

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES POLIMÓRFICAS PARA ALTA PRODUTIVIDADE DE
MEL E SEQUÊNCIAMENTO GENÔMICO EM ABELHAS *Apis mellifera*
AFRICANIZADAS**

SAMIR MOURA KADRI

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor.

BOTUCATU-SP
Abril - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES POLIMÓRFICAS PARA ALTA PRODUTIVIDADE DE
MEL E SEQUÊNCIAMENTO GENÔMICO EM ABELHAS *Apis mellifera*
AFRICANIZADAS**

SAMIR MOURA KADRI

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. AMRO ZAYED

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor.

BOTUCATU-SP
Abril - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

K11i Kadri, Samir Moura, 1986-
Identificação de regiões polimórficas para alta produtividade de mel e sequenciamento genômico em abelhas *Apis mellifera* africanizadas / Samir Moura Kadri. - Botucatu : [s.n.], 2016
x, 75 f. : ils. color.; grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2016
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Coorientador: Amro Zayed
Inclui bibliografia

1. Abelha - Criação. 2. Abelha africanizada - Melhoramento genético. 3. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Zayed, Amro. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

“Não é digno de saborear o mel, aquele que se afasta da colmeia com medo das picadas das abelhas”

William Shakespeare

DEDICO

Aos meus pais, Assein Kadri e Maria das Neves Moura Fernandes, pessoas muito especiais pelas quais eu agradeço a Deus todos os dias. Pessoas que me fizeram ser quem eu sou, que me apoiam sem limites para que eu conquiste meus sonhos, alcance os meus objetivos e não medem esforços para me ver feliz. Pessoas que eu quero sempre encher de orgulho e dar o meu melhor. Amo vocês demais.

Meu Irmão, Nabil Moura Kadri, que esteve ao meu lado em todos os momentos, acreditando e apoiando e, o mais importante, sempre me lembrando de acreditar no que eu faço.

AGRADEÇO

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por iluminar minha vida e colocar pessoas especiais nos meus caminhos, que me ajudaram a conquistar este título.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, amigo e orientador na vida profissional e pessoal. Muito obrigado pela confiança depositada em mim e principalmente pela oportunidade para realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, pelos ensinamentos, oportunidades, disponibilidades de equipamentos e conhecimentos na área de genética molecular.

Ao Dr. Diego Peres Alonso, pela ajuda nas análises moleculares, ensinamento na área de genética molecular e pela total dedicação a esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Amro Zayed pela co-orientação, receptividade no Zayed Lab, York University, Toronto-Canadá e participação em minha tese de doutorado na área de genética de populações e identificação de SNPs.

Ao doutorando Brock Harpur, pelos ensinamentos em bioinformática e toda sua paciência e dedicação nas pesquisas desenvolvidas em conjunto no Zayed Lab, York University.

A minha namorada Juliana Mara Costa, por toda a ajuda e paciência em todas as horas de dificuldades para o desenvolvimento e elaboração desta tese.

Aos meus amigos de pós-graduação do grupo NECTAR, Adriana Fava Negrão, Melina Stoian Modanesi, Thaís Bovi, Edison Antônio de Souza, Rodrigo Zaluski, Cinthia Rio Branco da Silva e Marcela Carrillo Pedraza, pelo companheirismo ao longo de toda esta etapa concluída em minha vida.

Aos meus amigos da República D.N.A, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos demais professores do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal e Departamento de Produção Animal que trabalharam pela minha formação durante a Graduação e Pós-graduação.

As secretárias da seção de pós-graduação, pela atenção e orientações nas questões burocráticas.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, pelos ensinamentos e oportunidades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior - CAPES e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2013/01588-1 e BEPE 2014/10150-2), pelas bolsas de estudos concedidas.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”
Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	01
Considerações Iniciais.....	02
1.Abelhas <i>Apis mellifera</i>	02
2.Biologia das abelhas <i>Apis mellifera</i>	04
3.Mel: origem e manejo.....	05
4.Comportamento higiênico em abelhas <i>Apis mellifera</i>	08
5.Comportamento defensivo em abelhas <i>Apis mellifera</i> Africanizada.....	10
6.Técnicas para estudo de populações de <i>Apis mellifera</i>	14
7.Referências.....	18
 CAPÍTULO II.....	 29
Polimorfismo de nucleotídeo único e genes candidatos associados com alta produção de mel em abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas.....	30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
1.Introdução.....	33
2.Material e métodos.....	34
3.Resultados	39
4.Discussão.....	41
5.Agradecimentos.....	44
6.Referências.....	45
 CAPÍTULO III.....	 58
A Variant Reference Data Set for the Polyhybrid Africanized Honey Bee (<i>Apis mellifera</i>).....	59
Abstract.....	60
1.Background & Summary.....	61
2.Methods.....	62
2.2. Sampling and Sample information.....	62
2.3. Genome Aligment and Variant Calling.....	64
2.4. Population Differentiation and Admixture.....	64
3. Code Availability.....	65
4. Data Records.....	65

5. Technical Validation.....	66
6. Acknowledgements.....	66
7. Authors Contributions.....	67
8. Competing interests.....	67
9. References.....	71
CAPÍTULO IV.....	73
Implicações.....	74

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura1. Sequência de eventos em abelhas para desencadeamento do comportamento defensivo (BREED et al., 2004).....	11
---	-----------

CAPÍTULO II

Figura1. Fluxograma da pipeline utilizada para a análise dos reads feitos em seqüenciamento Illumina.....	49
--	-----------

CAPÍTULO III

Figure 1. Overview of alignment and SNP calling pipeline	68
---	-----------

Figure 2. Correlation of allele frequency between Africanized and A) A-lineage B) C-lineage and C) M-lineage alleles. Africanized bees are expected to have allelic variation more highly correlated to A-lineage than other lineages. Red line shows results of linear model fit (GLM, $F_{3,78904} = 15470$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$).....	69
---	-----------

ÍNDICE DE QUADROS

CAPÍTULO II

Quadro 1. Identificação dos SNPs (ID), sequencia Primer Forward e Reverse, concentração dos primers (μM), reporter 1 e 2 (VIC e FAM- sequências) e concentração dos reportes VIC e FAM (μM)....	51
Quadro 2. Identificação, posição dos SNPs em relação ao genoma padrão, genótipo, produção de mel da colônia (kg) (Fenótipo) e valor de P calculado pelo programa PLINK version 1.05 em relação à Fst dos SNPs dos dois grupos, APM e BPM.....	52
Quadro 3. Identificação do SNP, identificação do gene candidato para produção de mel, e função.....	53
Quadro 4. Identificação dos SNPs, genótipo, número de amostras positivas para o genótipo pertencentes ao grupo BPM e APM.....	54
Quadro Suplementar 1. SNPs associados à produção de mel. Cromossomo, Scaffold, posição e valor de P calculado pelo programa PLINK version 1.05 em relação à Fst dos SNPs dos dois grupos APM e BPM.....	55

CAPÍTULO III

Table 1: Sample Sequencing and Accession information.....	70
--	-----------

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. ABELHAS *Apis mellifera*

As abelhas *Apis* são originárias do continente africano e europeu e de parte da Ásia ocidental (RUTTNER, 1988). Ao longo destas áreas, elas ocupam os mais variados ambientes, como desertos, florestas tropicais, altas montanhas e savanas, dentre outros (SMITH, 1961). A diversidade de ambientes ocupados está diretamente associada às características morfológicas das subespécies (SHEPPARD et al., 1997; SHEPPARD; MEIXNER, 2003), apresentando características comportamentais e adaptativas aos ambientes.

Atualmente existem cinco grupos de abelhas *Apis mellifera*: A (Africana), *A. m. scutellata*, *A. m. capensis*, *A. m. lamarckii*, *A. m. litorea*, *A. m. adansonii* e *A. m. unicolor*; M (Europa Ocidental), *A. m. mellifera*, *A. m. iberica*, e *A. m. intermissa*; C (Europa Oriental), *A. m. carnica* e *A. m. ligustica*; O (Oriente médio); *A. m. anatolica*, *A. m. caucasica*, *A. m. syriaca*, *A. m. pomonella* e *A. m. cyprica* e Y (Etiópes) (FRANCK et al., 2000; WALLBERG et al., 2014), existindo pelo menos 24 subespécies (RUTTNER, 1988).

Após a expansão europeia e a colonização de novos continentes descobertos, as abelhas *A. mellifera*, que a princípio ocupavam somente o Velho Mundo, foram introduzidas nos demais continentes descobertos. Os primeiros registros de abelhas *A. mellifera* nas Américas datam do século XVIII com a introdução de colmeias de *A. mellifera mellifera* da Europa Ocidental nos Estados Unidos (RUTTNER, 1992).

A introdução no Brasil das subespécies *A. m. mellifera* e a *A. m. carnica* ocorreu em 1839, pelo padre Antônio Carneiro Aureliano que importou colmeias de Portugal e Espanha e instalou-as no Rio de Janeiro (CRANE, 1999). Até esse ano havia apenas registro de abelhas sem ferrão no território brasileiro (NOGUEIRA-NETO, 1972). Com a introdução destas abelhas, além do objetivo de se produzir mel, pretendia-se utilizar a cera branca produzida por elas para a fabricação de velas para fins religiosos, uma vez que a cera produzida pelas abelhas nativas é de cor amarronzada, por ser uma mistura de cera e resinas, entre outros produtos. Primeiramente, foram introduzidas nove colmeias, sendo que destas apenas duas sobreviveram. Ao final do primeiro ano o número de colmeias aumentou para 50. Em 1841 já havia mais de 200 colmeias instaladas na Quinta Imperial no Rio de Janeiro (NOGUEIRA-NETO, 1972).

Os colonizadores alemães, em 1845, nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, trouxe consigo a *A. m. mellifera*, conhecidas como “Negra” (TRINDADE et al., 2004). Entre os anos de 1870 e 1880, os imigrantes alemães Hannemann, Schenck, Hanewn e Brunnet trouxeram as primeiras *A. m. ligustica* e *A. m. caucasica*, originárias da Itália e Sul da Rússia, respectivamente, para o Sul do Brasil. Estas abelhas foram introduzidas em território nacional, juntamente com as *A. m. mellifera* (FRANCOY, 2007).

Em 1955, a necessidade de aumentar a produtividade de mel nacional chamou a atenção de pesquisadores e autoridades (KERR, 1967). Diante disto, o pesquisador Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, em 1956, trouxe para o Brasil as primeiras abelhas *A. m. scutellata* provenientes do continente africano, para a realização de estudos genéticos (GONÇALVES, 1996). As colônias foram alojadas em floresta de eucalipto, no Horto de Camaquã em Rio Claro – SP, onde cada caixa teve sua entrada protegida por tela excludora de rainhas, para evitar que rainhas e zangões saíssem para o ambiente (KERR, 1957).

Entretanto, mesmo com os devidos cuidados, 26 colônias de *A. m. scutellata* enxamearam, estabelecendo-se como colônias selvagens (KERR, 1967). Após este acontecimento iniciou-se a rápida expansão das abelhas africanas por todo o Brasil realizando cruzamentos com as subespécies aqui existentes (*A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*). Estes cruzamentos deram origem a um poli-híbrido denominado de abelha africanizada, com características morfológicas predominantes da *A. m. scutellata* (PEREIRA; LOPES, 2011), possuindo desta maneira alta ancestralidade das linhagens A, na América do Sul (70-90%) e nos Estados Unidos (50-75%) (WHITFIELD et al., 2006; WALLBERG et al., 2014).

Devido à alta adaptação ao meio este poli-híbrido colonizou rapidamente a América do Sul e posteriormente a América do Norte. As abelhas africanizadas inicialmente colonizaram a América do Sul a uma velocidade de 300-500 km por ano (TAYLOR, 1977), chegando ao norte da Argentina na década de 70 (KERR et al., 1982). O primeiro relato da aparição de abelhas africanizadas nos Estados Unidos foi no Texas no começo da década de 90, Arizona (1993), Califórnia (1994), Novo México (1994), Nevada (1998), Utah (1999), Oklahoma (2004), Arkansas (2005), Flórida (2005) e Lousiana (2005) (LIVANIS; MOSS, 2010).

Atualmente, as abelhas africanizadas podem ser encontradas desde o norte da Argentina ao sul dos Estados Unidos, sendo apenas barrada pela altitude da Cordilheira dos Andes na América do Sul e pelas baixas temperaturas presentes no norte dos Estados Unidos e sul da Argentina.

Na década de 60, com a expansão das abelhas africanizadas e seu elevado instinto defensivo, muitos apicultores comerciais desistiram da atividade ou reduziram seus apiários. Tal fato devido não conhecerem técnicas de manejo para essas “novas” abelhas (GONÇALVES; STORT, 1994).

A variabilidade genética dessas abelhas é grande, havendo predominância das características das abelhas europeias no sul do país, enquanto ao norte predominam as características das abelhas africanas. A abelha africanizada possui comportamento bem parecido com o da *A. m. scutellata*, em razão da maior adaptabilidade dessa subespécie às condições climáticas brasileiras. Bastante defensivas, porém em menor grau em relação às africanas, as abelhas africanizadas têm facilidade de enxamear, alta produtividade e tolerância a algumas doenças (PEREIRA et al., 2003).

Passada esta fase de declínio na apicultura brasileira, a partir da década de 70 do século XX tem se desenvolvido em virtude de estudos em melhoramento genético e aumento de produção (GONÇALVES, 1996; MILFONT et al., 2009; SOUZA et al., 2012; UCHÔA, 2012).

2. BIOLOGIA DAS ABELHAS *Apis mellifera*

As abelhas do gênero *Apis* vivem em colônias em torno de 50 a 80 mil indivíduos (em média), são insetos eusociais especializados e apresentam complexo padrão de organização, principalmente no interior do ninho. Esta organização social tem grande componente genético e é altamente adaptada ao ambiente externo (AMDAM, 2010).

Vivem em colônias organizadas e divididas em três castas: rainha, operárias e zangões, nas quais os indivíduos assumem funções bem definidas que são executadas visando sobrevivência e a manutenção da colônia. As funções da rainha de abelhas *A. mellifera* são: postura de ovos, manutenção da homeostase social na colônia. Dependendo da idade, as operárias apresentam funções definidas como, por exemplo, coleta de alimento para a manutenção da colônia, limpeza e produção de geleia real e defesa da colônia. Os zangões possuem a única função reprodutiva nas colônias de abelhas *Apis* (COUTO; COUTO, 2002).

As abelhas *A. mellifera* se utilizam de mecanismos comportamentais e feromônios para a manutenção da homeostase do enxame (LIPINSK, 2001). Todas as informações químicas, táteis, auditivas e visuais necessárias para a homeostase social de abelhas do gênero *Apis* são transmitidas entre os seus integrantes. As abelhas deste gênero reconhecem odores que lhes trazem informações a serem transmitidas

para outros indivíduos, visando à antecipação de determinado comportamento. Alguns destes odores são feromônios, os quais são produtos químicos segregados e, posteriormente, liberados para todos os membros da colônia, afetando o seu comportamento e sua fisiologia (ROCHA, 2008).

A enxameação é o processo que ocorre a partir de diversos mecanismos comportamentais e de feromônios, tais como: informações táteis, auditivas, visuais e químicas. A enxameação reprodutiva é o processo normal necessário para a sobrevivência das espécies (ROOT et al., 1990).

Na apicultura racional, os apicultores buscam diminuir a taxa de enxameação de suas colônias, pois a redução dos enxames de abelhas significa perdas em termos de produção de mel e polinização. Além da enxameação reprodutiva existem outros tipos, como a migratória e por abandono, que ocorrem com maior frequência nas abelhas africanas e africanizadas (WIESE, 2000).

As abelhas *Apis mellifera* Africanizadas podem ser caracterizadas pela alta taxa de reprodução e crescimento da colônia devido às operárias coletarem mais pólen do que néctar (DANKA et al., 1987; WINSTON, 1992; FEWELL; BERTRAM, 2002) e por alocam mais nutrientes nas áreas de cria (SPIVAK et al. 1991). Apresentam alto comportamento enxameatório (OTIS, 1991), higiênico (VANDAME et al., 2002) e de *grooming*, que consiste na capacidade da abelha de se livrar de parasitas do próprio corpo (*auto-grooming*) ou de outra abelha (*allo-grooming*) (GUZMÁN-NOVOA et al., 2012), induzindo a baixa infestação pelo ácaro *Varroa destructor* (MEDINA-FLORES et al., 2014). Possuem alta capacidade de adaptação a ambientes inóspitos e sua reprodução é caracterizada por ter ciclo de vida mais curto que as demais subespécies europeias (GONÇALVES, 1994).

Para a identificação das abelhas africanizadas, medidas morfométricas, embasadas no padrão de venação das asas, foram desenvolvidas e tomadas como padrão (FRANCOY et al., 2006, 2008, 2009).

Quanto à produtividade de mel, diversas pesquisas se contrariam. Rinderer et al. (1984, 1985, 1986); Pesante et al. (1992); Guzmán-Novoa e Uribe-Rubio (2004), verificaram baixa produção de mel em experimento em campo comparando abelhas africanizadas com linhagens europeias; porém, Spivak et al. (1989), Pereira e Chaud-Netto (2005), Zárate et al. (2008), Livanis e Moss (2010) demonstram o contrário.

3. MEL: ORIGEM E MANEJO

Dos produtos fornecidos pelas abelhas, o mel é sem dúvida o mais conhecido e difundido. Praticamente, todas as civilizações antigas o utilizaram como alimento e

recurso medicinal. O mel é utilizado desde a antiguidade, pois registros relatam que a apicultura e seus produtos apícolas já eram utilizados pelos egípcios há cerca de cinco mil anos (JATI, 2007).

