



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL
MESTRADO EM PRODUÇÃO ANIMAL

LUCAS DA SILVA MORAIS

**Avaliação dos parâmetros espermáticos de zangões de abelhas
africanizadas *Apis mellifera* L. no semiárido nordestino do Brasil**

MOSSORÓ
2019

LUCAS DA SILVA MORAIS

Avaliação dos parâmetros espermáticos de zangões de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. no semiárido nordestino do Brasil

Dissertação submetida à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência para obtenção do título de mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Dejair Message
Co-orientadora: Profa. Dra. Katia Peres Gramacho

Linha de Pesquisa: Produção de não ruminantes.

Área de atuação: Apicultura

MOSSORÓ

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M827a Morais, Lucas da Silva.
Avaliação dos parâmetros espermáticos de zangões
de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. no
semiárido nordestino do Brasil / Lucas da Silva
Morais. - 2019.
54 f. : il.

Orientador: Dejair Message.
Coorientador: Katia Peres Gramacho.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Produção Animal, 2019.

1. Motilidade espermática. 2. Viabilidade
espermática. 3. Concentração espermática. 4.
Morfologia espermática. I. Message, Dejair,
orient. II. Gramacho, Katia Peres, co-orient.
III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LUCAS DA SILVA MORAIS

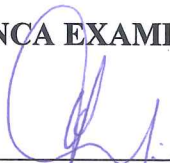
**Avaliação dos parâmetros espermáticos de zangões de abelhas
africanizadas *Apis mellifera* L. no semiárido do Brasil**

Dissertação submetida à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência para obtenção do título de mestre em Produção Animal.

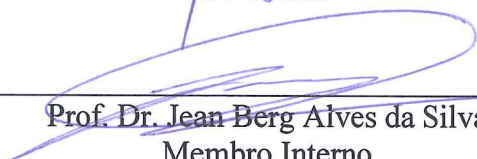
Linha de Pesquisa: Produção de não ruminantes.

Defendida em: 27 / 02 / 2019.

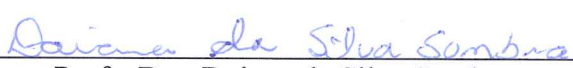
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Dejáir Message (UFERSA)
Presidente



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva
Membro Interno



Profa. Dra. Daiana da Silva Sombra
Membro Externo

DEDICO

Ao meu tio Adilson Rodrigues (*In Memoriam*) e minha querida tia Maria Acácia da Silva Rodrigues.

Aos meus avós, Roberto Moraes, Maria Adelaide Moraes, Maria Auxiliadora – “Dora” e Valmir (*In Memoriam*).

Aos meus pais, Ricardo Moraes e Marylin Menezes.

A minha mãe científica e grande amiga Kátia Peres Gramacho.

Aos meus irmãos, Kênia, Kramer, Letícia, João, Roberta e Ricardo.

Aos meus tios, tias, primos e amigos que torceram por mim.

OFEREÇO

Primeiramente a mim e a todos que torceram e colaboraram para realizaço deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **meu orientador Prof. Dr. Dejair Message**, por abraçar minha causa. Por acreditar em mim, pela confiança, orientação e paciência. Obrigado por tudo !!!.

Agradeço de coração a **minha Co-orientadora Profa. Dra. Katia Gramacho**, não consigo chama-la de profa., Katinha, pois hoje já considero parte da minha família, minha mãe científica, obrigado por tudo!!!. E obviamente a Carrapicha (Sarah Gramacho), amo vocês.

Aos **meus tios** Adilson Rodrigues (*In memoriam*) e especialmente **minha tia Maria Acácia**, minha segunda mãe, me educou e lutou para que eu alcançasse meus objetivos, te amo.

A **minha mãe** Marylin (Ninha), mulher guerreira, incrível, a melhor cozinheira que conheço (Dôra não fique com ciúmes, seu doce de leite é o melhor rsrs), te amo muito. **Ao meu pai** Ricardo, por todo apoio e confiança. Amo vocês.

