influenciar positivamente a oviposição de ovos que deram origem a machos, pelas rainhas virgens. No entanto, para que um protocolo seja estabelecido, adequações na idade de introdução das rainhas nas colônias poderia aumentar a probabilidade de aceitação e conseqüente oviposição.

Palavras-chave: Rainhas Virgens. Anestesia com CO₂. Reprodução de abelhas. Produção controlada de zangões.

ABSTRACT

FRANÇA, M. B. **Africanized drone production *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): adaptations to honey bee breeding programs.** 29 f. Work (Course Completion) - Bachelor's Degree Program in Zootecnics, Federal Technological University of Paraná. Dois Vizinhos, 2021.

The standardization of male-controlled production protocols can be useful for breeding programs in Brazil that aim studies on additive genetic variation and inbreeding in honey bees. Knowing the origin of the drone, it is possible to control and standardize the production of drones, so the production can be carried out at any time of the year, having a selection with superior genetics. Therefore, the objective of this work was to standardize a drone production protocol by means of the oviposition of virgin queens, induced with carbon dioxide. The study was carried out at the Federal Technological University of Paraná, Campus Dois Vizinhos with a group of 30 virgin queens underwent treatment with carbon dioxide (20), and without carbon dioxide (10) for 24 hours. Then they were introduced into orphaned colonies, and monitored for 20 days for the acceptance and oviposition of eggs that gave rise to males. Despite the low acceptance of queens by the colonies in both treatments, the gas had no influence on this process. Regarding oviposition, the treatment with carbon dioxide seems to positively influence the oviposition of eggs that gave rise to males, by virgin queens. However, for a protocol to be established, adjustments in the age of introduction of queens into the colonies could increase the likelihood of acceptance and consequent oviposition.

Key Words: Virgin Queens. Anesthesia with CO₂. Honey bee reproduction. Drones controlled production.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1 PRODUÇÃO DE ZANGÕES.....	10
3.2 INDUÇÃO DA OVIPOSIÇÃO POR CO ₂ EM RAINHAS	11
3.3 PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO EM ABELHAS.....	12
3.4 ESTUDOS REALIZADOS COM CO ₂	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 PRODUÇÃO DE RAINHAS.....	15
4.2 TRATAMENTOS	17
4.3 INTRODUÇÃO DAS RAINHAS A CAMPO E MENSURAÇÕES.....	19
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO	25
7 REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

O declínio da população de insetos tem sido evidente na última década, especialmente para as abelhas (SÁNCHEZ-BAYO & WYCKHUYS, 2019). Segundo Castilhos (2019) é crescente o receio com a escassez deste indispensável polinizador e estudos sobre o desaparecimento das abelhas vêm aumentando durante os anos. Neste contexto, a importância das discussões sobre a diversidade genética dessa espécie vem ganhando muita projeção.

Para o desenvolvimento da apicultura, o melhoramento genético engloba uma série de estratégias (COSTA-MAIA & LINO LOURENÇO, 2009), como as de reprodução, sendo essenciais para que os melhores animais possam passar seus genes para as próximas gerações. Práticas de manejo como trocas de rainhas e inseminação instrumental são fundamentais para o melhoramento, que visa aumentar ou manter determinadas características desejadas em uma colônia (MARTINEZ & SOARES, 2012). Além disso o progresso genético, que é alcançado no melhoramento, depende da utilização correta das informações obtidas dos indivíduos, com a ajuda contínua dos fundamentos metodológicos das avaliações genéticas (SILVA et al., 2008).

A inseminação instrumental de rainhas de *Apis mellifera* é um método de reprodução que permite o conhecimento completo do pedigree, essencial para que os estudos sobre a variação genética aditiva possam ser realizados (COBEY, 2007), no entanto a literatura sobre produção de zangões para a obtenção de sêmen, especialmente em abelhas africanizadas, ainda foi pouco estudada. Devido à grande influência ambiental no processo, como o tamanho da colônia, estação do ano, disponibilidade de alimento, a quantidade de crias de zangões presentes na colônia, presença ou ausência da rainha (BOES, 2010), um protocolo padronizado para a produção de machos inexistente na literatura.

Alguns autores realizaram protocolos com CO₂, onde rainhas virgens foram expostas ao gás e realizaram a oviposição de ovos que deram origem a zangões em células de operárias (SCHLÜNS, 2003). Mackensen (1947), administrou duas aplicações de CO₂ em rainhas virgens, levando à oviposição de zangões. O processo de tratamento de rainhas virgens com CO₂, corresponde a alguns estímulos de acasalamento, levando-as à oviposição, antes mesmo de estarem acasaladas (KAFTANOGLU & PENG, 1982). No entanto, todos esses trabalhos foram realizados em condições ambientais muito diferentes das encontradas no Brasil, e com outras subespécies de abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae).

A produção de zangões tem alguns propósitos, dentre eles promover a criação de zangões selecionados e com boa qualidade, alcançar um número desejado de machos e ampliar o período de fecundação, para assim, manter a variabilidade genética (FERT, 2013).