Atualmente, o homem utiliza o mel como alimento, sem desconhecer suas qualidades medicinais e seu valor nutricional. É um alimento de elevado valor energético, consumido mundialmente e importante para a saúde do organismo humano por apresentar diversas propriedades, como antimicrobiana, regenerativo celular, estimulante, de ação no sistema imunológico, anti-inflamatório, analgésico, expectorante e hipersensibilizante (AZEREDO et al., 1999; WIESE, 2000; KOMATSU et al., 2002; BIZARRIA; FILGUEIRAS 2003; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2009; ANDRADE et al., 2012).

Segundo a Instrução Normativa N° 11 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2000), o mel é composto por solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém ainda mistura complexa de outros hidratos de carbono, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, minerais, pigmentos, substâncias aromáticas e grãos de pólen podendo conter cera de abelhas resultante do processo de extração (BRASIL, 2000).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2000), o mel é definido como: “[...] o produto alimentício produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores e de secreções procedentes de partes vivas de certas plantas ou de secreções de insetos sugadores de plantas que vivem sobre algumas espécies vegetais e que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia”.

Em quase todos os tipos de mel a frutose predomina, sendo a glicose o segundo açúcar principal. Esses dois açúcares constituem 85-95% dos carboidratos do mel. Açúcares mais complexos, compostos de duas ou mais moléculas de glicose e frutose, constituem os carboidratos restantes, com exceção de um traço de polissacarídeos. O mel também contém substâncias voláteis responsáveis pelas características de odor e sabor (FINOLA et al., 2007).

Sua produção é a partir do néctar das flores, açúcares dissolvidos secretados pelos nectários e colhidos pelas abelhas. Para sua elaboração o néctar sofre duas reações: uma física pela desidratação (eliminação da água), por meio da evaporação na colmeia e absorção no papo (vesícula melífera); e outra química, que ocorre quando o néctar recebe adição de várias enzimas das abelhas melíferas, como a invertase, amilase e glicose-oxidase, havendo a inversão do açúcar composto em açúcares simples (CRANE, 1987).

A maturação do mel tem início no organismo da abelha, continua durante sua deposição nos alvéolos e se finaliza com a operculação dos favos, tão logo a sua umidade seja reduzida aos 18% a 20%, o que permite sua conservação por longo tempo (SORIA, 2000).

A composição exata de qualquer mel depende principalmente das fontes vegetais das quais ele é derivado, mas também do tempo, solo e outros fatores (CRANE, 1987; MENDONÇA, 2008). Segundo Montenegro et al. (2000) e Lengler (2002), o mel varia muito de uma região para outra, tanto em conteúdo polínico como em características físico-químicas, sendo explicada pela possibilidade de ter origem em mais de 2500 tipos de flores de plantas diferentes.

Com o início da florada aumenta-se a disponibilidade de alimento, néctar e pólen, fazendo com que as abelhas incrementem suas atividades na colônia. Durante este período, o enxame expande sua população e após o seu desenvolvimento ocorre a divisão natural, conhecida como enxameação. Neste processo ocorre a formação de nova rainha e a metade das abelhas da colônia sai com a rainha pré existente à procura de um local adequado de nidificação para estabelecer a sua nova moradia. Quando o fluxo de alimento diminui, ocorre a redução de postura da rainha, e como um instinto de sobrevivência, em casos extremos, os enxames abandonam a colmeia e procuram novos locais com melhores condições para a sobrevivência (COUTO; COUTO, 2002).

O apicultor pode fazer o manejo de divisão de suas colmeias, com o intuito de preservar e multiplicar enxames com boas características genéticas para assegurar que o potencial produtivo de colônias superiores seja aproveitado, criando novas colônias com características semelhantes (BROWN, 2010)

Entretanto, a atividade apícola tradicional baseia-se na captura de enxames migratórios (LEOPOLDINO, 2002). Esta prática é comumente utilizada para repor ou aumentar o número de colônias dos apicultores brasileiros; porém, estes enxames capturados podem apresentar características genéticas desfavoráveis para a produção de mel afetando, significativamente, a produtividade das colônias (DUAY, 1996).

Segundo Souza (2002), estas grandes diferenças entre as colmeias reduzem a produtividade de mel e oneram os custos de produção, diminuindo a eficiência e competitividade do setor. Assim, montados os apiários com os enxames capturados ou divididos artificialmente, é importante estabelecer um trabalho de melhoramento genético para aumentar a produção de mel e também de outros produtos apícolas.

Os programas de melhoramento genético envolvem um conjunto de processos que visam aumentar a frequência de genes desejáveis ou combinações genéticas que resultem em uma população com as características desejadas, que podem ser

morfológicas, fisiológicas ou comportamentais (KERR, 2006). Pesquisas em seleção genética permitem manter as linhagens com as características desejadas, o que justifica o emprego desta tecnologia aos programas comerciais de criação de abelhas (COBEY; SCHLEY, 2002). Os principais fatores a serem considerados na seleção de colônias segundo Souza et al. (2012), consistem na alta produtividade, baixa defensividade, baixo potencial enxameatório e alto comportamento higiênico (defesa natural das colônias contra pragas e doenças).

4. COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM ABELHAS *Apis mellifera*

O comportamento higiênico é definido como a capacidade das abelhas detectarem e removerem crias mortas ou doentes do interior da colmeia (ROTHENBUHLER, 1964; GONÇALVES, 1999; OXELY et al., 2010), apesar de ser também definido, segundo Message (1977), como a remoção de qualquer material estranho no interior da colmeia. Existe, ainda, a ampliação do conceito “higiênico” nas abelhas, como foi descrito por Moretto (1993), que consiste na capacidade das mesmas em se livrarem do ácaro *Varroa destructor*, que atualmente é uma das pragas que mais causam problemas à apicultura comercial em grande parte do mundo, embora no Brasil as abelhas africanizadas tenham se mostrado tolerantes a este parasita (DE JONG; GONÇALVES, 1998). Nas abelhas do gênero *Apis*, este comportamento tem se tornado cada vez mais importante, uma vez que, conforme já exposto, funciona como eficiente mecanismo comportamental de resistência à doenças (GILLIAM et al., 1983; RATH; DRESCHER, 1990; PALACIO et al., 2000; SPIVAK; REUTER, 2001).

A primeira observação sobre o comportamento higiênico em *A. mellifera* foi registrada na década de 1930 quando se tentava determinar a existência de resistência por parte das abelhas da colônia à Cria Pútrida Americana (AFB), doença causada pela bactéria *Paenibacillus larvae* (PARK et al., 1937). Foi observado certo grau de resistência à doença e que esta era herdável, constituída de resistência fisiológica e com componente comportamental.

Posteriormente, Woodrow e States (1943) também verificaram esta resistência, e concluíram que a mesma era comportamental, na qual constataram que as abelhas operárias tinham a habilidade de descobrir e remover crias acometidas pelo *P. larvae* antes de ocorrer a esporulação.

Tarr et al. (1937) demonstraram que o estado vegetativo do patógeno não era infeccioso e, conseqüentemente, quando as abelhas removiam precocemente as larvas doentes, mas ainda sem esporos e antes de assumir a consistência

filamentosa, elas não se contaminavam e, portanto, não transmitiam a doença para as crias saudáveis. Desse modo, este comportamento passou então a ser visto como uma das melhores alternativas no controle desta e de outras doenças de cria (BIGIO et al., 2013).

Posteriormente, várias pesquisas foram realizadas e muitos autores comprovaram que o comportamento higiênico constitui uma fonte de resistência natural a microorganismos, tais como: *Paenibacillus larvae*, agente da Cria Pútrida Americana (SPIVAK; REUTER, 2001), *Ascosphaera apis*, agente da cria giz (INVERNIZZI, 2001) e *Varroa destructor* (SPIVAK; REUTER, 1998).

Essa característica comportamental das abelhas tem sido cada vez mais utilizada como ferramenta fundamental para o melhoramento genético da colmeia. Segundo Gramacho (1999), o comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* é controlado por três pares de genes recessivos, sendo dois responsáveis pela desoperculação das crias acometidas e um pela remoção das crias infectadas. Esses resultados ressaltam a importância do teste de comportamento higiênico como uma das principais características a ser utilizada nos programas de melhoramento genético de abelhas.

A expressão fenotípica do comportamento higiênico é influenciada por diversos fatores externos ambientais (temperatura e umidade, condições dos favos, fluxo de néctar); químicos (feromônios das próprias crias, odores dos ácaros dentro das crias, substâncias químicas voláteis emanadas das crias putrefatas ou outros emanados pelos ácaros presentes nas células de crias); físicos (vibrações das pupas doentes dentro das células ou ausência de movimentos, diferenças de temperatura entre crias mortas e vivas) e biológicos (idade, sexo e tamanho das crias submetidas ao comportamento higiênico das operárias) (MOMOT; ROTHENBULER, 1971; MESSAGE, 1979; MESSAGE; GONÇALVES, 1980; PÉREZ-SATO et al., 2009), o que pode influenciar diretamente os métodos de estudo deste comportamento.

Até o momento já foram identificados seis QTL (Quantitative Trait Locus) relacionados ao comportamento higiênico em abelhas europeias, sendo que: três influenciam operárias no comportamento higiênico e são responsáveis por até 30% da variabilidade fenotípica para comportamento higiênico; dois que influenciam o comportamento de desoperculação de crias infectadas; um que influencia a remoção de crias infectadas. Neste mesmo estudo foram reportados genes candidatos para comportamento higiênico, incluindo quatro genes envolvidos no sistema olfativo, aprendizado e comportamento social e um gene envolvido na locomoção circadiana (OXLEY et al., 2010).

Desta forma, o comportamento higiênico em abelhas *A. mellifera* é um importante mecanismo de defesa contra doenças e pode ser utilizado em programas de melhoramento genético conciliando a alta produtividade dos enxames com alto comportamento higiênico.

5. COMPORTAMENTO DEFENSIVO EM ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

Com o objetivo de ressaltar o comportamento defensivo da *A. mellifera* poli-híbrida, os norte americanos criaram o termo pejorativo “*killer bee*” (abelhas assassinas), não errôneo, pois mais de 1000 pessoas e milhares de animais domésticos morreram atacados por abelhas africanizadas durante o processo de colonização das Américas por este poli-híbrido (BREED et al., 2004). Surgiu-se, então, o termo “Africanizada”, que se refere a abelhas poli-híbridas originadas no Brasil pelo cruzamento de espécies *A. mellifera* e *A. mellifera scutellata* (GONÇALVES, 2006). Em todo o Brasil, a apicultura tem sido desenvolvida com abelhas africanizadas, que apresentaram melhor adaptação às condições climáticas do país e que apesar de serem mais defensivas que as subespécies europeias, respondem a manejos adequados para produção apícola (VILELA, 2000).

O comportamento defensivo executado pelas abelhas do gênero *Apis* representa a defesa da colônia contra potenciais saqueadores, uma vez que seus ninhos contêm estoques de mel e pólen, além da abundância de cria que atrai diversos predadores (WINSTON, 1992).

A Figura 1 mostra a organização do comportamento defensivo em abelhas europeias, similar ao comportamento defensivo praticado pelas abelhas africanizadas. Abelhas guardiãs, que vigiam a entrada da colônia (ARECHVALETA-VELASCO; HUNT, 2003) e as abelhas guardiãs (BREED et al., 1990), participam de ataques em massa a vertebrados e seguem uma sequência básica descritas na figura.

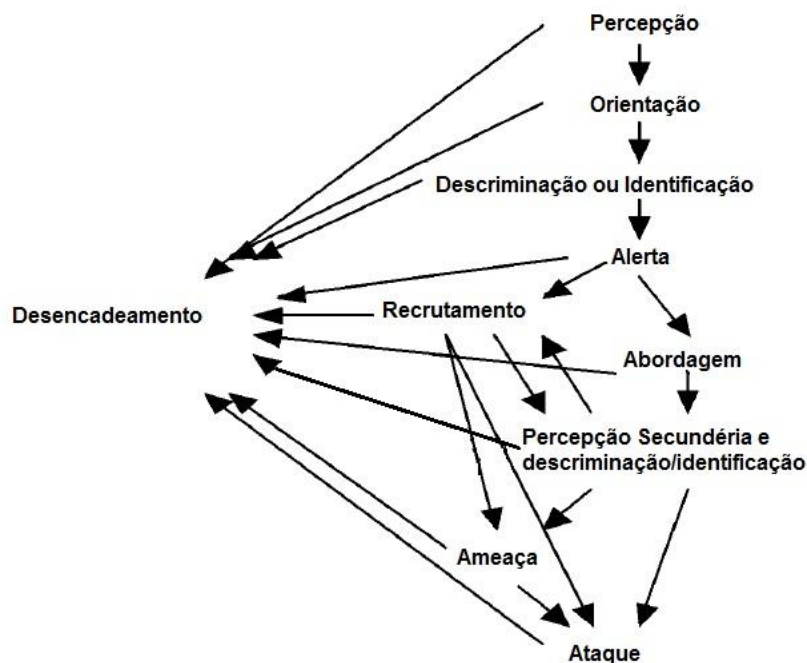


Figura 1. Sequência de eventos em abelhas para desencadeamento do comportamento defensivo (BREED et al., 2004).

As abelhas africanizadas destacam-se por serem mais excitáveis e mais defensivas do que as europeias, respondendo rapidamente aos estímulos (STORT et al., 1982). Estas abelhas tem sido estudadas sob os mais diversos aspectos, com ênfase na análise de seu comportamento defensivo, pois este aspecto era considerado negativo após seu aparecimento no Brasil. Foi demonstrado que geneticamente o comportamento defensivo das abelhas africanizadas é controlado por pelo menos oito pares de genes (STORT, 1971).

A manifestação fenotípica de alta defensividade esta relacionada com a defesa individual ou da colônia, a qual é estimulada por fatores físicos, químicos ou biológicos. Desta forma, esta manifestação esta relacionada com variantes como o meio ambiente, disponibilidade de alimento, entre outros, que não permitem mostrar o comportamento defensivo como variável única (SALAMANCA et al, 2001; NASCIMENTO et al., 2005).

Foi verificado também que as abelhas africanizadas produzem até cinco vezes maior quantidade de feromônio 2-heptanona (secretado pelas glândulas mandibulares) do que as abelhas de subespécies europeias, e que a maior produção deste feromônio é responsável pela maior intensidade de ataque aos inimigos (KERR et al., 1974).

A influência do meio ambiente também foi demonstrada. As abelhas africanizadas se tornavam mais defensivas em ambientes com maior umidade relativa do ar e com menor variabilidade de temperatura durante o dia (BRANDEBURGO;

GONÇALVES, 1990). Desta forma, os fatores meteorológicos possuem influência no comportamento defensivo nas colônias segundo trabalho realizado por Funari et al. (1998).

A determinação do comportamento defensivo pode ser feita de diversas maneiras. Uma delas, consiste em balançar durante 60 segundos uma bola de camurça preta (cheia de algodão com 3 cm de diâmetro) na frente da entrada da colônia e registrar as informações referentes as variáveis: 1- Tempo necessário para ocorrer a primeira ferroada na bola; 2- Número de ferrões deixados na bola de camurça (STORT, 1974).

Com relação ao comportamento defensivo, Funari et al. (1998) estudaram as abelhas africanizadas e suas híbridas e observaram que as abelhas híbridas italiana x africanizada foram menos defensivas que as africanizadas; as híbridas cárnica x africanizada ocuparam posição intermediária, e relataram, ainda, que os fatores meteorológicos (precipitação pluviométrica, umidade do ar e temperatura média) tiveram influência no comportamento defensivo dos grupos estudados.

Grande parte do fenótipo para defensividade é atribuído a fatores genéticos, possuindo alta herdabilidade para defensividade (COLLINS; RINDERER, 1991; STORT, 1991).

Estudos genéticos iniciais do comportamento defensivo de *Apis* mostraram que abelhas guardiãs não são influenciadas aleatoriamente para o ataque a intrusos, mas sim este comportamento é herdado das subfamílias de abelhas *Apis*, indicando efeitos genéticos no comportamento de abelhas guardiãs. Diversos testes a campo feitos com cruzamento de linhagens de abelhas com baixo e alto comportamento defensivo foram conduzidos para tentar identificar dominância do alto comportamento defensivo em F1, porém apresentaram resultados diferentes, algumas vezes mostrando-se ser aditivo e algumas vezes dominante (ALLAN et al., 1987; COLLINS; RINDERER, 1991; STORT; GONÇALVES, 1991).

Outro fato descrito por Guzmán-Novoa et al. (2003) é que colônias com alto nível de defensividade quando estimuladas, estimulam colônias com baixa defensividade para atacarem intrusos, uma vez que estejam próximas.

Abelhas europeias e africanizadas podem ser diferenciadas por meio de morfometria multivariada (RUTTNER, 1988), baseada em tamanho de asa, sendo um método fenotípico, porém não relacionado geneticamente com comportamento defensivo (COLLINS et al., 1994; GUZMÁN-NOVOA et al., 2002; HUNT et al., 1998; QUEZADA-EUAN et al., 1999). No entanto, a seleção de abelhas por tamanho corporal seleciona indiretamente para defensividade. Uma vez que abelhas com

alelos africanos possuem tamanho corporal reduzido. Assim, quanto menor tamanho corporal maior a defensividade (GUZMÁN-NOVOA; PAGE, 1999).