Aos **meus avós** Roberto Moraes, Adelaide Moraes, Auxiliadora (Dôra) e Valmir (*In memoriam*), por todo o apoio, carinho, amo vocês. E claro a minha querida Bisavó Bere, pelas nossas conversas e risadas.

Aos **meus irmãos**, Kênia, Kramer, Leticia, João, Roberta e Ricardo, obrigado por tudo, amo vocês.

A **Flávia**, minha companheira, que sempre me deu força, conselhos e por está ao meu lado. Muito obrigado por tudo !!.

A **toda minha família**, que estiveram presentes em minha trajetória. Aos meus primos, em especial Daniela Rodrigues, Felipe (Gordo), Tereza (Teka), Adelaidinha e Cindy por todas as resenhas!!!. Ao meu querido tio Carlos Roberto (Beto) que contribuiu com todo apoio e ensinamentos e sempre mostrou curiosidade em aprender sobre as abelhas !!. A todas as tias e tios, especialmente Keyse, Adelaide (Adinha), Jaqueline(Keke), Valdete, Luiza e Marina.

Aos meus **amigos do CSB**, Durval, Gabriel e Edgar, impossível descrever qualidades para vocês, mas posso garantir que são as melhores pessoas que conheci obrigado por tudo!!.

A todos os **inquilinos e agregados do Residencial Genésio II**, Heloisa, Itallo, Raul, Leticia, Victoria, Igor, Jesaias, Mateus, Ramon, Kaynara muito obrigado pelo carinho de vocês. Em especial ao grande Arthur, você é um cara 10.!!

As pessoas que me ajudaram ao longo desses dois anos, em especial a Dona Delma, Ana, Rodolfo, Jeu, Gleide, Caca, André e Carlinhos pelo carinho e apoio e Jonatan por todo auxílio e colaboração. Aos amigos Riquin, Teteu Castro, Rodrigo, João Victor, Paulo Sérgio, André Mota, Vinícius, Eduardo Burle, Janaina, Felipe Mendes e aos demais que aqui não foram citados, meu muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Lionel Gonçalves**, por sua confiança e pela grande contribuição científica através dos seus ensinamentos e por compartilhar toda sua vivência de mundo e de vida. Muito obrigado!.

A **todos os abelhudos**, especialmente Dai, Ricardo, Felipe, Leo, Débora, Josi e Hérica, pela amizade, colaboração e apoio.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Rodrigues**, por sua parceria e ter acreditado no potencial das abelhas.

A **equipe do Laboratório de Conservação e Germoplasma Animal (LCGA)**, em especial a Andréia, a pessoa fundamental para realização deste trabalho. Muito obrigado.

*“Tu te tornas eternamente
responsável por aquilo que cativas”.*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O presente estudo tem por objetivo caracterizar os espermatozoides de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no semiárido, produzidos no período de safra e entressafra. Os zangões foram obtidos durante o período de safra nos meses de março a junho de 2018 e de entressafra nos meses de outubro e dezembro de 2018 na Estação Experimental da UFERSA. Os zangões foram considerados maduros quando apresentaram eversão completa e presença de sêmen na ponta do endófalo. A coleta do sêmen foi feita pela técnica de eversão manual do pênis. Foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: motilidade, integridade da membrana, concentração e morfologia. Observou-se que os zangões de abelhas africanizadas avaliados no período de safra apresentaram uma motilidade média de $85,6 \pm 8,1\%$, uma viabilidade de $80,2 \pm 10,0\%$ e uma concentração de $3,8 \pm 1,2 \times 10^6$ espermatozoides. Já os avaliados na entressafra apresentaram uma motilidade média de $52 \pm 21,2\%$, uma viabilidade de $70,9 \pm 12,8\%$ e uma concentração de $3 \pm 1,1 \times 10^6$ espermatozoides. Os espermatozoides avaliados na safra apresentaram mais anormalidades em sua morfologia, tendo um percentual médio de espermatozoides com cauda enrolada de 64,9%, cauda quebrada 3,6% e cauda dupla 1,1% em relação aos avaliados na entressafra que tiveram um percentual médio de espermatozoides com cauda enrolada de 60,7%, cauda quebrada 2% e cauda dupla 1,1%. O período de coletado dos espermatozoides influencia em suas características espermáticas. Os espermatozoides avaliados no período de safra apresentaram motilidade, viabilidade e concentração superiores aos espermatozoides avaliados na entressafra. No entanto, em relação à morfologia, os espermatozoides de safra, apresentaram mais defeitos morfológicos, sendo cauda enrolada o principal, quando comparados com os avaliados na entressafra.

