



Viabilidade espermática como estratégia de monitoramento de qualidade de rainhas *Apis mellifera* africanizadas

Sperm viability as a quality monitoring strategy for Africanized Apis mellifera queens

Eduardo Augusto Antunes Vieira*, Fabiana Martins Costa Maia†

Rúbia Santana Andrade‡, Vitória Alves Pereira§, Fernanda Raulino-Domanski[¶], Marciani Balbinotti

França[±], Luciane Xavier Ferreira[∫], Victor Gabriel de Faria Pastre[£], Flávia Regina de Oliveira

Barros[¶], Michele Potrich[¥], Frederico Márcio Corrêa Vieira[€]

RESUMO

Abelhas rainhas (*Apis mellifera* L.) acasalam em um curto período no início de suas vidas. Após a cópula, os espermatozoides serão armazenados em um órgão especializado: a espermateca. O objetivo deste estudo é buscar responder se a origem da rainha pode influenciar a viabilidade espermática. As espermatecas de cinquenta rainhas jovens, acasaladas naturalmente e originadas de dois apiários distintos foram dissecionadas, e o conteúdo espermático armazenado foi avaliado quanto à concentração e motilidade. Conclui-se que apesar das origens distintas, os espermatozoides apresentam em média padrões de viabilidade semelhantes, considerados limítrofes no que diz respeito à qualidade reprodutiva de rainhas.

Palavras-chave: Motilidade espermática, Concentração espermática, Abelha rainha, Espermateca

ABSTRACT

Honey bee queens (*Apis mellifera* L.) mate for a short period early in their lives. After copulation, sperm will be stored in a specialized organ: the spermatheca. The aim of the study is to answer whether the queen origin can lead to sperm viability. The spermatheca from fifty young queens, naturally mated and originating from two different apiaries were dissected, and the stored sperm content was evaluated for concentration and motility. We have concluded that despite the distinct origins, sperm have, on average, patterns of viability, considered borderline with regard to the reproductive quality of the honey bee queens.

Keywords: Sperm Motility, Sperm Concentration, Honey bee queen, Spermatheca

* Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; evieira@alunos.utfpr.edu.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; fabianamcosta@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; rubiaandrade@alunos.utfpr.edu.br

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; vitoriaalvesper@gmail.com

¶ Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil; fernanda_raulino@live.com

± Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; marciani@alunos.utfpr.edu.br

∫ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; luciane.1999@alunos.utfpr.edu.br

£ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; victorpastre@alunos.utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; flaviabarros@utfpr.edu.br

¥ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; michelepotrich@utfpr.edu.br

€ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; fredericovieira@utfpr.edu.br



1 INTRODUÇÃO

A rainha tem como principal função na colônia a reprodução, com potencial de manter, desenvolver a população e gerar produtividade (DODOLOGLU; GENE, 2003). Por volta dos primeiros seis dias de vida a rainha realiza o voo nupcial, quando ocorre a cópula com sete a dezessete zangões, então retorna à colônia com aproximadamente 10-20 μL de sêmen (em torno de 100 milhões de espermatozoides) alojados em seus ovidutos (WOYKE, 1962).

O estoque de espermatozoides da espermateca está diretamente relacionado a capacidade e qualidade reprodutiva da rainha. Segundo estudos realizados por Woyke (1962), foi sugerido que uma rainha deve possuir no mínimo 3 milhões de espermatozoides armazenados para ter qualidade reprodutiva. Estudos recentes têm indicado que um dos possíveis fatores relacionados a redução na população de abelhas se deve a casos recorrentes de falhas de rainhas, onde a baixa viabilidade espermática tem sido associada ao fato (MCAFEE et al., 2020a; 2020b; MCAFEE; TARP; FOSTER, 2021). Anteriormente, Pettis et al. (2016) já haviam encontrado essa relação quando compararam o conteúdo de espermatecas de rainhas decolônias produtivas *versus* não produtivas.

De acordo com o exposto, a viabilidade espermática pode ser um parâmetro interessante para estudos sobre qualidade de rainhas, sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o conteúdo das espermatecas de rainhas africanizadas de origens diferentes quanto à concentração e motilidade.