O advento de técnicas moleculares como desenvolvimento da técnica de PCR (Reação em cadeia polimerase) e a descoberta marcadores moleculares em DNA genômico, proporcionaram a criação de mapas genéticos no genoma de *Apis mellifera* (HUNT; PAGE, 1995), mapeando genes que influenciam o comportamento defensivo, explicando o comportamento defensivo não só fenotipicamente mas sim genotipicamente. Cinco loci para característica quantitativa (QTL) que estão envolvidos no comportamento defensivo foram mapeados por microssatélites até o presente momento (HUNT et al., 1998), regiões as quais possuem inúmeros genes que podem estar envolvido nesta característica.

Para isso, zangões proveniente de rainhas F1 (africanizadas/europeias) foram utilizados para coleta de sêmen, que foi utilizado na inseminação artificial de uma “super irmã” da colônia europeia. Em *Hymenoptera*, que existe o sexo determinado pelo mecanismo de haploidia, “super irmãs” tem a mesma mãe e pai, partilhando 75% dos alelos por descendência direta.

Neste método de acasalamento, a grande maioria da variação genética entre colônias deriva do genótipo do zangão que é segregado de alelos africanizados derivados de alelos europeus. O mapa genético resultante foi baseado na segregação de alelos nos zangões das colônias experimentais, e o número de ferrões obtidos em experimento por colônia foi relacionado à herança de alelos provenientes dos zangões africanizados de rainhas F1.

Apenas um dos cinco QTL (*sting-1*) foi significativa. Em geral, alelos africanizados nos QTL são associados ao comportamento defensivo. Embora a maioria dos QTL atuem independentes, *sting-4* e *sting-1* comporta-se como epistáticos, possuindo genes que atuam em conjunto para defensividade (HUNT et al., 1998).

Um alto efeito do genótipo da colônia paternal no QTL *sting-1* no número de ferrões ocorre apenas quando o zangão pai tiver o alelo africanizado no QTL *sting-4*.

Identificar QTL abre a possibilidade de determinar como genes específicos influenciam o comportamento individual. Em experimentos com dois cruzamentos marcadores em genes próximos a *sting-1* foram associados com a tarefa de guardiã ou ao tempo de primeira ferroadada, isso confirma o efeito do *sting-1* no comportamento defensivo (GUZMÁN-NOVOA et al., 2002). Estudos similares com abelhas europeias com alta defensividade confirmaram alelos em genes próximos aos QTL *sting-1*, *sting-2* e *sting-3*, sugerindo que o mesmo gene influência o comportamento defensivo de abelhas europeias (Arechavaleta-Velasco et al., 2003).

6. TÉCNICAS PARA ESTUDO DE POPULAÇÕES DE *Apis mellifera*

O estudo de populações é importante para estabelecer relações filogenéticas e entender alguns processos relacionados à sobrevivência e adaptação das espécies a diferentes ambientes. No caso das abelhas *A. mellifera* africanizadas, o estudo da sua estrutura populacional pode ser importante para melhor entender sua dinâmica populacional, servindo como base para estudos de melhoramento genético e melhor exploração de características desejáveis.

Pesquisas em seleção permitem manter as linhagens com as características desejadas, o que justifica que essa tecnologia deva ser incorporada aos programas comerciais de criação de abelhas (COBEY; SCHLEY, 2002).

Uma das formas de se realizar este estudo é por meio da genômica. Genômica é a área da ciência que se dedica ao sequenciamento dos nucleotídeos, mapeamento e análise de genomas, os quais são constituídos por todo o DNA (Ácido Desoxirribonucleico) existente nas células de um indivíduo, inclusive os seus genes.

O sequenciamento do genoma de *A. mellifera* em 2006 (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) é considerado um marco no campo da sociogenômica, e vem sendo utilizado amplamente em estudos com *A. mellifera* manejadas pelo homem (OLDROYD, 2012; HARPUR et al., 2012; HARPUR et al., 2014). O primeiro sequenciamento total do genoma de *Apis mellifera* foi proveniente de uma linhagem norte americana (WHITFIELD et al., 2006) e, em termos moleculares, é rico em bases adenina e timina, como também observado em outros insetos. Até hoje, apenas *A. cerana* e a *Apis mellifera intermissa*, tiveram o genoma inteiro sequenciado (PARK et al., 2015, HADDAD et al., 2015), caracterizando diferenças alélicas encontradas nesta subespécie sendo um dos principais pontos de estudos em genômica de insetos atualmente (ZAYED; WHITFIELD, 2008).

Estudos com o genoma total podem ser conduzidos para identificação de QTLs por meio de associação por alelos e isso requer a identificação de alta densidade de marcadores moleculares (JORDE, 1995; LANDER; SCHORK, 1994), podendo ser desenvolvido através da identificação de SNPs.

O Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) acredita-se ser a forma mais frequente de variabilidade genética dos seres vivos incluindo-se as abelhas, e compreender os SNPs pode ajudar o estudo de genética populacional e, conseqüentemente, auxiliar em programas de melhoramento genético em *A. mellifera* (QIN et al., 2006).

Um SNP é um polimorfismo em único nucleotídeo na sequência do DNA genômico; por exemplo, quando um T se torna um G. SNPs podem ocorrer dentro de

genes e também entre eles. Alguns SNPs estão associados com doenças, produção, comportamento e populações (CLARK, 2010).

Com o advento de técnicas de sequenciamento total de baixo custo, sequenciamento de próxima geração (METZKER, 2010), diversos estudos com sequenciamento de genoma total vem sendo desenvolvidos em diversas espécies, com os mais variados objetivos (BEGUM et al., 2015; CASAS et al., 2015; MICHAILIDOU et al., 2015; ZANKE et al., 2015).

Pesquisas realizadas empregando alta quantidade de amostras procuraram desenvolver técnicas de preparação para sequenciamento para redução de custos e que obtivessem a mesma representatividade do sequenciamento total de um genoma. Desta maneira desenvolveram a técnica de RADseq desenvolvida por Baird et al. (2008) que simplifica e melhora a análise genética no sequenciador Illumina Genome Analyzer. O DNA genômico é digerido por uma enzima de restrição, e um adaptador (P1) é ligado a extremidade coesiva gerada. Este adaptador é o primer forward Illumina e também possui de quatro a cinco pares de base para identificação da amostra (barcode). O DNA então é aleatoriamente fragmentado com o uso de um sonicador e ligado a um novo adaptador (P2). Este segundo adaptador constitui o primer reverse Illumina; porém, este possui uma estrutura final com *mismatch*, gerando uma estrutura em Y, o que garante a amplificação por PCR somente se P1 também estiver ligado ao fragmento. O pool de fragmentos é enriquecido por PCR e carregado no sequenciador.

O *ddRADseq* técnica derivada do RADseq foi desenvolvida por Peterson (2012), chamada *double digest* RADseq (*ddRADseq*). A principal diferença é justamente a dupla digestão por enzimas de restrição, uma com corte frequente e outra rara. O passo mais importante é a escolha das enzimas utilizadas para digerir o genoma, pois isso determinará o tamanho dos fragmentos, a porcentagem do genoma a ser estudado e, conseqüentemente, o número de marcadores identificados. Em um exemplo no trabalho de Peterson (2012), o teste *in silico* com o genoma de *Anopheles gambiae* digerido com a combinação de *EcoRI-MspI*, gerou 4000 fragmentos com aproximadamente 200 pb, como o tamanho do genoma dessa espécie é de 270 Mb, 0,36% do genoma é coberto. A ligação com adaptadores P1 e P2 permanece similares a técnica de RADseq convencional.

Uma vez seqüenciadas as amostras de diferentes populações de abelhas *Apis mellifera*, os fragmentos sequenciados devem ser alinhados em relação ao genoma de *Apis mellifera* padrão versão *Amel_4.5_scaffolds.fa* (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) e diversas análises de bioinformática devem

ser feitas para a seleção de SNPs ligados a característica desejada (HARPUR et al. 2014), produzindo painéis de SNPs para genotipagem de colônias.

Após a seleção dos polimorfismos ligados a característica desejada, é necessária a padronização de técnicas moleculares e desenvolvimento de um protocolo de técnicas para a genotipagem de colônias em larga escala, tanto em laboratório quanto a campo, para que possa ser difundido em programas de melhoramento genético em apicultores comerciais.

Das técnicas laboratoriais hoje utilizadas para a genotipagem o Taqman® (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) é o mais difundido, sendo de baixo custo, rápido e preciso, ele é composto por sondas de hidrólise duplamente marcadas, contendo um fluoróforo "repórter", FAM ou VIC, covalentemente ligado à extremidade 5'; e um fluoróforo "quencher", TAMRA, covalentemente ligado à extremidade 3'.

Atualmente, as sondas TaqMan® são marcadas com moléculas "quencher" não fluorescentes, como "Minor Groove Binder" (MGBTM). Sondas TaqMan® MGBTM são oligonucleotídeos curtos caracterizados pela marcação com moléculas ligantes da fenda menor do DNA na extremidade 3' ou, menos freqüentemente, na extremidade 5' (KUTYAVIN et al., 2000). Essa modificação química aumenta a temperatura de *melting* da sonda hibridizada e sua afinidade pelo DNA, facilitando a ligação específica à sequência-alvo através da fenda menor da hélice do DNA (KUBISTA et al., 2006). Além disso, essas sondas contêm um "quencher" que não emite fluorescência, liberando um dos canais de fluorescência do equipamento.

Esta modificação fez com que se elimine eventuais sobreposições espectrais coma fluorescência do "reporter", o que leva à maior acurácia na captação do sinal específico do "reporter" e permite trabalhar com mais fluorescentes simultaneamente (WATZINGER et al. 2006).

O genótipo dos zangões não é complexo quanto de abelhas rainhas e operárias, sendo os seus genes haplóides em qualquer parte de seu genoma. Este fato os torna ferramenta de grande potencial para seleções e programa de melhoramento genético, pois refletem diretamente todo o potencial da rainha a ser estudada (JAVIER et al., 1991).

Na colônia de abelhas *Apis mellifera* L., os zangões estão presentes principalmente durante a época de acasalamento, tendo sua função limitada ao acasalamento com a rainha virgem (KLENK et al., 2004). Zangões são haplóides, oriundos de partenogênese de ovos não fertilizados postos pela rainha herdando apenas um conjunto de cromossomos (BEYE et al., 2003).

Deste modo, o estudo de polimorfismos no genoma de abelhas *Apis mellifera* africanizadas possibilitará uma vasta compreensão de diversas características deste

híbrido, podendo ser utilizada em programas de melhoramento genético na seleção de regiões polimórficas associadas à produtividade de mel trazendo benefícios para o aumento da produção apícola nacional e internacional e compreensão de comportamentos característicos das abelhas africanizadas.

7. REFERÊNCIAS

- ALLAN, S. A.; SLESSOR, K. N.; WINSTON, M. L.; KING, G. G. S. The influence of age and task specialization on the production and perception of honey bee pheromones. **Journal of Insect Physiology**, Amsterdam, v. 33, p. 917– 922, 1987.
- AMDAM, G.V. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. **Animal Behavior**, v. 79, p.973–980, 2010.
- ANDRADE, S. E. O.; MARACAÇA, P. B.; SILVA, R. A.; FREIRES, G. F.; PEREIRA, A. M.; FERNANDES, A. A. Estudo sobre o uso de abelha associado com plantas na comunidade Várzea Comprida dos Oliveiras, Pombal, Paraíba, Brasil. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Campina Grande, v. 8, n.3, 2012.
- ARECHAVALETA-VELASCO, M. E.; HUNT, G. J.; EMORE, C. Quantitative trait loci that influence the expression of guarding and stinging behaviors of individual honey bees. **Behavior Genetics**, Berlin, v. 33, n. 3, p. 357-364, 2003.
- ARECHAVALETA-VELASCO, M. E; HUNT, G. J. Genotypic variation in the expression of guarding behavior and the role of guards in the defensive response of honey bee colonies. **Apidologie**, Paris, v. 34, n. 5, p. 439-448, 2003.
- AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. C.; DAMASCENO, J. G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 3-7, 1999.
- BAIRD, N.; ETTER, P.; ATWOOD, T. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, p. 3376, 2008.
- BEGUM, H.; SPINDEL, J. E.; LALUSIN, A.; BORROMEO, T.; GREGORIO, G.; HERNANDEZ, J.; MCCOUCH, S. R. Genome-Wide Association Mapping for Yield and Other Agronomic Traits in an Elite Breeding Population of Tropical Rice (*Oryza sativa*). **PLoS One**, San Francisco, v.10, p. 3, 2015.
- BEYE, M., HASSELMANN, M., FONDRK, M.K., PAGE, R.E., OMHOLT, S.W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. **Cell**, v. 114, p. 419–429, 2003.
- BIGIO, G.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F. L. W. Hygienic Behavior in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae): Effects of Brood, Food, and Time of the Year. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n.6, p. 2280-2285, 2013.
- BIZARRIA, D. K.; FILGUEIRAS, C. T. Análise microbiológica de mel de abelhas, consumido no Município de Campo Grande – MS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 104-105, 2003.
- BRANDEBURGO, M. A. M.; GONÇALVES, L. S. Environmental influence on the aggressive (defense) behaviour and colony development of africanized bees (*Apis mellifera*). **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 42, n. 10, p. 759-771, 1990.
- BRASIL. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Instrução Normativa nº11, de 20 de Outubro de 2000, **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Brasília, 1997. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 out. 2000. Seção I, p. 16 A.

- BREED, M. D.; DIAZ, P. H.; LUCERO, K. D. Olfactory information processing in honeybee, *Apis mellifera*, nestmate recognition. **Animal Behaviour**, Hamilton, v. 68, n. 4, 921-928, 2004.
- BREED, M. D.; GUZMAN-NOVOA, E.; HUNT, G. J. Defensive behavior of honey bees: organization, genetics and comparisons with other bees. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 271–298, 2004.
- BREED, M. D.; ROBINSON, G. E.; PAGE, R. E. Division of labor during honey bee colony defense. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Berlin, v. 27, p. 395–401, 1990.
- BROWN, R. **Beekeeping: a seasonal guide**. London, UK, B. T. Batsford Ltd., 2010.
- CASAS, E.; HESSMAN, B. E.; KEELE, J. W.; RIDPATH, J. F. A genome-wide association study for the incidence of persistent bovine viral diarrhoea virus infection in cattle. **Animal Genetics**, Utrecht, v. 46, n.1, p. 8-15, 2015.
- CLARK, A. G.; HARTI, D. L. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª Ed., 2010.
- COBEY, S.; SCHLEY, P. Innovations in instrumental insemination. The compact, versatile right and left handed Schley model II instrument. **American Bee Journal**, Hamilton, v.142, n.6, p.433-435, 2002.
- COLLINS, A. M.; DALY, H. V.; RINDERER, T. E.; HARBO, J. R.; HOELMER, K. Correlations between morphology and colony defense in *Apis mellifera* L. **Journal of Apicultural Research**, Brighton, v. 33, p. 3–10, 1994.
- COLLINS, A. M.; RINDERER, T. E. **Genetics of defensive behavior I.** "The "African" Honey Bee. Boulder Co: Westview, pp. 309-328, 1991
- COUTO, R. H. N.; COUTO L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: Funep, 2002.
- CRANE, E. **O livro do mel**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1987.
- CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. New York: Routledge, 1999.
- DANKA, R. G.; HELLMICH, R. L. I. I.; RINDERER, T. E.; COLLINS, A. M. Diet-selection ecology of tropically and temperately adapted honey bees. **Animal Behaviour**, Hamilton, v. 35, p. 1858–1863, 1987.
- DE JONG, D.; GONÇALVES, L. S. The africanized bees of Brasil have become tolerant to *Varroa*. **Apiacta**, v. 33, p. 65-70, 1998.
- DUAY, P. Manejo para aumento da produtividade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., , Teresina, PI. **Anais...** Teresina : Confederação Brasileira de Apicultura, v.1, p.121-124, 1996.

- FEWELL, J. H.; BERTRAM, S. M. Evidence for genetic variation in worker task performance by African and European honey bees. **Behavioural Ecology and Sociobiology**, Berlin, v. 52, p. 318–325, 2002.
- FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 4, p. 1649-1653, 2007.
- FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. **Apidologie**, Paris, v. 31, p. 167–180, 2000.
- FRANCOY, T. M. **Variabilidade genético-morfológica em populações Neotropicais de *A. mellifera***. 163f. Tese (Doutorado em genética) – Curso de Pós-graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- FRANCOY, T. M.; PRADO, P. P. R.; GONÇALVES, L. S.; COSTA, L. D.; DE JONG, D. Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. **Apidologie**, Paris, v. 37, p. 91–97, 2006.
- FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; DRAUSCHKE, M.; MÜLLER, S.; STEINHAGE, V.; BEZERRA-LAURE, M. A.; DE JONG, D.; GONÇALVES, L. S. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. **Apidologie**, Paris, v. 39, n. 5, p. 488-494, 2008.
- FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; STEINHAGE, V.; DRAUSCHKE, M.; MÜLLER, S.; CUNHA, D. R.; ARIAS, M. C. Morphometric and genetic changes in a population of *Apis mellifera* after 34 years of Africanization. **Genetic and Molecular Research**, v. 8, n. 2, 709-717, 2009.
- FUNARI, S.R.C. Efeito da fumaça e outras substâncias no comportamento defensivo de abelhas africanizadas e suas híbridas (*Apis mellifera* L.). In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS. Ribeirão Preto. **Anais do III Encontro sobre abelhas de Ribeirão Preto**, v.3, p 248, 1998.
- GILLIAM, M.; TABER, S. III; RICHARDSON, G. V. Hygienic behaviour of honey bees in relation to chalkbrood disease. **Apidologie**, Paris, v.14, p. 29-39, 1983.
- GONÇALVES, L. S. 2006. **Meio século de Apicultura com abelha Africanizada no Brasil**. Available at: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/87/artigo.htm>>. Acessado em : 10.maio.2014.
- GONÇALVES, L. S. Abelhas africanizadas: uma praga ou um benefício para a apicultura brasileira? In: II ENCONTRO SOBRE ABELHAS DE RIBEIRÃO PRETO, Ribeirão Preto. **Anais do II Encontro sobre Abelhas de Ribeirão Preto**: USP, v. 2, p. 165-170, 1996.
- GONÇALVES, L.S.; STORT, A.C. A africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas-II, In B. Barraviera (ed.), **Venenos animais: Uma visão integrada**. Rio de Janeiro, EPUC, p. 387, 1994.