Palavras-chave: Motilidade espermática. Viabilidade espermática. Concentração espermática. Morfologia espermática.

ABSTRACT

The present study aims to characterize the spermatozoa of Africanized bees (*Apis mellifera* L.) in the semiarid region, produced during the harvest and off - season. The drones were obtained during the harvest period in the months of March to June of 2018 and of off-season in the months of October and December of 2018 at the Experimental Station of UFERSA. The drones were considered mature when they presented complete inversion and presence of semen in the tip of the endophallus. Semen collection was done by manual penile eversion technique. The following sperm parameters were evaluated: motility, membrane integrity, concentration and morphology. It was observed that the africanized bee bees evaluated in the harvest period had an average motility of $85.6 \pm 8.1\%$, a viability of $80.2 \pm 10\%$ and a concentration of $3.8 \pm 1.2 \times 10^6$ spermatozoa. On the other hand, the mean values were $52 \pm 21.2\%$, $70.9 \pm 12.8\%$ and $3 \pm 1.1 \times 10^6$ spermatozoa. The spermatozoa evaluated in the crop showed more abnormalities in their morphology, having an average percentage of spermatozoa with coiled tail of 64.9%, broken tail 3.6% and double tail 1.1% in relation to those evaluated in the off season that had an average percentage of spermatozoa with coiled tail of 60.7%, broken tail 2% and double tail 1,1%. The spermatozoa evaluated in the harvest period presented motility, viability and concentration superior to the spermatozoa evaluated in the off season. However, in relation to the morphology, the spermatozoa of the crop, presented more morphological defects, being the coiled tail the main one, when compared with those evaluated in the off season.

Keywords: Sperm motility. Sperm viability. Sperm concentration. Sperma morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Sistema reprodutivo dos zangões.....	19
Figura 2	–	Escape abelha utilizado para obtenção dos zangões.....	28
Figura 3	–	Eversão total do endófalo com sêmen. Sêmen presente na cor cremosa, com uma camada branca de muco	29
Figura 4	–	Espermatozoide anormal apresentando defeito de cauda enrolada (40x).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Médias gerais para as variáveis meteorológicas durante os períodos de safra e entressafra.....	32
Tabela 2	– Parâmetros espermáticos de zangões de abelhas africanizadas (<i>Apis mellifera</i> L.) em dois períodos do ano: safra e entressafra (média $\pm$ desvio padrão).....	33
Tabela 3	– Número de espermatozoides de diferentes espécies e regiões de abelhas do gênero <i>Apis</i>	36
Tabela 4	– Percentual médio das características morfológicas de espermatozoides de zangões de abelhas africanizadas (<i>Apis mellifera</i> L.) obtidos na safra e entressafra da região semiárida do Brasil.....	38