Conhecendo a origem do zangão, é possível realizar o controle e a padronização da produção de zangões, deste modo a produção pode ser realizada em qualquer época do ano, tendo uma seleção com genética superior, que pode ser efetivada em programas de melhoramento genético em abelhas (FORNAZARI, 2016).

A padronização de protocolos de produção controlada de zangões pode ser útil para programas de melhoramento genético no Brasil, que visem estudos sobre a variação genética aditiva e consanguinidade em abelhas, visto que os trabalhos são escassos sobre este tema. Consequente o objetivo do estudo foi desenvolver um processo que consiga padronizar e controlar a produção de zangões, por meio da oviposição de rainhas virgens, induzidas com CO₂.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo de produção de zangões, para programas de melhoramentos genético de abelhas, considerando a exposição de rainhas virgens ao CO₂.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Anestésiar rainhas virgens com CO₂, tendo início ao tratamento a partir de 24 horas de emergência das rainhas, onde serão administradas três doses de CO₂ por 10 minutos a cada seis horas.

Mensurar o tamanho e peso da rainha após emergência, observar a aceitação das rainhas a campo diariamente por 20 dias quanto à oviposição, desenvolvimento das crias e a emergência dos zangões.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO DE ZANGÕES

Os zangões são os machos do grupo social das abelhas *Apis mellifera*, onde a diferença sexual é originada em um sistema haplodiploide (ARAÚJO NETO, 2019), em que embriões diploides, são derivados de ovócitos fertilizados que originam as fêmeas (rainha e operárias), e os haploides são oriundos de ovócitos ativados partenogeneticamente originando os machos (SNUSTA & SIMMONS, 2013).

A produção de zangões em uma colônia é ligada à sazonalidade, onde os zangões são criados durante a estação de reprodução, e em épocas do ano que há alimentos em abundância (RANGEL et al., 2013). De acordo com Araujo Neto (2019) os zangões emergem 24 dias após a oviposição em células maiores que das operárias e após a emergência levam em média 12 dias para atingirem a maturidade sexual, com seis a sete dias tem-se os primeiros voos como treinamento para em seguida irem em direção a uma zona de congregação, onde acontece o acasalamento com a rainha.

Alguns fatores podem afetar a produção de zangões. Um deles, segundo Free e Williams (1975), seria o tamanho populacional das colônias, em que colônias fortes (com alta população de operárias e grande quantidade de alimento armazenado), tem mais disposição para a criação e manutenção de crias de zangões, visto que após a emergência os zangões não se alimentam sozinhos, ficando dependentes das operárias para sua alimentação. Lee e Winston (1985) observaram que colônias recém divididas não produzem células de zangões em menos de 22 dias, já que necessitam de um número de operárias em crescimento, para em seguida investir na produção de zangões, o que corrobora com os resultados apresentados por Henderson (1994), onde constatou-se que colônias com uma população maior produzem células de zangões mais rápido do que enxames menores.

Outro fator que afeta a produção de zangão, seria a disponibilidade de alimentos (RHODES, 1999). Existe uma necessidade de entrada contínua de pólen para que a colônia invista em cria e zangões adultos. Em apenas 48 horas de interrupção do fluxo de entrada de pólen na colônia, segundo Rhodes (2002), as larvas de machos são todas removidas e mantidos apenas os zangões adultos.

Segundo Boes (2010), a própria presença de zangões na colônia pode inibir a produção adicional de machos. A exemplo disso, se uma colônia receber vários favos com células de

zangões, as operárias tenderão a transformá-las em alvéolos de operárias (FREE & WILLIAMS, 1975).

A abelha rainha também pode influenciar na produção de zangões, visto que cerca de 99,9% dos machos adultos são produzidos por ela (VISSCHER, 1989). Quando a colônia perde sua rainha, as operárias tendem a produzir uma nova rainha, manter o zangão enquanto se aguarda o sucesso de uma nova rainha é uma estratégia que garante, em última instância o aumento do valor adaptativo da colônia, mas quando não é possível, os zangões são a única fonte de transmissão de genes na colônia.

Em uma criação de rainhas, é necessário um grande número de zangões (20) para o acasalamento, onde podem ser comercializadas rainhas virgens ou inseminadas instrumentalmente. Segundo Rhodes (2002), rainhas que realizam o acasalamento naturalmente, precisam de 1 a 32 zangões para efetuarem a cópula bem-sucedida. Já em rainhas inseminadas, é recomendado em média de 20 a 25 zangões. Novaes (2011), complementa que é importante a criação contínua de zangões, pois é inviável dispor de rainhas selecionadas e não contar com zangões para fecundá-las.

Com uma produção contínua de zangões, torna-se viável a sua criação, podendo ser selecionados os de melhor qualidade, através do desempenho de suas irmãs (FERT, 2013). Em um experimento realizado por Delaplane e Harbo (1987), foi testada a hipótese de que operárias jovens produzem uma maior proporção de zangões do que operárias mais velhas, quando a rainha está ausente, e tal resultado foi observado em 3 das 6 colônias do experimento.