- GRAMACHO, K. P. **Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas *Apis mellifera***. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, 220p, 1999.
- GUZMÁN NOVOA, E.; CORREA BENÍTEZ, A. Patología, diagnóstico y control de las principales enfermedades y plagas de las abejas melíferas. **OIRSA Imagen Editorial Yire, Mexico DF**, 2012.
- GUZMÁN-NOVOA, E.; HUNT, G. J.; PAGE, R. E.; FONDRK, M. K. Genetic correlations among honey bee (Hymenoptera: Apidae) behavioral characteristics and wing length. **Annals of the Entomological Society of America**, Annapolis, v. 95, p. 402–406, 2002.
- GUZMÁN-NOVOA, E.; HUNT, G. J.; URIBE, J. L.; SMITH, C.; ARECHAVALETA-VELASCO, M. E. Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honey bee defensive behavior: results of colony and individual behavioral assays. **Behavior Genetics**, Berlin v. 32, p. 95–102, 2002.
- GUZMÁN-NOVOA, E.; HUNT, G. J.; URIBE-RUBIO, J. L.; PRIETO-MERLOS, D. Genotypic effects of honey bee (*Apis mellifera*) defensive behavior at the individual and colony levels: the relationship of guarding, pursuing and stinging. **Apidologie**, Paris, v. 35, n. 1, p.15-24, 2003.
- GUZMÁN-NOVOA, E.; PAGE, R. E. Selective breeding of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in Africanized areas. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 92, p. 521–525, 1999.
- GUZMÁN-NOVOA, E.; PAGE, R. E.; FONDRK, M. K. Morphometric techniques do not detect intermediate and low levels of Africanization in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. **Annals of the Entomological Society of America**, Annapolis, v. 87, p. 507–515, 1994.
- GUZMÁN-NOVOA, E.; URIBE-RUBIO, J. L. Honey production by European, Africanized and hybrid honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 144, p. 318–320, 2004.
- HADDAD, N. J.; LOUCIF-AYAD, W.; NOUREDDINE, A.; SAINI, D.; MANCHIGANTI, R.; KRISHNAMURTHY, V.; MUGASIMANGALAM, R. Draft genome sequence of the algerian bee *Apis mellifera intermissa*. **Genomics data**, v.4, p. 24-25, 2015.
- HARPUR, B. A.; KENT, C. F.; MOLODTSOVA, D.; LEBON, J. M.; ALQARNI, A. S.; OWAYSS, A. A.; ZAYED, A. Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Boston, v. 111, n.7, p. 2614-2619, 2014.
- HARPUR, B. A.; MINAEI, S.; KENT, C. F.; ZAYED, A. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. **Molecular Ecology**, Malden, v. 21, n. 18, p. 4414-4421, 2012.
- HUNT, G. J.; GUZMÁN-NOVOA, E.; FONDRK, M. K.; PAGE, R. E. Quantitative trait loci for honey bee stinging behavior and body size. **Genetics**, v. 148, p.1203–1213, 1998.
- HUNT, G. J.; PAGE, R. E. J. R. A linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. **Genetics**, v. 139, p. 1371–1382, 1995.

- INVERNIZZI, C. Resistencia a la enfermedad de cria yesificada por colonias de *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higienico (Hymenoptera: Apidae). *Iheringia*, **Sér. Zool.**, Porto Alegre, v.91, p.109-114, 2001.
- JATI, S. R. Qualidade do mel de abelha no estado de Roraima, Brasil. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, Boa Vista, v. 2, n. 1 p. 5-15, 2007.
- JAVIER, P.A.; HAVRON, A.; MORALLO-REJESUS, B.; ROSEN, D. Selection for pesticide resistance in *Aphytis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 61, p. 237–245, 1991.
- JORDE, L.B. Linkage Disequilibrium as a Gene-Mapping Tool. **The America Journal of Human Genetics**, v. 56, p.11-14, 1995.
- KERR, W. E.; AMARAL, E.. Fatores para o aumento da produção de mel no Estado de São Paulo. **O Solo**, Campinas, v. 49, n. 1, p. 61-69, 1957.
- KERR, W.E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **American Bee Journal**., Hamilton, v. 39, p. 3-5, 1967.
- KERR, W. E.; BLUM, M. S.; PISANI, J. F.; STORT A. C. Correlation between amounts of 2-heptanone and isoamyl acetate in honeybees and their aggressive behaviour. **Journal of Apicultural Research**, Brighton v. 13, p. 173-176, 1974.
- KERR, W. E.; DEL RIO, S. D. L.; BARRIONUEVO, M. D. The southern limits of the distribution of the Africanized honeybee in South America [*Apis mellifera adansonii*]. **American Bee Journal**, Hamilton, v.122, p. 196-198, 1982.
- KERR, W. E. Método de seleção para melhoramento genético em abelhas. **Magistra**, Cruz das Almas, v.18, n.4, p.209-212, 2006.
- KLENK, M.; KOENIGER, G.; KOENIGER, N.; FASOLD, H. Proteins in spermathecal gland secretion and spermathecal fluid and the properties of a 29 kDa protein in queens of *Apis mellifera*. **Apidologie**, Paris, v. 35, p. 371–381, 2004.
- KOMATSU, S. S.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e de proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 143-146, 2002.
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Boston, v.27,n.3, p.95-125, 2006.
- KUTYAVIN, I. V.; AFONINA, I. A.; MILLS, A.; GORN, V. V.; LUKHTANOV, E. A.; BELOUSOV, E. S. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.28, n.2, p.655-61, 2000
- LANDER, E. S.; SCHORK, N. J. Genetic dissection of complex traits. **Science**, Washington, v. 265, p. 2037-2048, 1994.
- LENGLER, S. **Apicultura**: manejo, nutrição, sanidade e produtos das abelhas. 6 ed. Santa Maria, 2002.

- LEOPOLDINO, M.N. Avaliação do feromônio de Nasonov sintético e óleo essencial de capim santo (*Cymbopogon citratus*) como atrativos para enxames de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). **Ciência Animal**, Fortaleza, v.12, n.1, p.19-23. 2002.
- LIPINSK, Z. **Essence and mechanism of nest abandonment by honeybee swarms: swarming, absconding, migration and related phenomena**. Zbigniew Lipinski, p.293, 2001.
- LIVANIS, G.; MOSS, C. B. The effect of Africanized honey bees on honey production in the United States: An informational approach. **Ecological Economics**, Hanover, v. 69, n. 4, p. 895-904, 2010.
- MEDINA-FLORES, C. A.; GUZMÁN-NOVOA, E.; HAMIDUZZAMAN, M. M.; ARÉCHIGA-FLORES, C. F.; LÓPEZ-CARLOS, M. A. Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in Mexico. **Genetics and Molecular Research: GMR**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 3, p. 7282-7293, 2014.
- MENDONÇA, K. et al. Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por *Apis mellifera* L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1748-1753, 2008.
- MESSAGE, D. **Efeito das condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas *Apis mellifera***. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, 136p, 1979.
- MESSAGE, D.; GONÇALVES, L. S. Efeito das condições climáticas e da colônia no comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 5.; e CONGRESSO LATINO-IBERO-AMERICANO DE APICULTURA, 3., Viçosa. **Anais**. Viçosa, Editora Imprensa Universitária da UFV, p. 140 -141, 1980.
- MESSAGE, D.; GONÇALVES, L. S. Estudo da resistência comportamental à Cria Pútrida Européia em *Apis mellifera adansonii* (africanizadas). In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 4, Curitiba, 1976. **Anais.**, Ribeirão Preto, Elus, p. 185-195, 1977.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.
- MICHAILIDOU, K.; BEESLEY, J.; LINDSTROM, S.; CANISIUS, S.; DENNIS, J.; LUSH, M. J.; PERKINS, B. J. Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer. **Nature Genetics**, Oxford, n. 47, v. 4, p. 373-380, 2015.
- MILFONT, M. O.; FREITAS, B. M.; RIZZARDO, R. A. G.; GUIMARÃES, M. O. Produção de mel por abelhas africanizadas em plantio de mamoneira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1206-1211, 2009.
- MOMOT, J. P.; ROTHENBUHLER, W. C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees: VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar. **Journal Apicultural Research**, v.10, p.11-12, 1971.

- MONTENEGRO, S.; BIANCHI, E.; AVALLONE, C. Caracterización de mieles del Parque Chaqueño: determinación de hidroximetilfurfural, plomo y antibióticos. **Facultad de Agroindustrias**, Chaco, 2003.
- MORETTO, G.; GONÇALVES, L.S.; DE JONG, D. Heritability of Africanized and European honey bee defensive behavior against the mite *Varroa jacobsoni*. **Revista Brasileira de Genética**, v.16, n.1, p.71-77, 1993.
- NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a história da apicultura brasileira, In J.M.F. Camargo (org.), **Manual de apicultura**. Piracicaba, Editora Agronômica Ceres Ltda, p. 252, 1972.
- OLDROYD, B. P. Domestication of honey bees was associated with expansion. **Molecular Ecology**, Malden, v. 21, n. 18, p. 4409-4411, 2012.
- OTIS, G. W.; SPIVAK, M.; FLETCHER, D. J. C.; BREED, M. D. Population biology of the Africanized honey bee. **The " African " honey bee.**, p. 213-234, 1991.
- OXLEY, P. R.; SPIVAK, M.; OLDROYD, B. P. Six quantitative trait loci influence task thresholds for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). **Molecular Ecology**, Malden, v. 19, p.1452-1461, 2010.
- PALACIO, M. A.; FIGINI, E. E.; RUFFINENGO, S. R.; RODRIGUEZ, E. M.; DEL HOYO, M. L.; BEDASCARRASBURE, E. L. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. **Apidologie**, Paris, v.31, p. 471-478, 2000.
- PARK, D.; JUNG, J. W.; CHOI, B. S.; JAYAKODI, M.; LEE, J.; LIM, J.; CHOI, I. Y. Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing. **BMC Genomics**, London, v. 16, n.1, p.1, 2015.
- PARK, O. W. Testing for resistance to American foulbrood in honeybees. **Journal Economy Entomology**, v. 30, p.504-512, 1937.
- PEREIRA, A. M.; CHAUD-NETTO, J. Africanized honeybees: biological characteristics, urban nesting behavior and accidents caused in Brazilian cities (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, v. 46, n. 535–550, 2005.
- PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R.; VILELA, S. L. O. **Produção de mel. Sistema de Produção**. EMBRAPA Meio Norte, julho, 2003. ISSN 1678-8818. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/autores.htm>. Acesso em: 8 de maio de 2014.
- PEREIRA, F. M.; LOPES, M.T.R. **O início da Apicultura no Brasil**. Página Rural, 6 jan 2011. Disponível em: <http://www.paginarural.com.br/artigo/2189/o-inicio-da-apicultura-no-brasil>. Acesso em: 07 maio 2014.
- PÉREZ-SATO, J. A. **Towards a greater scientific basis in beekeeping: improved methods of queen introduction and breeding**. Ph.D dissertation, University of Shefeld, United Kingdom, 2009.
- PESANTE, D. G.; RINDERER, T. E.; COLLINS, A. M.; BOYKIN, D. L.; BUCO, S. M. Honey production in Venezuela: effects of feeding sugar syrup on colony weight

- gains by Africanized and European colonies. **Apidologie**, Paris, v. 23, p. 545–552, 1992.
- PETERSON, B. K.; WEBER, J. N.; KAY, E. H.; FISHER, H. S.; HOEKSTRA, H. E. Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.5, 2012.
- QIN, X., EVANS, J.D., ARONSTEIN, K.A., MURRAY, K.D., WEINSTOCK, G.M. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. **Insect Molecular Biology**, v. 15, p. 715–718, 2006.
- QUEZADA-EUAN, J. J. G.; PAXTON, R. J. Rapid intergenerational changes in morphology and behaviour in colonies of Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) from tropical Yucatan, Mexico. **Journal of Apicultural Research**, Brighton, v. 38, p. 93–104, 1999.
- RATH, W.; DRESCHER, W. Response of *Apis cerana* Fabr towards brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud and infestation rate of colonies in Thailand. **Apidologie**, Paris, v. 21, p. 311-321, 1990.
- RINDERER, T. E.; BOLTEN, A. B.; COLLINS, A. M.; HARBO, J. B. Nectar - foraging characteristics of Africanized and European honeybees in the Neotropics. **Journal of Apicultural Research**, Brighton, v. 23, p. 70–79, 1984.
- RINDERER, T. E.; COLLINS, A. M.; TUCKER, K. W. Honey production and underlying nectar harvesting activities of Africanized and European honeybees. **Journal of Apicultural Research**, Brighton, v. 23, p. 161–167, 1985.
- RINDERER, T. E.; SYLVESTER, H. A.; BROWN, M. A. Field and simplified techniques for identifying Africanized and European honey bees. **Apidologie**, Paris, v. 17, p. 33–48, 1986.
- ROCHA, J.S. **Apicultura, Manual Técnico 05**; Programa Rio Rural, Niterói – RJ, Julho de 2008.
- ROOT, E. R.; ROOT, H. H.; ROOT, J. A. **ABC and XYZ of bee culture**. Root Publishing, 40 th Edition, 516p, 1990.
- ROTHENBUHLER, W. C. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F 1 and backcross generations to disease-killed brood. **American Zoology**, v. 4, p. 111-123, 1964.
- RUTTNER, F. **Biogeography and Taxonomy of Honeybees**. Berlin: Springer, 1988.
- RUTTNER, F. **Natural history of honey bees**. Ehrenwirth Verlag, 1992.
- SALAMANCA, G. G.; PÉREZ, F. C.; SERRA, B. J. A. **Determinación de la actividad de agua em mieles colombianos de las zonas de Bocayá y Tolima**. 2001. Disponível em: <http://www.beekeeping.com/menu_sp/articulos.htm>. Acesso em: 16 mai. 2014.
- SHEPPARD, W. S.; ARIAS, M. C.; GRECH, A.; MEIXNER, M. D. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. **Apidologie**, Paris, v. 28, p. 287-293, 1997.

- SHEPPARD, W. S.; MEIXNER, M. D. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. **Apidologie**, Paris, v.34, p.367-375, 2003.
- SILVA, G. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIQUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzida no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Química Ambiental**, Campina Grande, v. 8, n. 2/3, p. 260-265, 2004
- SILVA, K.F.N.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; SILVA, C.T.S.; MELO, K.S. Caracterização físico químicas de mel produzido em Limoeiro do Norte durante o armazenamento. **Caatinga**, Mossoró, v.22, n. 4, p. 246-254, 2009.
- SMITH, F. G. The races of honeybees in Africa. **Bee World**, v. 42, p. 255-260, 1961.
- SORIA, R.F. **Levantamento parcial do mel comercializado na cidade de Santa Maria –RS**. 2000. 26 f. Tese - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.
- SOUZA, D. A.; GRAMACHO, K. P.; CASTAGNINO, G. L. B. Produtividade de mel e comportamento defensivo como índices de melhoramento genético de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 2, p. 550-557, 2012.
- SOUZA, D.C. Captura de enxames de abelhas africanizadas com caixas iscas: como evitar acidentes e aumentar as colônias do seu apiário. Anais do XIV **Congresso Brasileiro de Apicultura**, Campo Grande, p. 161-165, 2002.
- SPIVAK, M.; BATRA, S.; SEGREDÁ, F.; CASTRO, A. L.; RAMIREZ, W. Honey production by Africanized and European honey bees in Costa Rica. **Apidologie**, Paris, v. 20, p. 207–220, 1989.
- SPIVAK, M.; FLETCHER, D. J. C.; BREED, M. D. The Africanization process in Costa Rica. **The " African" honey bee.**, p. 137-155, 1991.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. **Apidologie**, Paris, v.32, p.555-565, 2001.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. S. Honey bee hygienic behavior. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 138, p. 283, 1998.
- STORT, A. C. Estudo genético da agressividade da *Apis mellifera*. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 24, n. 5, p. 208, 1971.
- STORT, A. C. Genetical study of aggressiveness of two subspecies of *Apis mellifera* in Brasil 1. Some tests measure aggressiveness. **Journal of Apicultural Research**. Brighton, v.13, n. 1, p. 33-38, 1974.
- STORT, A. C.; GONÇALVES, L. S. **Genetics of defensive behavior II.** The “African” Honey bee Boulder Co: Westview, pp. 329-356, 1991.
- STORT, A.C.; GONÇALVES, L.S.; MALASPINA, O.; DUARTE, F.A.M. Study on sineacar effectiveness in controlling *Varroa jacobsoni*. **Apidologie**, Paris, v. 12, p. 289-297, 1982.