2 MÉTODO

O projeto foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV), entre novembro de 2020 a maio de 2021. Foram analisadas 83 espermatecas de abelhas rainhas africanizadas *Apis mellifera* L. jovens acasaladas naturalmente, originadas em dois apiários distintos.

As rainhas foram alojadas em gaiolas tipo JZsBZs®, junto com 10 abelhas operárias e alimento cãndi e em seguida encaminhadas para a UTFPR-DV. À chegada para parametrizar o tempo de espera para a dissecação e armazenamento da espermateca em condições adequadas, foi realizado um sorteio que determinou a sequência da dissecação e pesagem. A dissecação para obtenção das espermatecas foi realizada sob Microscópio Estereoscópio (DI-224, Piracicaba, São Paulo - Brasil). O tórax e o abdome, foram fixados dorsalmente com alfinetes entomológicos, em uma placa de Petri contendo cera de abelha em forma sólida; a dissecação do abdômen foi realizada a partir da inserção da tesoura na porção terminal, seguindo em direção ao tórax e com o auxílio de uma pinça (tipo relojoeiro 12cmreta) a região ventral do exoesqueleto foi removida, expondo os órgãos internos e a espermateca.

Cada espermateca foi transferida para eppendorfs contendo 250 μl de solução de Ringer (KAFTANOGLU; PENG, 1984) a 36 °C e transportada para o Laboratório de Reprodução Animal/ UTFPR-DV para processamento e análise. O processo para a coleta dos espermatozoides ocorreu a partir da ruptura da membrana epitelial da espermateca com tesoura Castroviejo curva. O processo de lavagem da espermateca foi realizado com solução Ringer, ajustado para a obtenção de 1mL de solução de sêmen. Essa mistura foi homogeneizada gentilmente por inversões do micro-tubo.

A concentração espermática foi verificada utilizando o protocolo descrito por Collins e Donoghue (1999), modificado por Rousseau; Fournier; Giovenazzo (2015), utilizando a câmara hematimétrica de Neubauer. As células espermáticas foram contadas em 5 quadrados (0.1 mm³ = 0.1 μL , cada), presentes nos quatro cantos e no centro do hemocitômetro, sendo a contagem repetida duas vezes em microscópio óptico de luz, utilizando aumento de 400x. Para o cálculo do total de espermatozoides foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Total de células} = \frac{[(\text{Contagem 1} * 5 * 10 * 1000) + (\text{Contagem 2} * 5 * 10 * 1000)]}{2}$$



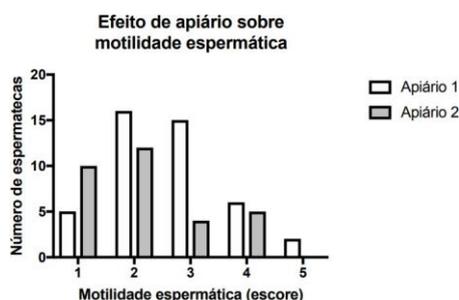
A visualização do total de células foi realizada com base no método de coloração fluorescente dupla descrito por Locke et al. (1990), modificado por Wegener et al. (2012), onde 2µL de 1mg/mL de iodeto de propídeo (Invitrogen) em Ringer e 1µL de 0,5mg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen H1399) em Ringer foram adicionados a 100µL da suspensão de espermatozoides em solução Ringer a 36 °C. Após incubação a 36 °C no escuro por 20 minutos, uma amostra homogênea de 15µL foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de fluorescência em um aumento de 400x. Para o cálculo da porcentagem de células mortas foram contadas pelo menos 200 células por amostra a partir de imagens processadas pelo software FIJI (SCHINDELIN et al., 2012).

Os dados de concentração e motilidade espermática foram transformados quando não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste Brown-Forsythe), e então submetidos à ANOVA. O efeito da origem das rainhas foi testado sobre os parâmetros qualitativos do sêmen. Para comparação das médias entre grupos foi utilizado o teste de Tukey com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando o software Prism Graphpad for Mac OS (2021).