3.2 INDUÇÃO DA OVIPOSIÇÃO POR CO₂ EM RAINHAS

O tratamento com CO₂, tem por objetivo estimular a rainha virgem à oviposição, intensificando a produção de zangões, no início da exposição observa-se uma perda de peso, redução ou atraso da produção de feromônios, podendo inibir voos de acasalamento (WOYKE et al., 1995).

Segundo Macedo (2009), os efeitos do tratamento de CO₂ possuem dois extremos, onde pode ser alterada a reprodução, desenvolvimento, alimentação e aspectos corporais dos insetos pela exposição; mas contudo, é possível aumentar os níveis de vitelogenina, a principal proteína formadora do ovo na hemolinfa, acelerando o desenvolvimento ovariano e iniciando a oviposição de ovos mais cedo.

Em um estudo realizado por Bienkowska (2012), foi constatado que tratamentos com altas taxas de exposição ao CO₂ puro durante a inseminação instrumental podem antecipar o

início da oviposição. Em rainhas tratadas com um maior tempo ao CO₂ a postura começou mais cedo, comparado com aquelas que receberam baixas doses de CO₂, tendo a oviposição mais tardia, mas o trabalho não se referiu a rainhas virgens.

Otten et al. (1998), observaram que 70% das rainhas inseminadas colocadas em colônias fracas (baixa população de operárias e baixa quantidade de alimento armazenado) ovipositaram, enquanto em colônias fortes, aproximadamente 95% das rainhas ovipositaram.

De acordo com Mackensen (1947), que utilizou duas doses de tratamentos com CO₂ em rainhas virgens, não informando os intervalos entre as exposições de 10 minutos cada, o mesmo observou um encurtamento no período de oviposição. Ao reintroduzi-las nas colônias verificou que iniciaram a postura a partir de 11-23 dias de idade, já as rainhas sem a exposição ao CO₂, começaram a oviposição com 18-67 dias de idade.

Na literatura existem estudos realizados com o tratamento de CO₂, mas não informam a metodologia completa utilizada, como é o caso de Schlüns et al. (2003), que administrou CO₂ em rainhas virgens, mas não indicou a dosagem utilizada em seus tratamentos, tendo como resultado a postura de ovos de zangões em células de operárias. Mackensen (1947) e Cobey et al. (2013), referem-se ao início da exposição das rainhas ao tratamento, onde aplica-se CO₂ no 4º dia após a emergência e ao 5º dia, respectivamente, no entanto os autores não determinaram os períodos de exposição ao CO₂.

3.3 PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO EM ABELHAS

O melhoramento genético de abelhas não é tão desenvolvido como em outras espécies (BIENEFELD et al., 2007), o que se deve ao controle de informações e aos métodos de avaliação genética disponíveis para animais diploides. O sucesso alcançado na atualidade se deve ao manejo, produção, correlações genéticas entre características importantes, estimativa de parâmetros genéticos e pesquisas sobre o uso correto dos dados obtidos (COSTA-MAIA & LINO, 2009). As melhorias devem ser feitas selecionando animais com maior valor genético para características específicas (RODRIGUES, 2015).

Porém, para utilizar métodos de seleção, é necessário padronizar e formar dados de avaliações genéticas. Entre as abelhas africanizadas existem poucos padrões para a produção de rainhas e zangões. Para rainhas, a técnica descrita por Doolittle (1889), é amplamente utilizada, mas pouco se sabe sobre a produção de zangões.

Na pesquisa com abelhas, a rainha é considerada o indivíduo principal, pois é responsável pela criação de outros indivíduos na colônia, sendo responsável por imprimir

metade da sua carga genética em operárias e toda carga genética em zangões (RINDERER et al., 1983). No entanto, se considerarmos que os zangões são responsáveis por metade do material genético herdado pelas operárias, seu impacto nos programas de melhoramento animal começa a ganhar destaque (FAQUINELLO et al., 2011).

Técnicas como a inseminação instrumental podem permitir o controle do acasalamento (COBEY, 2007). A avaliação precisa de zangões e rainhas, concede selecionar animais com reais vantagens genéticas, melhorando a acurácia e eficiência dos programas de melhoramento genético em abelhas (COSTA-MAIA, 2013; MARTINEZ & SOARES, 2012; COSTA-MAIA & LINO, 2009; MARTINS, 2014).

Em virtude da falta de pesquisas para avaliar a contribuição genética dos zangões e para tornar o programa de melhoramento genético de abelhas africanizadas bem-sucedido e eficaz, a produção de alta qualidade e técnicas de manejo apropriadas devem ser usados para produzir e selecionar machos e fêmeas, mais adequados para o programa.

3.4 ESTUDOS REALIZADOS COM CO₂

Em um estudo sobre o uso de diferentes concentrações de CO₂ na biologia de insetos predadores, elaborado por Morato (2011), em que ovos de *Ceraeochrysa cincta* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae), foram expostos ao CO₂, visando avaliar sua viabilidade, os resultados mostram que a maior concentração de CO₂ ($411,55 \pm 7,04$ ppm), tem efeito direto e positivo na viabilidade dos ovos (81,48%) da espécie.