- TARR, H. L. A. Studies on American foulbrood of bees. The relative pathogenicity of vegetative cells and endospore of *Bacillus larvae* for the brood of the bee. **Annals Applied Biology**, v. 24, n.2, p.377-384, 1937.
- TAYLOR J. R. The past and possible future spread of Africanized honeybees in the Americas. **Bee World**, 1977.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. **Nature**, New York, v. 443, p. 931-949, 2006.
- TRINDADE, M.S.A.; SOUZA, A.H.; VASCONCELOS, W.E.; FREITAS, R.S.; SILVA, A.M.A.; PEREIRA, D.S.; MARACAJÁ, P.B. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Mossoró, v.4, n.1, p. 1-10, 2004.
- UCHÔA, F. A. B.; SOUZA, D. C.; ALEVS, A. A.; SILVA, F. A. S.; NUNES, J. R. A.; LIMA, C. J. L.; SOUSA, J. S. Effect of weight of africanized queens (*Apis mellifera* L.) at birth in honey production in semi-arid piauiense. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Campina Grande, v. 8, n.2, p.01-06, 2012.
- VANDAME, R.; MORAND, S.; COLIN, M. E.; BELZUNCES, L. P. Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. **Apidologie**, Paris, v. 33, n. 5, p. 433-446, 2002.
- VILELA, S. L. O. A importância das novas atividades agrícolas ante a globalização: a apicultura no Estado do Piauí. **Teresina: Embrapa Meio-Norte**, p. 228, 2000.
- WALLBERG, A.; HAN, F.; WELLHAGEN, G.; DAHLE, B.; KAWATA, M.; HADDAD, N.; PIRK, C. W. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature Genetics**, Oxford, v. 46, p. 1081-1088, 2014.
- WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, Boston, v. 27, n.3, p. 254-98, 2006.
- WHITFIELD, C. W.; BEHURA, S. K.; BERLOCHER, S. H.; CLARK, A. G.; JOHNSTON, J. S.; SHEPPARD, W. S.; TSUTSUI, N. D. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. **Science**, Washington, v. 314, n. 5799, p. 642-645, 2006.
- WIESE, H. **Apicultura novos tempos**. Guaíba: Agropecuária, 424 p., 2000.
- WINSTON, M. L. The biology and management of Africanized honey bees. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 173-193, 1992.
- WOODROW, A. W.; STATES, H. J. Removal of diseased brood in colonies infected with AFB. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 81, p. 22-26, 1943.
- ZANKE, C. D.; LING, J.; PLIESKE, J.; KOLLERS, S.; EBMEYER, E.; KORZUN, V.; EICHHORN, A. Analysis of main effect QTL for thousand grain weight in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by genome-wide association

mapping. **Frontiers in Plant Science**, Melbourne, v. 6., p. 644, 2015.

ZÁRATE, O; DE ARAUJO-FREITAS, C.; MEDINA, L. A.; VELASQUEX, A.; QUEZADA-EUAN, G. Phenotypic correlations of field and laboratory tests with honey production in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, Paris, v. 39, p. 523–530, 2008.

ZAYED, A.; WHITFIELD, C. W. A genome-wide signature of positive selection in ancient and recent invasive expansions of the honey bee *Apis mellifera*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 9, 3421-3426, 2008.

CAPITULO II

O artigo a seguir está redigido de acordo com as exigências para publicação
na revista Apidologie.

**POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E GENES CANDIDATOS
ASSOCIADOS COM ALTA PRODUÇÃO DE MEL EM ABELHAS *Apis mellifera*
AFRICANIZADAS.**

Samir Moura Kadri¹, Brock Harpur², Diego Peres Alonso³, Paulo Eduardo Martins
Ribolla³, Ricardo de Oliveira Orsi¹

¹Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, UNESP, NECTAR - Núcleo de Ensino Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional, Botucatu, São Paulo, Brasil

² Department of Biology, Faculty of Sciences, York University, Toronto, Canada.

³ Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Título curto. **SNPs E GENES CANDIDATOS PARA PRODUÇÃO DE MEL**

RESUMO: Os objetivos deste trabalho foram selecionar Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) associados à produção de mel e genes candidatos para esta característica. Foram selecionadas oito colmeias mais (APM) e dez menos (BPM) produtivas de um total de 50 colmeias, e avaliados seu comportamento higiênico e defensivo. Após sequenciado o DNA extraído das rainhas das colônias, SNPs foram associados à produção de mel e genes candidatos selecionados. Sondas Taqman foram testadas nas amostras, sendo selecionados dois SNPs e quatro genes candidatos para produção de mel. Foi calculada a probabilidade conjunta para a associação do genótipo e produção de mel, apresentando 0,9844 para genótipos em colônias com alta produção de mel quando presentes os dois SNPs descritos. Deste modo, a utilização dos dois SNPs para alta produção de mel poderá ser utilizada como ferramenta rápida e precisa em programas de melhoramento.

Palavras-chaves: apicultura/sequenciamento genômico/seleção genética.

**SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNP'S) AND CANDIDATE
GENES FOR HONEY PRODUCTION BY AFRICANIZED *Apis mellifera*
HONEYBEES**

ABSTRACT: The aim of this research was select Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) associated with honey production and candidate genes for this trait. Eight colonies were selected with high (APM) and ten with low (BPM) honey production, from 50 colonies; hygienic and defensive behavior were evaluated. Queens DNA was extracted and sequenced from these colonies, SNPs were associated with honey production and candidate genes selected. Taqman probes were tested in these samples, two SNPs and four candidate genes were selected with high association with honey production trait. Combined probability was calculated for the association between genotype and phenotype, with 0.9844 for genotypes in colonies with high honey production when positive for these two SNPs described. Thus, the use of both SNPs for high honey production can be used as a fast and precise tool in breeding programs.

Keywords: beekeeping/genomic sequencing/genetic selection

1. INTRODUÇÃO

A atividade apícola tradicional baseia-se na captura de enxames migratórios (Leopoldino, 2002) e/ou divisão artificial de enxames sem linhagem definida. Estas práticas são comumente utilizadas para repor ou aumentar o número de colônias pelos apicultores; porém, estes enxames podem apresentar características genéticas desfavoráveis para a produção de mel, afetando, significativamente, a produtividade das colônias (Duay, 1996).

Segundo Souza (2002), estas diferenças entre colmeias reduzem a produtividade de mel e oneram os custos de produção, diminuindo a eficiência e competitividade do setor. Assim, instalados os apiários com os enxames capturados e/ou divididos artificialmente, é importante estabelecer um programa de melhoramento genético para aumentar a produtividade de mel.

Os programas de melhoramento genético envolvem um conjunto de processos que visam aumentar a frequência de genes desejáveis ou combinações genéticas que resultem em uma população com as características desejadas, que podem ser morfológicas, fisiológicas ou comportamentais (Kerr, 2006). Pesquisas em seleção genética permitem manter as linhagens com as características desejadas, o que justifica a incorporação desta tecnologia aos programas comerciais de criação de abelhas (Cobey e Schley, 2002). Os principais fatores considerados na seleção de colônias africanizadas consistem na alta produtividade de mel, baixa defensividade, baixo potencial enxameatório e alto comportamento higiênico (Souza et al., 2012).

Dos produtos fornecidos pelas abelhas e comercializados, o mel é sem dúvida o mais conhecido e difundido (Andrade et al., 2012). Desta forma, faz-se necessário o

estudo de populações de abelhas *Apis mellifera* com alta produção de mel servindo como base para estudos de melhoramento genético.

Atualmente, o genoma de *A. mellifera* está completamente sequenciado (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), e o desenvolvimento e viabilização de sequenciamento de próxima geração (Metzker, 2010), permite estudos de correlação entre genótipo e fenótipo em grande número de amostras sequenciadas parcialmente ou totalmente. Para isso, o Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), pode ser a forma mais frequente de variabilidade genética dos seres vivos, incluindo-se as abelhas; a sua compreensão pode ajudar o estudo de genética populacional e, conseqüentemente, auxiliar em programas de melhoramento genético (Qin et al., 2006).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar SNPs associados à produção de mel e genes candidatos para esta característica, por meio de sequenciamento parcial do genoma de rainhas de colônias com alta e baixa produção de mel. Os resultados podem trazer grandes benefícios para o aumento da produção apícola, e ser utilizado como alternativa para rápida seleção de enxames em programas de melhoramento genético de abelhas *A. mellifera* africanizadas e estudos de genes ligados a esta característica.

2. MATERIAL E METODOS

A presente pesquisa foi conduzida no setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizada na Fazenda Experimental Lageado, UNESP, Câmpus de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22°49" de latitude Sul e 48° 24" de longitude Oeste e altitude média de 623 m. Foram utilizadas 50 colônias de abelhas *A. mellifera* africanizadas, alojadas em colmeias padrão Langstroth,

distribuídas ao acaso. Foi feita a substituição natural das rainhas das colônias, 90 dias antes do início da florada, para padronização de idade, fazendo a localização visual e orfando o enxame. A padronização de quadros de cria e alimentos no ninho foi feita 30 dias antes do início da florada concomitante com a marcação do tórax das rainhas com caneta de tinta atóxica, padronizando em sete quadros de cria e três de alimento no ninho de cada enxame.

As colônias receberam alimentação artificial de estímulo (xarope de açúcar na proporção de 1:1), por um período de 45 dias anterior a florada que ocorreu no período de 13 de Dezembro de 2012 a 3 de Março de 2013, recebendo 500 ml semanalmente. Uma semana antes de colocar as melgueiras sobre o ninho, a alimentação artificial foi suspensa para evitar possíveis contaminações do mel.

Foram acrescentadas melgueiras padrão Langstroth conforme o desenvolvimento das colônias ao longo da florada. A produção de mel foi colhida ao final da florada, separada por colmeia e melgueira. As melgueiras foram identificadas e pesadas antes e após a extração do mel por centrifugação, obtendo a produção de mel exata por colmeia. Foram selecionadas as oito colônias que apresentaram maior produção de mel (APM) e as dez com menor produção (BPM), usando como corte as oito colmeias com maior produção e as dez colmeias com menor produção de mel.

Os dados climáticos, referentes ao período experimental, foram cedidos pelo Departamento de Ciências Ambientais da Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Campus de Botucatu.

O comportamento defensivo das colônias foi mensurado de acordo com metodologia descrita por Stort (1972) e Brandeburgo e Gonçalves (1990). Para aferir o comportamento defensivo foi quantificado o tempo, em segundos, da primeira ferroad

(TPF) na bola preta de camurça e o número de ferrões (NFB) depositados após um minuto.

A análise do comportamento higiênico foi feita por meio do método de perfuração de células de cria operculadas, descrito por Newton e Ostasiewski (1986), fornecendo a taxa de comportamento higiênico.

Ao final do experimento em campo foram coletadas individualmente as rainhas dos enxames pertencentes aos dois grupos estudados, APM e BPM, sendo selecionadas apenas as rainhas que possuíssem a marca no tórax feita ao início do experimento evitando rainhas substituídas pelo enxame. Deste modo apenas 18 das 20 rainhas foram coletadas para a análise genética. A substituição de abelhas rainhas ocorre devido diversos fatores, tais como: manejo, problemas sanitários e principalmente pela alta taxa de enxameação e abandono apresentada pelas abelhas híbridas africanizadas (Otis, 1991). Após a coleta, as rainhas foram acondicionadas em tubos e congeladas em freezer – 80° C para extração do DNA.

Foi extraído o DNA do tecido tóraxico de cada rainha pelo método de extração comercial Chelex® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories), conforme recomendações dos fabricantes. O DNA foi então quantificado com o uso de Qubit® 2.0 Fluorometer. A integridade foi avaliada através de corrida eletroforética, com emprego de tampão TBE, feita em gel de agarose a 1% (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) corados GelRed™ (0.01 mg/mL), adaptado de Sambrook et al. (1989). Em seguida, o gel foi exposto à luz ultra-violeta e analisado.

Depois de isolado o DNA genômico de cada amostra com alta qualidade, as amostras foram submetidos à técnica de ddRADseq (Double Digested Restriction Site Associated DNA Sequencing), descrita por Peterson et al. (2012), devido seu baixo

custo e ser um método largamente utilizado para genotipagem (Recknagel et al. 2013; Zhou et al., 2014; Lal et al., 2015).

O sequenciamento genômico foi realizado por meio da tecnologia de sequenciamento de DNA Illumina (DNA-Seq) com o TruSeq DNA Sample Preparation kit. O DNA total extraído foi seletivamente fragmentado enzimaticamente gerando fragmentos de aproximadamente 200 pb. As amostras foram carregadas na flowcell e sequenciadas. Pelo método Sequence by Synthesis (SBS) por 50 ciclos no aparelho MiSeq (Illumina), com cobertura média de $15,06 \pm 3,2$.

As sequências obtidas do MiSeq, foram submetidas a uma sequência de análises de bioinformática, previamente descritas por (Harpur et al. 2014), para alinhar os reads, detectar SNPs e filtrar regiões repetitivas do genoma.

Os reads de cada amostra sequenciada foram separados dos adaptadores Illumina usando Trimmomaticv0.32 e foram alinhados utilizando como sequência padrão o genoma de *A. mellifera* AMELv4.5 (Elsik et al. 2014) utilizando os parâmetros padrões do programa BWA aligner v0.7.5a-r405 (Li & Durbin, 2009), posteriormente foi importado para o programa SAMtools v 0.1.19-44428cd (Li et al. 2009) em formato BAM. Com utilização de Stampy v1.0.21 (Lunter & Goodson et al. 2011), cada amostra foi realinhada com a função (--d) a uma taxa de substituição de 0,002 para melhor alinhar a sequências divergentes, devido o genoma padrão AMELv4.5 ter sequências divergentes as do genoma de abelhas *Apis mellifera* L. africanizadas. Em seguida marcamos e removemos reads em duplicata com PICARD v 1.141 e as sequências foram realinhadas com GATK's Realigner Target Creator, IndelRealigner v 3.1-1-g07a4bf8 para reduzir alinhamentos errôneos próximos a indels (McKenna et al. 2010).

Foram detectados SNPs e foi criado um arquivo VCF (Variant Calling File) usando o programa GATK. SNPs próximos 10 pb de InDels foram removidos.

Scaffolds não mapeados, sequências mitocondriais, fragmentos do genoma com baixa qualidade e baixa complexidade genômica foram removidas.

Regiões associadas com produção de mel entre colônias com APM e BPM deve ter uma drástica diferença na frequência alélica para SNPs associados a esta característica. Diferenças em frequência alélica podem ser mensuradas usando pairwise F_{st} (Weir and Cockerham, 1984), onde um $F_{st} = 1$ indica extrema distância em frequência alélica entre duas populações. Utilizando VCFtools v0.1.13 (Danecek et al. 2011) foi estimado F_{st} entre SNPs encontrados nas amostras de colônias com APM e BPM.

Testes de associação foram feitos utilizando o programa PLINK version 1.05 (Purcell et al. 2007) (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>). Todos os testes estatísticos foram feitos com o programa R (R Development Core Team, 2011). Pipeline das análises de bioinformática é demonstrado na Figura 1.

Após a seleção dos 6 SNPs associados a produção de mel com maior F_{st} e menor valor de P, foi feita a identificação manual de genes em uma cobertura de 50 Kb para cada lado, utilizando o arquivo de anotação de genes *amel_OGSv3.2.gff3* (Elsik et al. 2015).

As amostras de DNA genômico das 18 colônias selecionadas foram genotipadas para os SNPs selecionados pela utilização do método de discriminação alélica por sondas TaqMan® confeccionadas no sistema “Assay-on-Demand” da empresa Applied Biosystems, um par de oligonucleotídeos específicos para cada polimorfismo foi desenhado, juntamente com duas sondas fluorescentes(VIC/FAM)(Quadro 1).

A genotipagem foi realizada em PCR em tempo real StepOnePlus® da Applied Biosystems, utilizando a opção de genotipagem por TaqMan. Cada reação teve

volume final de 10 μ l, contendo 5 μ l TaqMan Master mix (Applied Biosystems), 25 ng de DNA genômico, 0,25 μ l sondas TaqMan e primers (Assay-on-Demand) completadas com água MilliQ.

As frequências alélicas foram obtidas por contagem simples e submetidas ao teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$). Foi calculada a probabilidade dos resultados obtidos na genotipagem das colônias dos dois grupos. A probabilidade combinada dos resultados de genotipagem das colônias pelos SNPs significativos foi calculada utilizando a fórmula:

$$PC = 1 - (1 - P_{snp1}) * (1 - P_{snp2})$$

Sendo:

PC= probabilidade combinada

P_{snp1} =probabilidade para genótipo do snp1

P_{snp2} =probabilidade para genótipo do snp2

3. RESULTADOS

As oito colmeias com maior e dez colmeias com menor produção de mel foram divididas em dois grupos: Alta Produção de Mel (APM) com mais de 10 Kg de mel por colmeia ($11,59 \pm 1,87$ Kg) e Baixa Produção de Mel (BPM) com menos de 2 Kg de mel por colmeia ($1,71 \pm 0,57$ Kg).

A média dos dados climáticos, referentes ao período do estudo foram: temperatura mínima de 20,6 °C, temperatura máxima de 28,1 °C, temperatura média de 24,3°C, insolação de $5,8 \pm 3,7$ e velocidade do vento de $79,6 \pm 42,7$ km/h. Precipitação pluviométrica total do período 1239,4 mm.

Os dois grupos, APM e BPM, não apresentaram diferença significativa para o tempo de primeira ferroada ($2,01 \pm 0,56$ e $2,37 \pm 0,82$, respectivamente). Porém, para o NFB, o grupo APM apresentou número inferior de ferrões ($32,37 \pm 9,80$), de forma significativa, quando comparado ao grupo BPM ($38,63 \pm 14,48$).

Os dados da taxa de comportamento higiênico não mostraram diferença estatística entre os grupos ($85,72 \pm 4,58\%$ e $87,65 \pm 4,92\%$ para APM e BPM, respectivamente).