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho não evidenciaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os apiários em relação a característica motilidade espermática. Contudo, é possível verificar (Figura 1) que para ambos os locais, que uma maior proporção dos espermatozoides se encontra com escore entre um e quatro para motilidade. Segundo a classificação do escore proposto por Queiroz (2003), os espermatozoides em nosso trabalho apresentaram de maneira geral, movimento lento (2), seguido por motilidade intermediária (3) e exclusivamente oscilatório (1).

Figura 1 - Comparação da motilidade de espermatozoides, armazenados em espermatecas de rainhas, para dois apiários comerciais. Taxa de motilidade é mostrada no eixo x, onde os scores representam respectivamente: 1- Exclusivamente oscilatório, 2- Lento, 3- Intermediário, 4- Progressivo retilíneo rápido e 5- Progressivo retilíneo muito rápido.



Fonte: Autoria própria (2021)

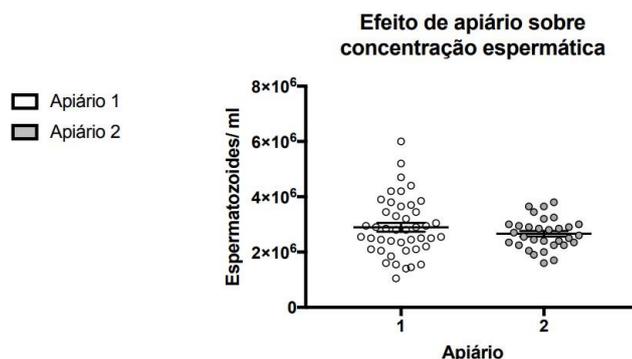
A motilidade é a capacidade de movimento e sua taxa é um critério que está relacionado com a viabilidade espermática, já que essa característica é fundamentalmente necessária para que os espermatozoides alcancem a espermateca da rainha após a cópula e no momento da fecundação (GRANEMANN, 2006; BORTOLOZZO et al., 2008; WEGENER et al., 2012).

Contudo, estudos realizados por Locker e Peng (1993) demonstraram que a motilidade espermática tende a reduzir ao longo do tempo de armazenamento apresentando médias que variam de 3,05 a 2,34 entre uma e seis semanas. Kaftanoglu e Peng (2015) testando a utilização de diferentes diluentes para a criopreservação de sêmen de zangões observaram taxas de motilidade que variaram entre 2,5 a 4,5, entretanto a maioria dos diluentes testados apresentaram espermatozoides com maior taxa de motilidade que o presente trabalho.



A concentração espermática trata-se de um parâmetro complementar à motilidade, pois indica a quantidade de espermatozoides presentes dentro da espermateca, e essa pode, assim como a motilidade, ser influenciada por diversos fatores externos, tais como quantidade de zangões utilizados para a cópula, a idade dos zangões e a estação do ano em que ocorreu o voo nupcial (RHODES, 2011). Em nosso trabalho, não encontramos diferença na concentração de espermatozoides ($p>0,05$) entre apiários (origens) distintos (Figura 2).

Figura 2 - Comparação entre a concentração espermática em rainhas produzidas em dois apiários comerciais.



Fonte: Autoria própria (2021).

A concentração espermática média foi de 3×10^6 espermatozoides/ml (Figura 2), valor esse considerado o mínimo (WOYKE, 1962) para que uma rainha tenha qualidade reprodutiva. Os apicultores brasileiros normalmente adquirem poucas rainhas de apiários comerciais ao ano (Informação verbal)¹, e ao observarmos a dispersão da Figura 2 dentro e entre as duas origens, boa parte das rainhas estão abaixo do mínimo desejado. Visto a importância desse parâmetro para o bom desempenho das rainhas e conseqüentemente da produtividade da colônia (PETTIS et al., 2016) seria interessante buscar a padronização do processo de fecundação natural, mesmo sabendo que o mesmo tem grande influência ambiental (KOENIGER et al., 2005).

4 CONCLUSÃO

Rainhas de origens diferentes tem viabilidade espermática similar e limítrofe quanto aos padrões de qualidade reprodutiva.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Brasil e Grupo de pesquisa em abelhas da UTFPR-DV por todo apoio recebido.