Tratamentos com CO₂ em *A. mellifera*, com tempos elevados (30, 60 e 120 segundos), sugerem segundo Ebadi (1980), a redução da sobrevivência e o comportamento de coleta de pólen em abelhas forrageiras, o mesmo autor comenta que a narcose com CO₂ puro não devem ultrapassar 15 segundos, evitando os riscos de alterações fisiológicas e comportamento anormal.

Em abelhas rainhas a aplicação do CO₂ demonstra que até o quinto dia de idade, a narcose não causa alterações no desenvolvimento ovariano, mas, no entanto, aos dez dias de idade, os ovários das rainhas tratadas mostram uma diminuição na taxa de morte celular (BERGER, 2010), o mesmo autor comenta que este efeito não perdura aos 15 dias de idade, não tendo diferença na mortalidade celular.

Com base em estudos realizados com CO₂, empregado para verificar se há alteração nas funções cerebrais de abelhas *A. mellifera*, demonstra que, a aplicação do gás não altera a

morfologia do cérebro, bem como mudanças de aprendizagem e orientações destes insetos (JACOB, 2009).

A utilização de CO₂ também é usual no abate de suínos, onde é possível o atordoamento dos animais em grupos (CHRISTENSEN & BARTON-GADE, 1997), e normalmente mostra baixas taxas de salpicamento na carcaça (BARTON-GADE, 1999b), mas não está provado cientificamente que este método de abate causa alguma dor durante a fase de excitação (VELARDE et al., 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE RAINHAS

O experimento foi conduzido na área experimental do Apiário e Laboratório da Unidade de Ensino e Pesquisa em Apicultura (UNEPE) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, coordenadas de 25°41'26.8" de latitude S e 53°05'57.1" de longitude W (Figura 1).



Figura 1: Área experimental da Unepe Apicultura denotada em vermelho, contendo as colmeias que foram utilizadas para a realização do experimento.

Fonte: Google Earth, (2021).

Para a condução do experimento foram utilizadas 30 colônias de *A. mellifera* africanizada, alojadas em colmeias tipo Langstroth de cinco favos, com telas excludoras de alvado. As rainhas virgens foram produzidas segundo o método Doolittle (1889) que consiste em transferir larvas de zero a 24 horas de idade para cúpulas acrílicas com uma pequena quantidade de geleia real pura (Figura 2).



Figura 2. Cúpulas de acrílico, com geleia real usadas para a transferência de larvas, fixadas em sarrafos.
Fonte: França, M. B. 2020.

Os quadros-porta cúpulas (com dois sarrafos e 14 cúpulas cada) foram inseridos na colônia minirrecria para que fossem limpos pelas operárias por 24 horas. Após esse período, no laboratório, larvas de zero a 24 horas foram transferidas para as cúpulas com geleia real. Em seguida, o quadro porta-cúpulas com as larvas foi devolvido na parte superior da minirrecria.

Dez dias após a transferência de larvas, as realeiras (Figura 3) foram alojadas individualmente em frascos de vidros de 20 ml com uma “escada” feita de papel, para que ao emergir a rainha possa caminhar sem escorregar (Figura 4) e uma pequena quantidade de *candy* para alimentação. Os frascos foram alocados em uma estufa com temperatura de 34° e umidade de 60% (Figura 5).



Figura 3. Sarrafo retirado da minirrecria com as realeiras, para a conferência da aceitação das larvas pela colônia receptora.

Fonte: França, M. B. 2020.



Figura 4. Frasco de vidro alojando à realeira, com uma escada feita de papel e a identificação da minirrecria que o sarrafo foi posto.

Fonte: França, M. B. 2020.



**Figura 5. Realeiras em frascos de 20 mL alocadas em estufa com temperatura de 34°C e umidade de 60%.
Fonte: França, M. B. 2020.**

O monitoramento das cúpulas das rainhas ocorreu de forma ininterrupta para, após a emergência as rainhas foram identificadas com marcas plásticas numeradas no tórax, e em seguida alocadas em gaiolas tipo JZsBZs™ com quatro operárias nutrizas cada uma, as quais tem como função nutrir e cuidar da abelha rainha (Figura 6).



**Figura 6. Gaiola com rainha marcada (indicação com a seta vermelha) e operárias acompanhantes (indicação com setas azuis).
Fonte: França, M. B. 2020.**

4.2 TRATAMENTOS

Anteriormente, Fornazari (2016), desenvolveu um protocolo de produção de zangões por meio da oviposição de rainhas virgens induzidas com CO₂ por 24, 48 e 72 horas. O tratamento

com menor tempo de exposição ao CO₂ (24h) apresentou a maior probabilidade de oviposição (68%) e foi o escolhido para a validação neste trabalho.

Para tanto, após 24 horas de emergência das rainhas, vinte rainhas virgens receberam tratamento de 24 horas de CO₂ (Tratamento 1), e outras dez rainhas virgens não receberam o tratamento de CO₂ (Tratamento controle) (Figura 7).