Não foi verificada correlação entre produção de mel, comportamento higiênico e defensividade, entre os enxames de APM e BPM.

Após alinhamento e filtragem das sequências, com a utilização do programa GATK foram encontrados 139 095 SNPs dentre as 18 amostras sequenciadas. Foram selecionados 124 SNPs com $P < 0,005$, associados a produção de mel (Quadro Suplementar 1).

Dentre os 124 SNPs associados à produção de mel, foram selecionados seis, com alta significância e que estivessem presentes na maioria das amostras sequenciadas, uma vez que o trabalho foi desenvolvido com a técnica de ddRADseq, na qual o DNA é sequenciado aleatoriamente (Quadro 2).

Após a inspeção manual de áreas de 100Kb próximas a cada um dos seis SNPs selecionados foram identificados genes candidatos para produção de mel apresentados no quadro 3.

Todas as 18 amostras de DNA das rainhas das colônias selecionadas dos grupos de APM e BPM foram genotipadas por sondas TaqMan®, e resultados são apresentados na quadro 4.

Correlacionado os dados de produção de mel com os dados de genotipagem (homozigoto alelo selvagem, heterozigoto e homozigoto alelo mutante), e aplicando o

teste de Qui-quadrado, obtivemos significância apenas para os SNPs 2 e 3 ($P < 0,05$). Para o SNP2 o genótipo T/T e T/G em amostras do grupo de baixa produção de mel e probabilidade de 0,6 e G/G alta produção e probabilidade de 0,87. Para o SNP3 o genótipo G/G e G/A em amostras do grupo de baixa produção de mel e probabilidade de 0,8 e A/A alta produção de mel com probabilidade de 0,875.

Uma vez calculando a Probabilidade Conjunta (PC) para os SNPs 2 e 3 obtivemos 0,921 em colônias com baixa produção de mel e 0,9844 em colônias com alta produção de mel, ficando evidente o aumento da eficácia do teste de genotipagem para colônias com alta e baixa produção de mel utilizando dois SNPs no teste de genotipagem.

4. DISCUSSÃO

O fenótipo para produtividade de mel em abelhas *Apis mellifera* africanizadas pode variar em relação a fatores internos e externos à colônia de abelhas.

Como fatores internos podemos ressaltar idade da rainha, quantidade de abelhas operárias durante a florada de produção, pré disposição genética da rainha para produção de mel, doenças e homeostase da colônia (Moore et al., 2012; Rangel et al. 2013). Desta forma, este experimento foi delineado no sentido de que minimizar interferências na seleção dos enxames com APM e BMP. Para isso, todos os enxames foram padronizados quanto à idade das rainhas, sendo substituídas 90 dias antes do início da florada, com o objetivo de obter padrão de postura e desenvolvimento dos enxames semelhantes (Groh et al., 2006).

Por outro lado, os fatores externos estão relacionados com o potencial de secreção de néctar da florada existente ao redor dos enxames e o clima da região

durante a florada de produção (Schweitzer et al. 2013). Entretanto, todos os enxames experimentais foram instalados no mesmo apiário dispondo de mesmas condições climáticas e florada apícola. Importante ressaltar que todos os enxames receberam o mesmo manejo para produção de mel, e melgueiras foram acrescidas gradativamente ao longo da florada e em relação ao desenvolvimento populacional da colônia, respeitando a homeostase do enxame (Couto e Couto, 2002). Assim mesmo, a produção de mel das colônias do grupo APM apresentaram diferença de produtividade 6,77 vezes maior que o grupo BPM.

A produtividade de mel é uma característica com herdabilidade de 0,27 (Brascamp et al. 2016), sendo considerada uma característica que pode ser utilizada em programas de melhoramento genético.

As abelhas africanizadas são mundialmente conhecidas como abelhas que apresentam alto comportamento defensivo, o qual foi herdado da linhagem A, africana, progenitora do cruzamento das abelhas africanizadas (Whitfield et al., 2006). Sabe-se que o comportamento defensivo das abelhas híbridas africanizadas esta intimamente ligada ao grau de africanização da colônia (Breed et al., 2004), e destaca-se que a importação de abelhas de linhagem A foi feita com o intuito de aumentar a produção de mel nacional na década de 50 (Kerr, 1967). Desta forma o comportamento defensivo foi avaliado nas colônias dos dois grupos selecionados. O grupo de APM apresentou baixa quantidade de ferrões quando comparado ao grupo BPM.

A alta taxa de comportamento higiênico em abelhas *Apis mellifera* africanizadas é característica marcante neste híbrido (Medina-Flores et al., 2014), um dos fatos ao qual abelhas da linhagem A, africana, foram introduzidas na América do Sul para estudos de melhoramento genético para aumento de resistência a doenças e produtividade de mel (Kerr, 1967). A taxa de comportamento higiênico foi utilizada como ferramenta para

mensurar a pré disposição dos enxames em adquirir parasitas e doenças como *Varroa destructor* (Tsuruda et al., 2012), *Nosema ceranae* (Eiri et al., 2015), *Paenibacillus larvae* (Spivak e Reuter, 2001), *Ascosphaera apis* (Invernizzi, 2001). No entanto nenhuma correlação foi encontrada entre comportamento higiênico e produção de mel, neste trabalho.

Por meio das sequencias obtidas pelo aparelho Miseq (Illumina), foi selecionado um painel com 124 SNPs nas amostras analisadas que foram associados à produção de mel e selecionamos seis para o desenvolvimento de sondas TaqMan®.

Todos os genes situados até 100 kb dos SNPs estudados foram considerados como gene candidato para a característica (Quadro 2), utilizando a anotação de genes no genoma total de *A. mellifera* versão amel_OGSv3.2.gff3.

Dentre os 15 genes candidatos selecionados em relação aos seis SNPs selecionados, oito são conhecidos como codificadores de proteínas e sete ainda não foram estudados. Dentre os genes codificadores de proteínas o gene GB 55855, localizado no cromossomo 3 de *Apis mellifera* foi estudado em *Drosophila*, codificando uma prolina serina/ treonina-cinase envolvida na especificação da retina. Nemo, nome dado ao gene, regula positivamente a ausência de olhos em *Drosophilas* (Morillo et al., 2012). Os SNPs 1, 2 e 4 estão localizados nos introns de três genes (GB43385, Gb55855 e GB53527), assim sendo, são SNPs não codificadores.

Deste modo, fica evidente o grande potencial da utilização de associações fenotípicas a SNPs ao longo do genoma para característica de importância econômica na área de produção animal, como demonstrado nas mais variadas culturas animais. Esta técnica pode ser utilizada como ferramenta rápida e segura em programas de melhoramento genético e seleção de enxames de abelhas *A. mellifera*.

Deste modo, podemos concluir nesta pesquisa que dos seis SNPs selecionados e associados à produção de mel, dois tem o potencial para serem utilizados em programas de melhoramento genético para abelhas *Apis mellifera* africanizadas como nova ferramenta precisa para seleção de enxames. Quatro genes candidatos para esta característica são descritos neste estudo possibilitando futuro entendimento de como é regulada a característica para produção de mel em abelhas africanizadas.

5. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2013/01588-1 e BEPE 2014/10150-2) pelas bolsas de estudo concedidas e financiamento da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- Andrade S. E., Maracajá P. B., Silva R. A., Freires G.F, Pereira A. M, Fernandes A. A. (2012) Estudo sobre o uso de abelha associado com plantas na comunidade Várzea Comprida dos Oliveiras, Pombal, Paraíba, Brasil, *Agrop. Ciênt. no Semi-Árido* 8(3).
- Brandeburgo M. A. M., Gonçalves I.S. (1990) Environmental influence on the aggressive (defense) behaviour and colony development of africanized bees (*Apis mellifera*), *Cien. e Cult*, 42(10), 759-771.
- Brascamp E. W., Willam A., Boigenzahn C., Bijma P., Veerkamp R. F. Heritabilities and genetic correlations for honey yield, gentleness, calmness and swarming behaviour in Austrian honey bees, *Apidologie* 1-10.
- Breed M. D., Guzman-Novoa E., Hunt G. J. (2004) Defensive behavior of honey bees: organization, genetics and comparisons with other bees, *Ann. Rev. Entomol.* 49, 271–298.
- Cobey S., Scheley P. (2002) Innovations in instrumental insemination. The compact, versatile right and left handed Schley model II instrument, *Am. Bee J.* 142(6), 433-435.
- Couto R. H. N., Couto L. A. (2002) *Apicultura: manejo e produtos*. Funep, Jaboticabal, Brazil.
- Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C. A., Banks E., Depristo M. A., Handsaker R., Lunter G., Marth G., Sherry S. T., Mcvean G., Durbin R. (2011) The Variant Call Format and VCFtools. *Bioinform.* 27(15), 2156-2158.
- Eiri D. M., Suwannapong G., Endler M., Nieh J. C. (2015). *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. *PloS ONE* 10(5).
- Elsik C. G., Tayal A., Diesh C. M, Unni D. R., Emery M. L., Nguyen H. N., Hagen D. E. (2015) Hymenoptera Genome Database: integrating genome annotations in Hymenoptera. *Mine. Nucl. Ac. Res.* 1208, 1-8.
- Elsik C. G., Worley K. C., Bennett A. K., Beye M., Camara F., Childers C. P., (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genom.* 15(1), 1.
- Groh C., Ahrens D., Rössler W. (2006). Environment-and age-dependent plasticity of synaptic complexes in the mushroom bodies of honeybee queens. *Bra., Beh. Evol.* 68(1), 1-14.
- Harpur B. A., Kent C. F., Molodtsova D., Lebon J. M., Alqarni A. S., Owayss A. A., Zayed A. (2014) Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111(7), 2614-2619.

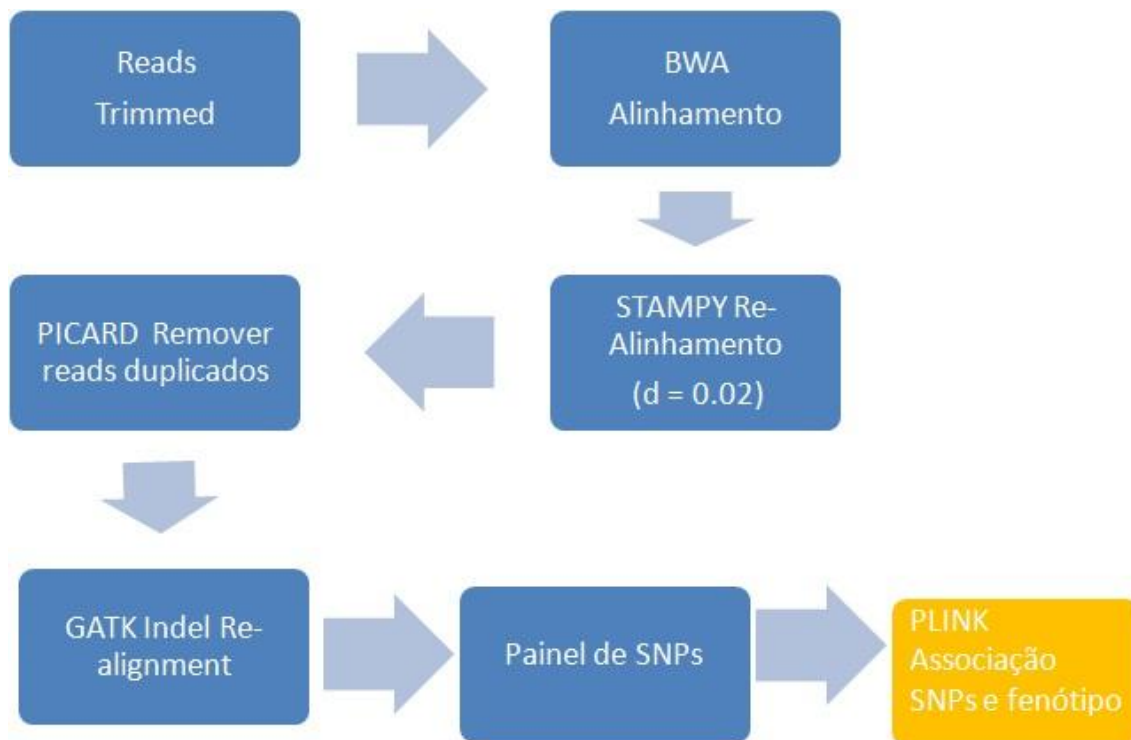
- Invernizzi C. (2001) Resistencia a la enfermedad de cria yesificada por colonias de *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higienico (Hymenoptera: Apidae). Sér. Zool. 91, 109-114.
- Kerr W. E. (2006) Método de seleção para melhoramento genético em abelhas. Magistra 18(4), 209-212.
- Kerr W.E. (1967) The history of the introduction of African bees to Brazil. South. Afric. Bee J. 39, 3-5.
- Khoury D. S., Barron A. B., Myerscough M. R. (2013) Modelling food and population dynamics in honey bee colonies. PloS one 8(5).
- Lal M. M., Southgate P. C., Jerry D. R., Zenger K. R. (2015) Fishing for divergence in a sea of connectivity: The utility of ddRADseq genotyping in a marine invertebrate, the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. Marin. genom.
- Leopoldino M. N. (2002) Avaliação do feromônio de Nasanov sintético e óleo essencial de capim santo (*Cymbopogon citratus*) como atrativos para enxames de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), Ciênc. Anim.12(1),19-23.
- Li H., Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinform. 25(14), 1754–1760.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Durbin R. (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinform. 25(16), 2078-2079.
- Lunter G., Goodson M. (2011) Stampy: A statistical algorithm for sensitive and fast mapping of Illumina sequence reads. Genom. Res. 21(6), 936–939.
- Mckenna A, Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., Depristo M. A. (2009) The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genom. Res. 20(9), 1297-1303.
- Medina-Flores C. A., Guzmán-Novoa E., Hamiduzzaman M. M., Aréchiga-Flores C. F., López-Carlos M. A. (2014). Africanized honey bees (*Apis mellifera*) have low infestation levels of the mite *Varroa destructor* in different ecological regions in Mexico. Genet. Mol. Res. 13(3), 7282-7293.
- Metzker M. L. (2010) Sequencing technologies - the next generation. Nat. Ver. Genet. 11(1), 31-46.
- Morillo S. A., Braid L. R., Verheyen E. M., Rebay I. (2012) Nemo phosphorylates Eyes absent and enhances output from the Eya-Sine oculis transcriptional complex during *Drosophila* retinal determination. Develop. Biol. 365(1), 267-276.

- Newton D.C., Ostasiewski J. R.N.J. (1986) A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Am. Bee J.* 126, 278-281.
- Otis G. W., Spivak M., Fletcher D. J. C., Breed M. D. (1991) Population biology of the Africanized honey bee. The "African" honey bee., 213-234.
- Peterson B. K., Weber J. N., Kay E. H., Fisher H. S., Hoekstra H. E. (2012) Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE* 7(5), 1-11.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A., Bender D., Maller J., Sklar P., Bakker P. L. W., Daly M. J., Sham P. C. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81(3), 559-575.
- Qin X., Evans J. D., Aronstein K. A., Murray K. D., Weinstock G. M. (2006) Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. *Insect Mol. Biol.* 15, 715-718.
- R Development Core Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rangel J., Keller J. J., Tarpy D. R. (2013) The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth. *Insectes sociaux* 60(1), 65-73.
- Recknagel H., Elmer K. R., Meyer A. (2013) A hybrid genetic linkage map of two ecologically and morphologically divergent Midas cichlid fishes (*Amphilophus* spp.) obtained by massively parallel DNA sequencing (ddRADSeq). *G3: Gen. Genom. Genet.* 3(1), 65-74.
- Sambrook J., Fritsh E. F., Maniatis, T. (1986) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring harbour Laboratory, New York, United States of America.
- Schweitzer P., Nombé I., Boussim J. I. (2013). Honey Production for Assessing the Impact of Climatic Changes on Vegetation. *Tropicult.* 31(2), 98-102.
- Souza D. A., Gramacho K. P., Castagnino G. L. B. (2012) Produtividade de mel e comportamento defensivo como índices de melhoramento genético de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). *Revis. Bras. Saú. Prod. Ani.* 13(2), 550-557.
- Spivak M., Reuter G. S. (2001) Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32, 555-565.
- Stort A. C. (1972) Estudo genético da agressividade da *Apis mellifera*. *Ciênc. Cult.* 24(5), 208.
- The Honey bee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera* (2006) *Nature* 443, 931-949.

- Tsuruda J. M., Harris J. W., Bourgeois L., Danka R. G., Hunt G. J. (2012) High-resolution linkage analyses to identify genes that influence Varroa sensitive hygiene behavior in honey bees. *PLoS ONE* 7(11).
- Weir B. S., Cockerham C. C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370.
- White Júnior, J. W. (1978) *Honey Adv. Food Res.* 24, 287-374.
- Whitfield C. W., Behura S. K., Berlocher S. H., Clark A. G., Johnston J. S., Sheppard W. S., Tsutsui N. D. (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314(5799), 642-645.
- Zhou X., Xia Y., Ren X., Chen Y., Huang L., Huang S., Jiang, H. (2014) Construction of a SNP-based genetic linkage map in cultivated peanut based on large scale marker development using next-generation double-digest restriction-site-associated DNA sequencing (ddRADseq). *BMC Genom.* 15(1), 1.

FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da pipeline utilizada para a análise dos reads feitos em seqüenciamento Illumina.



QUADROS

Quadro 1. Identificação dos SNPs (ID), sequência Primer Forward e Reverse, concentração dos primers (μM), reporter 1 e 2 (VIC e FAM-sequências) e concentração dos reportes VIC e FAM (μM).