¹ Informação cedida por empresários da área de comercialização de rainhas, em 23 de novembro de 2020.

REFERÊNCIAS

BORTOLOZZO, F. P.; GOLDBERG, A. M. G.; WENTZ, I. Até onde é possível reduzir o número de espermatozoides empregados na inseminação artificial intra-cervical em suínos sem comprometer a fertilidade. *Acta*



scientiae veterinariae. Porto Alegre, 2008.

COLLINS, A. M. Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination. **Invertebrate reproduction & development**, v. 45, n. 3, p. 231-237, 2004a.

COLLINS, A. M.; DONOGHUE, A. M. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. **Theriogenology**, n. 99, 1999.

DELANEY, D. A.; KELLER, J. J.; CAREN, J. R.; TARPY, D. R. The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 42, n. 1, p. 1-13, 2011.

DODOLOGLU, A.; GENE, F. Comparison of Some Features of Queens Reared from Different Honeybee (*Apis mellifera* L.) Genotypes. **Journal of Applied Animal Research**, v. 24, n. 1, p. 105–109, 2003.

GRANEMANN, L. C. Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2006.

KAFTANOGLU, O.; PENG, Y. S. Preservation of honeybee spermatozoa in Liquid Nitrogen. **Journal of Apicultural Research**, v. 23, n. 3, p. 157-163, 1984.

MCAFEE, A.; CHAPMAN, A.; HIGO, H.; et al. Vulnerability of honey bee queens to heat-induced loss of fertility. **Nature Sustainability**, v. 3, n. 5, p. 367-376, 2020b.

MCAFEE, A.; MILONE, J.; CHAPMAN, A.; et al. Candidate stress biomarkers for queen failure diagnostics. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2020a.

MCAFEE, A.; TARPY, D. R.; FOSTER, L. J. Queen honey bees exhibit variable resilience to temperature stress. **PLoS ONE**, v. 16, n. 8 August, 1 ago. 2021.

PETTIS, J. S.; RICE, N.; JOSELOW, K.; VAN ENGELSDORP, D.; CHAIMANEE, V. Colony failure linked to low sperm viability in honey bee (*Apis mellifera*) queens and an exploration of potential causative factors. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1-10, 2016.

QUEIROZ, V. S. Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jagatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides. **Master of Science**, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2003.

RHODES, J. W. Quality of commercially reared queen and drone honey bees (*Apis mellifera* L.) in eastern Australia. 2011.

RHODES, J. W. Semen production in drone honeybees. **Rural Industries Research and Development Corporation**, v. 130, n. 08, p. 80, 2008.

ROUSSEAU, A.; FOURNIER, V.; GIOVENAZZO, P. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. **Canadian Entomologist**, v. 147, n. 6, p. 702-711, 2015.

ROUSSEAU, A.; HOULE, É.; GIOVENAZZO, P. Effect of shipping boxes, attendant bees, and temperature on honey bee queen sperm quality (*Apis mellifera*). **Apidologie**, p. 2010-2018, 2020.

ROUSSEAU, A.; P. GIOVENAZZO. Optimizing drone fertility with spring nutritional supplements to honeybee (Hymenoptera: Apidae) colonies. **J. Econ. Entomol.** 109: 1009–1014. 2016.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-682, 2012.

TARPY, D. R.; OLIVAREZ, R. Measuring sperm viability over time in honey bee queens to determine patterns in stored-sperm and queen longevity. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 4, p. 493-495, 2014.

WOYKE, J. Natural and Artificial Insemination of Queen Honeybees. **Bee World**, v. 43, n. 1, p. 21–25, 1962.

WEGENER, J.; MAY, T.; KNOLLMANN, U.; KAMP, G.; MULLER, K.; BIENEFELD, K. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. **Cryobiology**, 65, 126–131, 2012. KAFTANOGLU, O.; PENG, Y. S. Preservation of honeybee spermatozoa in Liquid Nitrogen. **Journal of Apicultural Research**, v. 23, n. 3, p. 157–163, 1984.

LOCKE, S. J.; PENG, Y. S. The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). **Physiological Entomology**, v. 18, n. 2, p. 144–148, 1993.