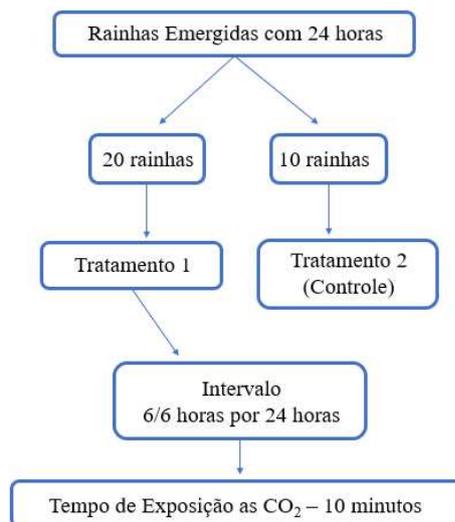


Figura 7. Diagrama experimental
Fonte: França, M. B. 2020.

Para o tratamento 1, as rainhas foram alocadas em um saco plástico, e receberam três doses de CO₂, de 10 minutos cada (Figura 8). O procedimento foi repetido a cada seis horas, por 24 horas. As rainhas do controle foram submetidas ao mesmo procedimento, porém sem a utilização do CO₂. Após a realização dos tratamentos, as rainhas permaneceram em suas gaiolas, acompanhadas de operárias nutrizas (Figura 9).



Figura 8. Saco plástico transparente com as gaiolas utilizado para a administração do CO₂.
Fonte: França, M. B. 2020.



Figura 9. Rainhas em gaiolas acompanhadas de nutrizes.

Fonte: França, M. B. 2020.

4.3 INTRODUÇÃO DAS RAINHAS A CAMPO E MENSURAÇÕES

As colônias selecionadas para o experimento estavam compostas de cinco favos, com presença de pólen, população estimada de 35.000 a 50.000 operárias, com espaço para oviposição de forma que todas as rainhas tivessem um ambiente uniforme à introdução.

Todas as colônias foram orfanadas 48 horas antes da introdução das rainhas virgens, sendo que cada colmeia recebeu um quadro com cera alveolada de operárias e uma tela excludora de alvado para garantir que as rainhas virgens não saíssem para o voo de fecundação natural. As rainhas virgens dos dois tratamentos foram introduzidas individualmente em suas respectivas colônias, de maneira direta, sem a utilização de gaiolas (Figura 10).



Figura 10. Rainha introduzida na colônia.

Fonte: França, M. B. 2020.

Como a orfanção e introdução de rainhas virgens é um processo com baixa possibilidade de sucesso, as rainhas fecundadas, retiradas de suas colônias originais, permaneceram em estufa com temperatura e umidade controladas. Caso não ocorresse a aceitação das rainhas virgens do experimento, a rainha fecundada, seria reintroduzida na colônia.

Essas colônias receberam suplementação proteica e energética semanal (3 vezes por semana), durante sessenta dias consecutivos. O alimento energético foi produzido a base de açúcar e água na proporção de 1:1 (kg de açúcar: litro de água), e a suplementação proteica foi formulada segundo Sereia (2009).

Composição Química	Unidade em 100g	Ingredientes Seleccionados								
		Proteína isolada soja	Óleo Linhaça	Óleo Palma	Levedo cerveja	Açúcar	Mel	Pólen	Lecitina de soja	Núcleo vitaminas
Água	g	4,20	0,00	0,00	8,90	0,03	17,10	16,80	0,00	0,00
Calorias	kcal	350,00	900,00	900,00	269,00	387,00	304,00	405,00	850,00	0,00
Carboidratos	g	0,00	0,00	0,00	30,40	99,90	82,40	35,00	0,20	0,00
Fibra total	g	0,00	2,40	0,00	0,00	0,00	0,20	1,10	0,00	0,00
Minerais	g	5,70	0,00	0,00	7,40	0,00	0,60	2,60	0,00	0,00
Cálcio	mg	200,00	0,00	0,00	232,00	1,00	6,00	260,00	10,00	0,00
Fósforo	mg	674,00	0,00	0,00	1597,00	0,00	4,00	430,00	36,00	0,00
Sódio	mg	1000,00	0,00	0,00	605,00	0,00	4,00	200,00	0,00	0,00
Tiamina (B1)	mg	0,30	0,00	0,00	17,60	0,00	0,01	800,00	12,00	22,30
Riboflavina (B2)	mg	0,30	0,00	0,00	6,60	0,02	0,04	1920,00	4,00	160,00
Niacina (B3)	mg	0,40	0,00	0,00	34,60	0,00	0,12	20,00	25,00	980,00
Ac. Pantototênico (B5)	mg	4,20	0,00	0,00	11,30	0,00	0,07	2600,00	0,00	323,40
Piridoxina (B6)	mg	0,80	0,00	0,00	1,60	0,00	0,02	380,00	0,00	81,70
Cianocobalamina B12)	mg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	500,00	0,00	0,80
Ácido fólico	mg	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1850,00	0,00	8,00
Biotina	mg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,00	1,60
Vitamina A	mg	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	590,00	0,40	70,00
Vitamina E	mg	10,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,00	240,00	400,00
Lípidos totais	g	0,00	100,00	100,00	1,40	0,00	0,00	6,20	40,00	0,00
Palmitico C16:0	g	0,00	0,00	43,50	44,90	0,00	0,00	28,70	11,70	0,00
Óleo C18:1	g	0,00	27,00	36,60	33,90	0,00	0,00	2,90	18,00	0,00
Linoleico C18:2	g	0,00	16,00	9,10	5,10	0,00	0,00	5,40	0,00	0,00
Linolênico 18:3	g	0,00	57,00	0,20	0,60	0,00	0,00	49,50	0,00	0,00
Proteínas	g	90,00	0,00	0,00	49,00	0,00	0,30	26,20	0,00	0,00

Fonte: Sereia (2009).