ID	Primer Forward	Primer Reverse	Concentração dos Primers (μM)	VIC - sequência	FAM-sequência	Concentração do VIC/FAM (μM)
1	5'-CACCACGGTTTAAAAT CATTTTCGA-3'	5'-GATTGATGCTGAAATATCG ATTAATTCGATTAT-3'	36	5'-VIC- CGATGCTGAT T GAATT-3'	FAM-CGATGCTGATCG AATT-3'	8
2	5'-TCCGTATTTTATAATATTT TATAATTCGAAGAATGAAAGA AT-3'	5'-GTCCTCTTTCTTCGATTTCGT TATCACAAATT-3'	36	5'-VIC- ACGTAATCGA T ACTTTCAT-3'	FAM-CGTAATCGATACG TTCAT-3'	8
3	5'-TGACGGAACCTGACGAAA AGTC-3'	5'-TCCTCCCAGCTCCTTTCCT-3'	36	5'-VIC- CTCTCCTTTT T CCCTCTCT-3'	FAM- TCTCTCCTTTTTTCCTCT CT-3'	8
4	5'-TGATCGCTCGTGTAAGTG TAACG-3'	5'-CTCGTGGGTTAGGCATCG-3'	36	5'-VIC- TGTCAGCAG GT GAATG-3'	FAM-TGTCAGCAAGTG AATG-3'	8
5	5'-TCATCGAATCCGAAAATG TGATCGA-3'	5'-CGTGTAATTCGCATCTGCT CAGA-3'	36	5'-VIC- ATGGCCAACT A GTCGTTT-3'	FAM-ATGGCCAACTAT TCGTTT-3'	8
6	5'-AGTCTCTCCTTCTCGCTT CCT-3'	5'- GTGTACGCGACGATATAATGAGG TT-3'	36	5'-VIC- TCCGCCTTTT CCTCGC-3'	5'-FAM-CCGCCTTTAC CTCGC-3'	8

Quadro 2. Identificação, posição dos SNPs em relação ao genoma padrão, genótipo, produção de mel da colônia (kg) (Fenótipo) e valor de P calculado pelo programa PLINK version 1.05 em relação à Fst dos SNPs dos dois grupos, APM (Alta Produção de Mel) e BPM (Baixa Produção de Mel).

Identificação	Posição	Genótipo	Produção de mel (kg)	P
SNP1	2.13:142778	A/A	2,35	9.021e-07
		A/G	-	
		G/G	11,6	
SNP2	3.8:2017582	T/T	1,48	7.738e-08
		T/G	-	
		G/G	11,6	
SNP3	4.8:31437	A/A	1,24	1.388e-06
		A/G	-	
		G/G	11,11	
SNP4	6.32:596697	A/A	2,3	7.489e-07
		A/G	-	
		G/G	11,6	
SNP5	8.9:944396	C/C	2,0	9.333e-08
		C/A	-	
		A/A	11,35	
SNP6	9.7:288959	A/A	2,3	7.178e-08
		A/T	-	
		T/T	11,51	

Quadro 3. Identificação do SNP, identificação do gene candidato para produção de mel, e função.

SNPs	Identificação do Gene	Função
SNP1	GB4383	Codificador de Proteína
	GB4382	---
	GB4385	---
SNP2	GB55742	---
	GB55854	Codificador de Proteína
	GB55855	Codificador de Proteína
SNP3	GB43802	Codificador de Proteína
SNP4	GB53526	---
	GB53527	Codificador de Proteína
	GB53571	Codificador de Proteína
SNP5	GB41784	Codificador de Proteína
	GB41881	Codificador de Proteína
SNP6	GB54002	---
	GB54003	---
	GB54011	---

--- genes sem descrição de suas funções em literatura.

Quadro 4. Identificação dos SNPs, genótipo, número de amostras positivas para o genótipo pertencentes ao grupo APM (Alta Produção de Mel) e BPM (Baixa Produção de Mel).

ID	Genótipo	Nº amostras positivas (BPM)	Nº amostras positivas (APM)	Valor de P (Teste Qui-quadrado)
SNP1	A/A	4	1	0,1955
	A/G	1	3	
	G/G	5	4	
SNP2	T/T	4	1	0,0339
	T/G	2	0	
	G/G	4	7	
SNP3	A/A	2	7	0,04427
	A/G	2	0	
	G/G	6	1	
SNP4	A/A	7	8	0,08968
	A/G	2	0	
	G/G	1	0	
SNP5	C/C	7	2	0,05778
	C/A	2	3	
	A/A	1	3	
SNP6	A/A	5	7	0,08968
	A/T	2	1	
	T/T	3	0	

QUADROS SUPLEMENTARES

Quadro Suplementar 1. SNPs associados à produção de mel. Cromossomo, Scaffold, posição e valor de P calculado pelo programa PLINK version 1.05 em relação à Fst dos SNPs dos dois grupos APM (Alta Produção de Mel) e BPM (Baixa Produção de Mel).

Cromossomo	Scaffold	Posição	P
3	8	2017582	6,93E-08
8	9	944396	1,14E-07
4	8	31437	1,52E-07
12	13	1399459	1,71E-07
17	5067	13412	5,37E-07
12	17	423821	6,89E-07
12	17	423822	6,89E-07
6	32	596697	9,45E-07
2	13	142778	9,45E-06
5	9	547247	1,12E-06
9	7	288960	1,17E-06
9	7	288959	1,17E-06
9	10	4268785	1,17E-06
4	8	38456	1,85E-07
1	1	950974	1,86E-07
1	40	106049	2,1E-06
1	40	106065	2,1E-06
3	8	238405	2,42E-06
4	5	1553642	3,53E-06
4	5	1553657	3,53E-06
4	13	1675138	3,53E-06
4	5	1553659	3,53E-06
4	5	1553666	3,53E-06
17	69	28355	3,77E-06
7	21	698771	4,17E-06
4	5	1543351	4,5E-06
11	16	535442	5,33E-06
11	1	345200	6,03E-06
17	91	0,59375	6,51E-06
10	23	462516	7,78E-06
10	23	462537	7,78E-06
14	9	402225	1E-05
8	2	145068	1,11E-05
2	15	233727	1,11E-05
1	29	515091	1,36E-05

15	19	1245452	1,58E-06
5	9	556283	1,75E-05
10	9	39191	2,49E-05
3	8	1940011	2,57E-05
4	5	1543346	2,68E-05
8	12	20249	3,26E-05
9	10	2225959	4,22E-05
12	13	1834482	4,88E-05
12	13	1834498	4,88E-05
7	7	84285	5,4E-05
11	14	276857	5,4E-05
1	30	19948	6,59E-05
8	7	94410	6,78E-05
6	38	197795	6,97E-05
13	7	2222655	7,26E-05
2	18	765418	7,66E-05
15	19	2953869	8,12E-05
10	27	58997	0,000122
10	27	58999	0,000122
1	21	666238	0,000124
3	12	186782	0,000124
8	7	198313	0,000134
1	29	1797849	0,000144
7	10	96703	0,000153
2	19	1664748	0,000162
2	19	1664749	0,000162
4	9	1826953	0,000162
4	9	1826949	0,000162
4	9	1826960	0,000162
5	13	307119	0,000172
7	21	607834	0,000178
11	1	1915933	0,000179
7	21	1384460	0,000186
9	10	2244201	0,0002
13	7	746796	0,000217
7	5	564856	0,000231
1	15	993062	0,00024
13	12	845307	0,000244
13	12	845304	0,000244
13	12	845303	0,000244
6	1	653924	0,000246
11	3	450681	0,000251
1	40	106075	0,000262
4	1	456365	0,000276
15	19	1548110	0,000281

2	15	569403	0,000281
9	10	3500918	0,000287
12	17	588152	0,000301
12	17	588151	0,000301
12	17	588153	0,000301
12	17	588150	0,000301
8	7	1920706	0,000302
13	10	161159	0,000312
6	23	362862	0,000314
10	26	387511	0,000317
9	10	4414965	0,000334
12	17	180270	0,000335
8	6	1515920	0,000352
13	7	584283	0,000357
14	5	206935	0,000359
7	21	600162	0,000359
9	5	262242	0,000361
5	20	530938	0,000363
2	19	2013724	0,000366
6	15	1119586	0,000372
6	38	197783	0,000374
3	8	2017620	0,000382
4	13	135768	0,000399
15	19	1503363	0,0004
7	21	1971111	0,000402
17	69	28279	0,00042
9	12	811455	0,000423
1	31	252803	0,000433
2	11	819542	0,000444
2	11	819596	0,000444
7	21	808034	0,000448
7	21	807965	0,000448
2	19	3614157	0,00045
13	5	452358	0,000451
14	14	196772	0,000455
5	14	86162	0,000461
13	10	636322	0,000468
17	3937	4071	0,000475
7	19	11647	0,000477
9	12	988997	0,000481
9	10	2312362	0,000484
10	26	1533731	0,000495
4	11	111748	0,000496

CAPITULO III

O artigo a seguir está redigido de acordo com as exigências para publicação
na revista Nature Scientific Data.

A Variant Reference Data Set for the Polyhybrid Africanized Honey Bee (*Apis mellifera*)

Authors

Samir M. Kadri*¹, Brock A. Harpur*², Ricardo O. Orsi¹, Amro Zayed²

Affiliations

1. Department of Animal Production, College of Medicine Veterinary and Animal Sciences, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, York University, Toronto, Canada.

* Authors contributed equally

Correspondence and requests for materials should be addressed to samirkbr@yahoo.com.br or harpur@gmail.com

Abstract: The Africanized honey bee (AHB), a hybrid honey bee and imported African bee escaped from a Brazilian research facility in 1956 and has become one of the most successful biological invasives to date. Populations can now be found Brazil to the central United States. AHBs are a major concern to the beekeeping industry as well as a model for the evolutionary genetics of nest defence and aggression. To date, there are no genomic tools available for this highly important polyhybrid group. Here, we have performed pooled-resequencing on 30 Brazilian AHB colonies (360 diploid workers) using Illumina Hi-Seq (150bp PE). This yielded a data set with an average coverage of 20.25 and 3,606,720 variant sites. We also identified functional 155,336 variant sites within 11,365 genes. This data set is the largest genomic resource available for AHB and fills a need for identifying the bees prior to importation (AIMs), genetics of adaptation post invasion, and the genetics of defensiveness.

1. Background & Summary

The Western honey bee (*Apis mellifera* ssp.) is not native to the New World; their introduction to North and South America dates to the early 18th century¹. New World honey bee populations originated from major populations found across Europe, Asia, and Africa^{2,3}. These ancestral population groups—the M and C lineages of Europe, the A lineage of Africa, and the Y and O lineages of Africa and Asia⁴⁻⁸—are based on geographic and genetic delineations. The lineages contain 22-24 honey bee subspecies with in a variety of phenotypes and with highly variable histories of use by beekeepers⁸.

Early North American beekeepers initially brought with them subspecies of the M lineage (*A. m. mellifera* and *A. m. iberica*)^{9,10}. During the 20th century C lineage (*A. m. ligustica* and *A. m. carnica*) and some O lineage (*A. m. caucasia*) subspecies were introduced to North America^{9,10}. It was during 19th century that Brazilian beekeepers first imported honey bees, chiefly *A. m. mellifera* and *A. m. carnica*, followed by *A. m. ligustica* and *A. m. caucasia*¹¹.

These subspecies were used exclusively in Brazil until 1956, when *A. m. scutellata* was introduced for breeding research. Several mated *A. m. scutellata* queens were imported from South Africa and one from Tanzania¹² to breeding stations in Rio Claro, São Paulo, Brazil. The intention of the breeding program was to crossbreed *A. m. scutellata* with *A. m. ligustica* to serve as a base population in a selection program to produce one breed with low defense behavior and high honey production (Kerr, 1957). Famously, swarms escaped from this breeding program and hybridized with the existing population¹³. These escaped *A. m. scutellata* queens are the cause of one of the most astounding insect invasion stories in recent history; the feral populations of “Africanized” hybrids that retained most of the unfavourable traits of their African

ancestors, are now the dominant genotype of honey bee in Brazil and occur from Northern Argentina to the Southern United States¹⁴.

Today, the Africanized honey bee presents a major challenge for North American Beekeepers and an opportunity for researchers. First, there are no sufficient tests to detect Africanization prior to importation, a challenge to beekeeping industries wanting to diversify their stocks^{15,16}. Second, Africanized bees represent some of the most defensive honey bees and allow for dissection of the physiology and genetics underpinning aggression¹⁷. Finally, Africanized bees are perhaps one of the most successful contemporary animal biological invaders, spreading within only a decade populations expanded and established over 2000 km¹⁴.

The sequencing of the honey bee genome in 2006¹⁸ was a landmark for the field of sociogenomics and has become increasingly important in management of honey bees^{15,16,19,20}. The initial honey bee sequence, however, was an admixed North American honey bee¹⁸. Here, we present the genomes of 360 Africanized honey bees from Brazil from 30 colonies and a reference variant database as a new resource for the scientific community, one we hope can be used for the detection of AHB across countries, and to foster a deeper understanding of the genetics of defensiveness and the genetics underpinning a successful biological invasion.

2.Methods

2.1.Sampling and Sample Information

We collected 12 worker bees from each of 30 Africanized honeybee colonies from four apiaries all located at Iaras city, São Paulo, Brazil (Table 1). These colonies originated within the State of São Paulo where the Africanized honey bee outbreak began and have been obtained from natural swarms, thus representing an average

sample of the surrounding population. We used Mag-Bind® Blood DNA kit (Omega Biotek Store) with the manufacturer's recommended protocol to extract an average of 4.71 ± 1.42 ug high-quality DNA from thorax tissue from each of the twelve bees per colony²¹.

DNA samples were submitted to The Centre for Applied Genomics (Toronto, ON) for library preparation and high throughput sequencing. In brief, DNA was quantified by Qubit HS assay and 200 ng of DNA was used as input material for the TruSeq Nano DNA Sample Preparation protocol (Illumina, Inc.) following Illumina's recommendation. DNA was sheared to 550-bp on average using a Covaris S2 system (Duty cycle: 10%; Intensity 2; Burst per second: 200; Treatment time: 44 seconds; Mode: Frequency sweeping). The sheared DNA was end-repaired and the 3' ends were adenylated prior to ligation of the TruSeq adapters. The library was enriched by PCR using different indexed adapters to allow for multiplex sequencing using the following conditions: 95°C for 3 minutes followed by 8 cycles of 98°C for 20 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 30 seconds, and finally an extension step at 72°C for 5 minutes.

Final TruSeq Nano DNA genomic libraries were validated on a Bioanalyzer 2100 DNA High Sensitivity chip (Agilent Technologies) for size and by qPCR using the Kapa Library Quantification Illumina/ABI Prism Kit protocol (KAPA Biosystems) for quantities. Ten libraries were pooled in equimolar quantities and sequenced on a HiSeq 2500 platform on a high throughput flowcell with the Illumina TruSeq V4 sequencing chemistry following Illumina's recommended protocol to generate paired-end reads of 150-bases in length.

2.2. Genome Alignment and Variant Calling

Each colony's sequenced reads were trimmed of Illumina Adaptors using Trimmomaticv0.32 then aligned using BWA aligner v0.7.5a-r405²². Paired alignments were then merged with SAMTOOLS v 0.1.19-44428cd²³ and re-aligned using STAMPY v1.0.21²⁴ with divergence (--d) set at 0.02 . We marked and removed duplicate reads with PICARD v 1.141 and re-aligned around indels using GATK IndelRealigner v 3.1-1-g07a4bf8²⁵.

To identify variants found within the Brazilian Africanized population, we used two, independent SNP callers (Figure 1): VARSCAN²⁶ v2.3.7 and GATK UnifiedGenotyper. (Dataset 1). We used GATK to identify the location of SNPs and were unconcerned with genotype calls. We called all sites in GATK and VARSCAN using default parameters but removed SNPs within 10 bp of indels, removed all unmapped scaffolds and mitochondrial sequence, and removed sites in the genome that were low quality or in areas of low genomic complexity, thus removing the potential for over-calling SNPs due to paralogous sequence or misaligned reads³ (Figure 1). We output variant sites that could only be called reliably in both SNP callers, above and for each site. Because our data consist of pooled sequence for 30 colonies, we report the allele frequency as called by VARSCAN (Data set 2). Finally, we manually inspected over 100Kb of sequence by eye. We identified the functional nature of variants within genes using SNPEFF v 3.6c²⁷ (Dataset 3).

2.3. Population Differentiation and Admixture

To quantify differentiation among contemporary Africanized populations in Brazil and ancestral honey bee populations, we used POPOOLATION2 v1.201²⁸. We created a single input file containing our Africanized bee samples pooled into a single alignment as well as population-pooled alignments from ancestral honey bee

populations from Africa (A lineage, N= 11) and Europe (M lineage, N = 9; C lineage N = 9). This sequence data was obtained from a recent honey bee population genomics study performed by our group³ and represents ancestral populations from which the Brazilian Africanized populations likely derived. We created from these files a single MPILEUP file for SNPs with at most 800 reads depth and a minimum Quality Score of 25 and extracted from it 3,606,720 sites we called within our Africanized honey bee samples, above. We estimated pairwise population differentiation on all sites with --min-count 6 --min-coverage 100 --max-coverage 800 --min-covered-fraction 0.8.