A abertura das colônias foi realizada depois de 72 horas da introdução, onde observou-se a aceitação ou a não aceitação da rainha pelas operárias. As colônias com rainhas aceitas foram monitoradas por um período de 20 dias por meio de registros fotográficos e anotações em planilhas de papel quanto à oviposição, presença da rainha, construção de realeiras, desenvolvimento das crias e emergência dos zangões, além dos aspectos gerais de desenvolvimento da colônia. As colônias com rainhas rejeitadas (Figura 11 e 12) tiveram suas respectivas rainhas fecundadas originais reintroduzidas e não foram consideradas no experimento.



Figura 10. Rainha virgem com marca verde rejeitada pela colônia.
Fonte: França, M. B. 2020.



Figura 11. Rainha sem marca plástica rejeitada pela colônia.
Fonte: França, M. B. 2020.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS

Os dados de aceitação foram analisados por meio do teste de Qui-quadrado (R, 2020), com nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$), e os dados de oviposição foram comparados qualitativamente entre os tratamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A repetição do melhor tratamento com CO₂, encontrado por Fornazari (2016), que previu uma probabilidade de 68% para oviposição foi realizado por meio deste trabalho, e os dados descritivos sobre o número de rainhas expostas e não expostas, resistentes, introduzidas, aceitas e em oviposição para os tratamentos 1 e controle estão na Tabela 1.

Tabela 1. Observações quanto ao número de rainhas resistentes, rejeitadas e aceitas pelas colônias, e em oviposição entre os tratamentos com CO₂ e controle.

Observações (número de rainhas)	Tratamentos	
	CO ₂ (n=20)	Controle (n=10)
Resistentes ao tratamento	20	10
Rejeitadas	16	6
Aceitas	4	4
Oviposição	2	0

Todas as rainhas expostas ao Tratamento com CO₂ sobreviveram, corroborando com Fornazari (2016), que recomendou a utilização do gás carbônico em intervalos de tempo de 6 em 6 horas, em até 24 horas. Em contrapartida, a taxa de aceitação do tratamento com CO₂ (20%) foi muito inferior ao encontrado pelo mesmo autor (60%).

O status reprodutivo das rainhas tem impacto significativo no aceite das mesmas pela colônia, segundo MORETTO, STRAPAZZON e BITTENCOURT (2007) a aceitação de rainhas virgens pelas colônias é muito menor do que a das rainhas fecundadas, e a eficiência do processo é de cerca de 40% (DUAY, 1994). No tratamento controle, o aceite foi exatamente de 40%, o que nos levou a seguinte pergunta: “O CO₂ influencia negativamente o aceite das rainhas pelas operárias?”.

Para tanto, em função do alto índice de rejeição (80%) das rainhas submetidas ao tratamento com CO₂, utilizou-se o teste do qui-quadrado (Tabela 2) para avaliar o efeito do gás carbônico ao aceite. Apesar do baixo número de repetições por tratamento, a utilização ou não do tratamento com CO₂ não influenciou o aceite ($p > 0,05$), sendo assim outros fatores poderiam ser avaliados como a redução da idade da rainha virgem, à introdução.

Tabela 2. Aceitação e oviposição de rainhas virgens que receberam o tratamento com dióxido de carbono (CO₂) e tratamento controle (sem CO₂).

Tratamento	Aceitação	Oviposição
Com CO ₂ (n=20) *	4	2
Sem CO ₂ (n=10) *	4	0
Com CO ₂ (n=5) (Fornazari, 2016)	3	2

* p=0,47 (aceitação)

Pérez-Sato e Ratnieks (2006) encontraram sucesso de aceite para rainhas virgens, assim como na oviposição pós-fecundação, de 65%, quando elas foram introduzidas em núcleos órfãos de cinco quadros, com no máximo um dia de idade. O sucesso da mesma operação caiu para 55%, quando rainhas de três a quatro dias de idade foram introduzidas. A relação entre a idade da rainha virgem à introdução, aceite pela colônia e oviposição são antagônicas, pois quanto mais tempo a rainha virgem fica ausente na colônia, a contar do momento de sua emergência, pior será seu desempenho reprodutivo, pois sua fertilidade será prejudicada (BERGER, POIANI e LANDIM, 2016).

Em nosso trabalho, as rainhas virgens foram introduzidas em média com 48 horas de idade (24h após a emergência + 24 horas de tratamento), o que pode ter influenciado o aceite das rainhas pelas colônias. Sendo assim, trabalhos futuros com a indução à oviposição poderiam considerar a concentração do tratamento de CO₂ nas primeiras 24 horas de vida das rainhas virgens a fim de aumentar a probabilidade de aceite e possibilidade de oviposição.

Independentemente do tratamento, as rainhas que não foram aceitas (22), morreram em média três dias após serem introduzidas nas colônias. A morte das rainhas após a introdução pode ser causada por problemas na produção, manejo e baixa síntese do feromônio (COBEY, 2007). Apesar da alta mortalidade, o trabalho aqui apresentado (Tabela 2) corrobora com os resultados obtidos por Cobey (2007), quanto ao fato de que o CO₂ tem efeito positivo no início da oviposição de rainhas. Entre as rainhas aceitas com dióxido de carbono (4), duas rainhas (50%) ovipositaram zangões, e as outras duas sobreviveram na colônia por 14 dias, mas não iniciaram a oviposição.

O objetivo de um protocolo experimental padronizado se mostra de grande importância, no entanto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o protocolo precisa ser aprimorado, e posteriormente utilizado para a produção de zangões de forma controlada em

programas de melhoramento genético para incremento da produção, para a conservação da espécie entre outras atividades.

6 CONCLUSÃO

O dióxido de carbono não tem efeito sobre a aceitação de rainhas pelas colônias, e parece influenciar positivamente na oviposição de ovos que deram origem a machos, pelas rainhas virgens. No entanto, para que um protocolo seja estabelecido, adequações na idade de introdução das rainhas nas colônias poderia aumentar a probabilidade de aceitação e consequente oviposição.

7 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO NETO, E. R. de et al. **Produção de zangões de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. No semiárido nordestino do Brasil**. 2019.
- BARTON-GADE, P. Preliminary observations of pig behaviour on immersion in high concentrations of CO₂ gas. **International Workshop on Stunning Systems for Pigs and animal welfare**. Billund, Denmark 25-27 August 1999b.
- BERGER, B. **Controles do desenvolvimento ovariano em abelhas africanizadas adultas, *Apis mellifera* Linné, 1758 (Hymenoptera, Apidae)**. 2010.
- BERGER, B; POIANI, S. B; DA CRUZ-LANDIM, C. Beekeeping practice: effects of *Apis mellifera* virgin queen management on ovary development. **Apidologie**, v. 47, n. 4, p. 589-595, 2016.
- BIENEFELD, K.; EHRHARDT, K.; REINHARDT, F. Genetic evaluation in the honey bee considering queen and worker effects - a BLUP- animal model approach. **Apidologie**, v. 38, p. 77-85, 2007.
- BIENKOWSKA, M. et al. Effect of Different carbon dioxide gas concentrations used during the inseminations of honey bee queen on starting oviposition. **Journal of Apicultural Science**; v.56, n.1, 2012.
- BOES, K. E. Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: an interplay of queen and worker decisions. **Insectes sociaux**. v. 57, n.1, p. 1–9, 2010.
- CASTILHOS, D. et al. Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, v. 50, n. 3, p. 263-272, 2019.
- CHRISTENSEN, L & BARTON GADE, P. **New Danish developments in pig handling at abattoirs**. Slagteriernes Forskningsinstitut, Danish Meat Research Institute, Manuscript n0 1378 E, 1997.
- COBEY, S. W. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. **Apidologie**, v. 38, n. 4, p. 390-410, 2007.
- COBEY, S. W. et al. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. **Journal of Apicultural Research**. 10.3896/IBRA.1.52.4.09, 2013.
- COSTA, F. M. **Estudo de parâmetros genéticos para ovariolos e espermoteca de rainhas *Apis mellifera* africanizadas selecionadas para peso à emergência**. 2013.31f. Projeto de pesquisa – Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPQ). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2013.
- COSTA-MAIA, F. M.; LINO, D. A. **Melhoramento genético em abelhas *Apis mellifera* africanizadas: algumas questões decisivas**. Sistemas de produção agropecuária. Dois Vizinhos: UTFPR, p. 434-449, 2009.

DELAPLANE, K. S.; HARBO, J. R. Drone production by young versus old worker honeybees in queenless colonies. **Apidologie**; v. 18, n. 2, p. 115-120, 1987.

DOOLITTLE, G.M. **Scientific Queen-Rearing as practically applied**. Chicago: Ills, 1889.

DUAY, P.R. Introdução e fecundação de abelhas rainhas de *Apis mellifera*. In: **Congresso de Apicultura**, 1994, Goiás. Anais... Goiás: Rio Quente, 1994.

EBADI, R., NORMAN E. G., LORENZEN, K., Effects of Carbon Dioxide and Low Temperature Narcosis on Honey Bees, *Apis mellifera*, **Environmental Entomology**, Volume 9, Issue 1, 1 de fevereiro de 1980, Pages 144-150, <https://doi.org/10.1093/ee/9.1.144>.

FAQUINELLO, P. et al. Parameters for Royal Jelly Production in Africanized Honeybees. **Sociobiology**, v. 57, n. 3, p.495-509, 2011.

FERT, G. **Cría de Reinas**. 2. Ed. 2013.

FORNAZARI, R. R. **Produção de Zangões Africanizados para Desenvolvimento de Programas de Melhoramento Genético Animal**. Trabalho de Conclusão de Curso. - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2016.