3.Code availability

Deposited on DataDryad and GitHub

4.Data Records

We have made a list of 3606720 sequence variants identified in 360 Africanized honey bees across 30 colonies available for use (Data Citation 1:). The data consist of high-quality variants sequenced called across the most recent honey bee reference genome (AMEL v4.5²⁹) on placed scaffolds (n=283 total with variant sites) in Variant Call File format. Because we utilized a pooled-sequencing method, all variant sites include the frequency of each reference and alternate allele call for each colony. We have also included, for each variant site within genes (155,336 sites within 11,365 genes) in text formats called against all protein-coding genes within the latest honey bee reference gene set, (Data Citation 2:) ²⁹.

5. Technical Validation

To validate that our samples are indeed Africanized and our variant calls we compared our current SNP calls to those of a previous population genomics study with honey bees³. Africanized bees are known to be derived from at least three of the major honey bee population groups: A, M, and C^{7,16}. We found that of our 3,606,720 variant sites, 3600602 (99.8%) can be found within the variant sets of these three populations.

Further, Africanized populations are expected to have high A lineage ancestry relative to C and M lineage ancestry^{7,16}. We demonstrated that allele frequencies within Africanized bees are highly correlated with A lineage ancestry (GLM; $r = 0.529$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$) relative to both M lineage ($r = 0.102$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$) and C lineage alleles ($r = -0.08$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$; Figure 1). Levels of population differentiation corroborated this result: F_{st} was highest between AHB and C-lineage populations and lower between AHB and A-lineage populations (Figure 1)

6. Acknowledgements

The authors would like to thank the continued support from Israel dos Santos, for providing samples and discussion on the topic of AHB in Brazil. This study was funded by a Discovery Grant from NSERC and an Early Researcher Award from the Ontario Ministry of Research and Innovation (to AZ). BAH was supported by an Elia Scholarship from York University and a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Alexander Graham Bell CGS. SMK was supported by a scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Process 2014/10150-2).

7. Author contributions

SMK and BAH contributed equally to this manuscript. SMK Collected Samples, BAH and SMK created the database, BAH, SMK, AZ, and ROO wrote the manuscript.

8. Competing interests

The authors declare no competing interests.

Figures

Figure 1. Overview of alignment and SNP calling pipeline

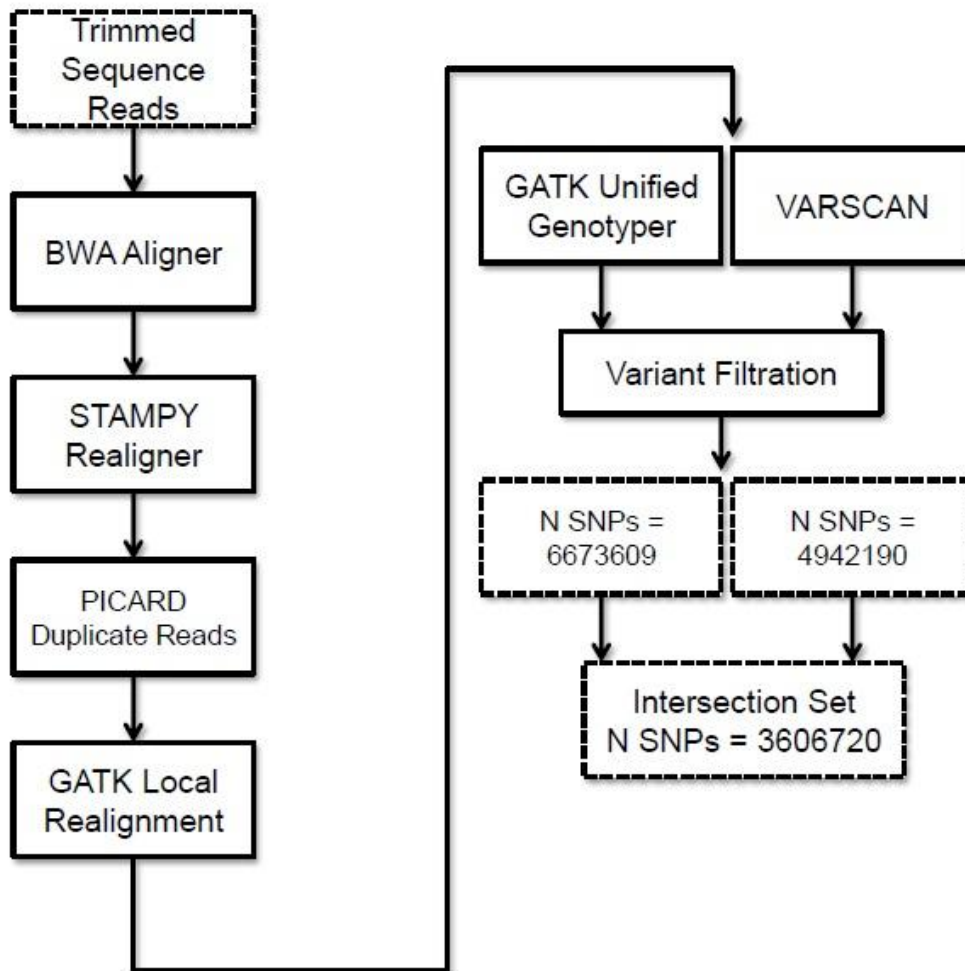
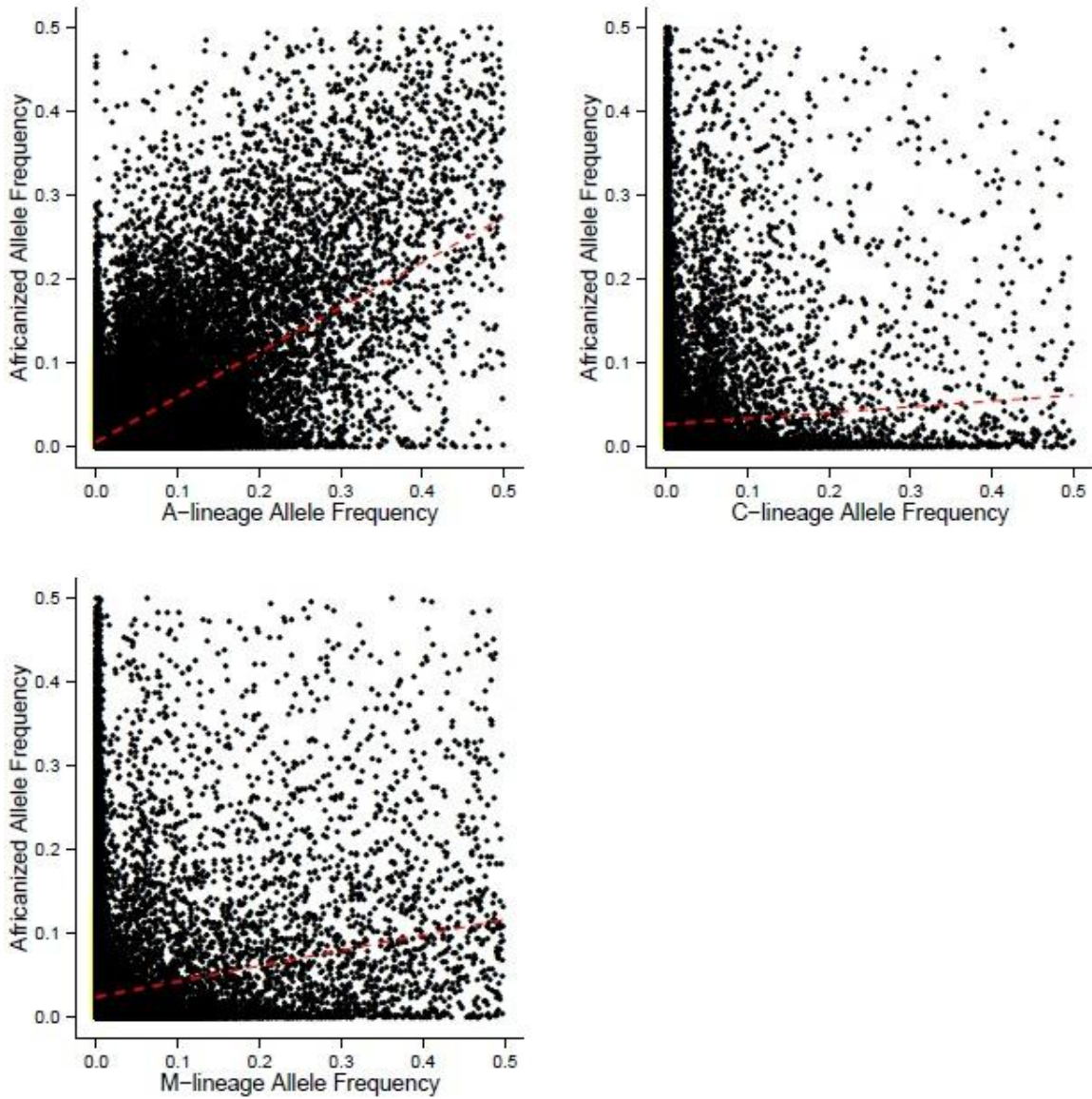


Figure 2. Correlation of allele frequency between Africanized and A) A-lineage B) C-lineage and C) M-lineage alleles. Africanized bees are expected to have allelic variation more highly correlated to A-lineage than other lineages. Red line shows results of linear model fit (GLM, $F_{3,78904} = 15470$, $p < 2.2 \times 10^{-16}$).



Tables

Table 1: Sample Sequencing and Accession information

Sample ID	Accession No.	Average Sequencing Depth	Location
HDB139		29.00	22° 86' 59'' S; 49° 15' 19'' W
HDB179		29.01	22° 82' 69'' S; 49° 16' 38'' W
HDB199		11.67	22° 86' 59'' S; 49° 15' 19'' W
HDB303		12.53	22° 89' 83'' S; 49° 17' 31'' W
HDB175		21.95	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
HDB302		23.25	22° 82' 69'' S; 49° 16' 38'' W
HDB187		21.09	22° 86' 59'' S; 49° 15' 19'' W
HDB191		33.12	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
HDB189		25.23	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
HDB288		13.74	22° 89' 83'' S; 49° 17' 31'' W
HDB195		20.51	22° 82' 69'' S; 49° 16' 38'' W
HDB148		25.31	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
HDB150		24.98	22° 86' 59'' S; 49° 15' 19'' W
HDB183		6.82	22° 89' 83'' S; 49° 17' 31'' W
HDB30-S		16.55	22° 82' 69'' S; 49° 16' 38'' W
LDB6		18.04	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
LDB127		18.68	22° 86' 59'' S; 49° 15' 19'' W
LDB136		18.81	22° 89' 83'' S; 49° 17' 31'' W
LDB29		17.73	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
LDB162		23.04	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
LDB9		21.99	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
LDB153		19.96	22° 86' 59'' S; 49° 15' 19'' W
LDB8		15.48	22° 89' 83'' S; 49° 17' 31'' W
LDB23-S		30.04	22° 82' 69'' S; 49° 16' 38'' W
LDB181		25.04	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
LDB35-S		18.42	22° 89' 83'' S; 49° 17' 31'' W
LDB40-S		21.15	22° 90' 04'' S; 49° 17' 26'' W
LDB196		17.18	22° 82' 69'' S; 49° 16' 38'' W
LDB5		12.11	22° 89' 83'' S; 49° 17' 31'' W
LDB221		13.64	22° 82' 69'' S; 49° 16' 38'' W

9. References

- 1 Tarpy, D. R., Delaney, D. A. & Seeley, T. D. Mating frequencies of honey bee queens (*Apis mellifera* L.) in a population of feral colonies in the Northeastern United States. *Plos One***10**, e0118734, doi:10.1371/journal.pone.0118734 (2015).
- 2 Wallberg, A. *et al.* A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nat Genet***46**, 1081-1088 (2014).
- 3 Harpur, B. A. *et al.* Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits. *P Natl Acad Sci USA***111**, 2614-2619, doi:10.1073/pnas.1315506111 (2014).
- 4 Ruttner, F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees.* (1988).
- 5 Garnery, L., Cornuet, J. M. & Solignac, M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol Ecol***1**, 145-154 (1992).
- 6 Arias, M. C. & Sheppard, W. S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular phylogenetics and evolution***5**, 557-566, doi:10.1006/mpev.1996.0050 (1996).
- 7 Whitfield, C. W. *et al.* Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science***314**, 642-645, doi:10.1126/science.1132772 (2006).
- 8 Ruttner, F. *Biogeography and taxonomy of honeybees.* (Springer-Verlag, 1988).
- 9 Sheppard, W. S. A History of the Introduction of Honey Bee Races into the United-States .2. *Am Bee J***129**, 664-667 (1989).
- 10 Sheppard, W. S. A History of the Introduction of Honey Bee Races into the United-States .1. *Am Bee J***129**, 617-619 (1989).
- 11 Crane, E. *The world history of beekeeping and honey hunting.* (Routledge, 1999).
- 12 Nogueira-Neto, P. The spread of a fierce African bee in Brazil. *Bee World***45**, 119-121 (1964).
- 13 Winston, M. L. *The biology of the honey bee.* (Harvard University Press, 1987).
- 14 Winston, M. L. *Killer bees : the Africanized honey bee in the Americas.* (Harvard University Press, 1992).
- 15 Chapman, N. C. *et al.* A SNP test to identify Africanized honeybees via proportion of "African" ancestry. *Mol Ecol Resour***15**, 1346-1355, doi:10.1111/1755-0998.12411 (2015).
- 16 Harpur, B. A. *et al.* Assessing patterns of admixture and ancestry in Canadian honey bees. *Insect Soc***62**, 479-489, doi:10.1007/s00040-015-0427-1 (2015).
- 17 Chandrasekaran, S. *et al.* Aggression is associated with aerobic glycolysis in the honey bee brain(1). *Genes, brain, and behavior***14**, 158-166, doi:10.1111/gbb.12201 (2015).
- 18 Weinstock, G. M. *et al.* Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature***443**, 931-949, doi:10.1038/nature05260 (2006).
- 19 Harpur, B. A., Minaei, S., Kent, C. F. & Zayed, A. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Mol Ecol***21**, 4414-4421, doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05614.x (2012).

- 20 Munoz, I. *et al.* Reduced SNP panels for genetic identification and introgression analysis in the dark honey bee (*Apis mellifera mellifera*). *Plos One***10**, e0124365, doi:10.1371/journal.pone.0124365 (2015).
- 21 Ferretti, L., Ramos-Onsins, S. E. & Perez-Enciso, M. Population genomics from pool sequencing. *Mol Ecol***22**, 5561-5576, doi:10.1111/mec.12522 (2013).
- 22 Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics***26**, 589-595, doi:10.1093/bioinformatics/btp698 (2010).
- 23 Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics***25**, 2078-2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352 (2009).
- 24 Lunter, G. & Goodson, M. Stampy: a statistical algorithm for sensitive and fast mapping of Illumina sequence reads. *Genome Res***21**, 936-939, doi:10.1101/gr.111120.110 (2011).
- 25 DePristo, M. A. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet***43**, 491-+, doi:10.1038/ng.806 (2011).
- 26 Koboldt, D. C. *et al.* VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics***25**, 2283-2285, doi:10.1093/bioinformatics/btp373 (2009).
- 27 Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w(1118); iso-2; iso-3. *Fly***6**, 80-92, doi:10.4161/fly.19695 (2012).
- 28 Kofler, R., Pandey, R. V. & Schlotterer, C. PoPoolation2: identifying differentiation between populations using sequencing of pooled DNA samples (Pool-Seq). *Bioinformatics***27**, 3435-3436, doi:10.1093/bioinformatics/btr589 (2011).
- 29 Munoz-Torres, M. C. *et al.* Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic Acids Res***39**, D658-D662, doi:10.1093/nar/gkq1145 (2011).

CAPITULO IV

IMPLICAÇÕES

O mel é o produto apícola mais produzido nacional e mundialmente; neste sentido; é necessário que se desenvolvam estudos de programas de melhoramento genético, visando aumento da produtividade dos híbridos africanizados “nascido” em território nacional. Atualmente, a maioria dos apicultores não utiliza técnicas de melhoramento genético em seus apiários, o que pode ocasionar diminuição na produção de mel e aumento de características indesejáveis, como a alta defensividade, devido a variabilidade genética dos enxames encontrados.

Pelo fato de não existirem estudos sobre técnicas moleculares para programas de melhoramento genético para produção de mel, procurou-se neste trabalho conciliar técnicas moleculares a programas de seleção genética de enxames de abelhas *A. mellifera* africanizadas por meio da associação com polimorfismo em um único par de bases (SNP) em DNA genômico.

A seleção de Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) pela técnica de *ddRADseq* demonstra ser uma ferramenta para seleção de populações de abelhas *Apis mellifera* africanizada.

Devido às técnicas de sequenciamento de nova geração, a compreensão do genoma total de organismos é atualmente viabilizada. Sequenciamos e descrevemos o genoma total das abelhas *A. mellifera* africanizadas pela primeira vez, fato que terá implicação na área acadêmica e futuramente sociedade, em trabalhos de estudos populacionais, sociogenômicos, de seleção para características econômicas (produção de mel, pólen, geleia real, própolis, cera), dentre outros.

A descrição do genoma de abelhas africanizadas terá grande implicação, pois atualmente estudos de associação genéticas a SNPs em abelhas *A. mellifera* estão sendo desenvolvido em relação ao genoma descrito em 2006 de uma linhagem de abelhas norte americana composta de algumas sub-linhagens europeias. Desta forma, este genoma padrão possui alelos específicos para a linhagem sequenciada o que

dificulta estudos de associação fenotípica em abelhas de outras populações, uma vez que é baseado em polimorfismos que são herdados entre as populações.

Espera-se que este trabalho possa contribuir para a cadeia apícola nacional e internacional. Entretanto, sugerem-se novos estudos para verificar a viabilidade dos marcadores selecionados em populações de abelhas *A. mellifera* africanizadas encontradas nas Américas.