FREE, J. B.; WILLIAMS, I. H. Factors determining the rearing and rejection of drones by the honeybee colony. **Animal Behaviour**; v.23, p. 650-675, 1975.

HENDERSON, C. E. Influence of the presence of adult drones on the further production of drones in honey bee (*Apis mellifera* L) colonies. **Apidologie**. n.25, v. 1. p. 31-37, 1994.

JACOB, C. R. de O. **Avaliação da toxicidade do dióxido de carbono no sistema nervoso de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. 53 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado e licenciatura - Ciências biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2009.

KAFTANOGLU, O.; PENG, Y. S. Effects of insemination on the initiation of oviposition in the queen honeybee. **Journal of Apicultural Research**, v. 21, n. 1, p. 3-6, 1982.

LEE, P. C.; WINSTON, M. L. The effect of swarm size and date of issue on comb construction in newly founded colonies of honeybees (*Apis mellifera* L.). **Canadian Journal of Zoology**; v.63, n. 3, p. 524-527, 1985.

MACEDO, L. M. F de. **Efeito do CO₂ sobre a senescência e ativação dos ovários de *Apis mellifera***. 86f. Dissertação (mestrado em ciências) – Faculdade de filosofia, Ciências e letras, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

MACKENSEN, O. **Effect of carbon dioxide on initial oviposition of artificialy inseminated and virgin queen bees**. **Journal of Economic Entomology**; v.40, n.3 p.344-349, 1947.

MARTINEZ, O, A; SOARES, A. E. E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**; v. 13, n. 4, 2012.

- MARTINS, J. R. M. **Aspectos genéticos de características morfométricas e reprodutivas de rainhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizadas.** 89 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2014.
- MORATO, J. B. et al. Influência de diferentes concentrações de CO₂ no período de incubação e viabilidade de ovos de *Ceraeochrysa cincta* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 7., 2011, Fortaleza. Ética na ciência: agroecologia como paradigma para o desenvolvimento rural. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2011.
- MORETTO, G.; STRAPAZZON, R.; BITTENCOURT, D. **Substituição artificial de rainhas pelo método de divisão vertical de colônias de abelhas *Apis mellifera*.** Mensagem Doce, v. 93, p. 3-6, 2007.
- NOVAES, A. B. **Produção e Inseminação artificial de rainhas de abelhas *Apis mellifera*.** Uberlândia: EDUFU, 132 p. 2011.
- OTTEN C., OTTO A., RENNER R. Artificial insemination: Methodological influences on the results. **Apidologie**; 29(5): 467-468, 1998.
- PÉREZ-SATO, J. A; RATNIEKS, F, L.W. Comparing alternative methods of introducing virgin queens (*Apis mellifera*) into mating nucleus hives. **Apidologie**, v. 37, n. 5, p. 571-576, 2006.
- R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020.
- RANGEL, J., KELLER, J.J., TARPY, D.R. **The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth.** Insect. Soc. 60, 65 –73, 2013.
- RHODES, J. W. **Drone honey bees - rearing and maintenance.** Agnote: DAI, v.112, p.1-2, 2002.
- RHODES, J. W. **Drone mother colonies – numbers and positioning.** Agnote: DAI, v. 111, p. 1 – 3, 1999.
- RINDERER, T. E.; COLLINS, A. M.; BROWN, M. A. Heritabilities and correlations of the honey bee: response to *Nosema Apis*, longevity and alarm response to Isopentyl Acetate. **Apidologie**, v.14, p.79-85, 1983.
- RODRIGUES, M. C. **Estimativas de heritabilidade e correlação genética para características morfométricas de zangões *Apis mellifera* L. africanizados.** 48 f. Tese (Mestrado em Engenharia Zootecnia)- Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, 2015.
- SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological conservation**, v. 232, p. 8-27, 2019.

SCHLÜNS, et al. Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. **Apidologie**, 2003.

SILVA, C. M. et al. Análises Preliminares do Desenvolvimento de *Melipona scutellaris* nas Condições de Brejo Paraibano. In: Zootec, **Anais...**, João Pessoa-PB. 2008.

SNUSTA, D. P; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética: A base cromossômica do mendelismo. 6.ed. Rio de Janeiro.** Guanabara Koogan S.A. 114p. 2013.

TAUTZ, J. **O Fenômeno das Abelhas.** Porto Alegre, 2010.

VELARDE, A. L., FAUCITANO, M., GISPERT, M. A., OLIVER, M. A., DIESTRE, A. A survey of the efficacy of electrical and carbon dioxide stunning on insensitivity in slaughter pigs. Proc. **International Congress of Meat Science and Technology** (Barcelona, Spain) v.44, p.1076-1077 (Abstract C124), 1998.

VISSCHER, P. K. **A quantitative study of worker reproduction in honey bee colonies.** Behavioral Ecology and Sociobiology. n. 25, v.4, p- 247-254, 1989.

WOYKE, J., JASINSKI Z., FLISZIEKIEWIC, C. Further investigation on natural mating of instrumentally inseminated queen bees, **J. Apic.** Res. 34, 105– 106, 1995.