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1.	Geral.....	17
2.2.	Específicos.....	17
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1.	Biologia e reprodução dos zangões.....	18
3.2.	Importância da inseminação Instrumental em abelhas.....	20
3.3.	Criopreservação.....	22
3.4.	Parâmetros espermáticos.....	23
3.4.1.	Motilidade espermática.....	23
3.4.2.	Integridade da membrana plasmática.....	24
3.4.3.	Concentração espermática.....	25
3.4.4.	Morfologia espermática.....	26
3.5.	Perpectivas.....	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1.	Local e obtenção dos zangões.....	28
4.2.	Coleta do sêmen.....	29
4.3.	Motilidade espermática.....	29
4.4.	Integridade da membrana plasmática.....	30
4.5.	Concentração espermática.....	30
4.6.	Morfologia espermática.....	30
4.7.	Dados climáticos.....	31
4.8.	Análise estatística.....	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
8.	ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A atividade apícola atende aos critérios técnicos adequados ao tripé da sustentabilidade (Social, Econômico e Ambiental) (ALMEIDA & CARVALHO, 2009). Capaz de utilizar a mão de obra familiar, ser rentável e estabelecer o homem no campo. A atividade está crescendo no Nordeste do Brasil, onde é caracterizada por ser praticada por pequenos agricultores ligados a agricultura familiar (KHAN *et al.*, 2009). Os produtores, descapitalizados, não veem a atividade apícola como principal fonte de renda, mas como fonte de renda complementar (PEREIRA *et al.*, 2000; VILELA, 2002).

Um dos maiores problemas que a atividade apícola vem enfrentando na região nordeste é a escassez de chuvas e altas temperaturas, o que vem provocando perdas de enxames pelo processo de enxameagem (abandono das colônias), sendo esta situação intensificada nos anos de 2012 a 2015, quando registrou-se a pior seca dos últimos 50 anos, atingindo seu ponto crítico em 2012, cujos índices produtivos provocaram a queda de aproximadamente 50% na produção regional de mel, e perdas de 80% dos enxames (VIDAL, 2014; MARTINS & MAGALHÃES, 2015) a qual foi refletida em 2013 e nos anos seguintes dificultando assim a aquisição de novas colônias, tanto para iniciar a atividade como para ampliar o número de apiários atingidos pela seca.

A apicultura nordestina é feita com base de capturas de enxames da natureza, os quais não são passíveis de melhoramento algum, o que na maioria das vezes torna-se inviável a manutenção desses enxames. Entretanto a aquisição de enxames com abelhas rainhas melhorada geneticamente e aquisição de abelhas rainhas de boa linhagem genética apresentam-se como alternativas para a solução destes problemas, tendo como o principal processo a seleção de características de interesse econômico (GRAMACHO *et al.*, 2004).

O melhoramento genético tem como objetivo a obtenção de linhagens produtivas (SOUZA *et al.*, 2012). Portanto entre os inúmeros fatores que podem afetar as colônias de abelhas, tais como patologias, a qualidade genética da rainha, tem sido constantemente discutida (TARPY *et al.*, 2000; GILLEY *et al.*, 2003; IBRAHIM & SPIVAK, 2006; VAN-ENGELSDORP & MEIXNER, 2010). A abelha rainha é o alvo

de todas as informações importantes para a seleção, pois é ela que transmite, juntamente com os espermatozoides dos zangões alojados na sua espermateca, as qualidades herdáveis da colônia, sendo a única fêmea fértil contribuindo com 50% de todo o material genético repassado para as operárias (RINDERER *et al.*, 1986; RHODES, 2011) e os outros 50% são repassados pelos zangões.

É necessário um grande número de zangões para obter uma cópula bem-sucedida, de 7 a 20 zangões, e para as rainhas inseminadas instrumentalmente, de 20 a 25 (MORITZ & KÜHNERT, 1984; PAGE & PENG, 2001). Essa abundância de zangões gera uma maior diversidade genética para as proles e uma vida útil prolongada à rainha. Sendo, de extrema importância a produção de machos de boa qualidade e em quantidade, pois é inviável possuir rainhas selecionadas sem contar com zangões capazes de fecunda-las artificialmente, ou mesmo esperar a época de criação natural de zangões pelas colônias (COBEY, 2007; COBEY *et al.*, 2013).

Ainda assim, informações acadêmicas sobre fatores que podem afetar a fertilidade dos espermatozoides dos zangões na rainha de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), bem como sobre a biologia, fisiologia e produção são escassos. Um dos motivos, podendo ser até o principal, é que seu estudo tem certa complexidade devido ao fato de que zangões são encontrados apenas em períodos com abundância de néctar e pólen (FREE & WILLIAMS, 1975; ABDELKADER *et al.*, 2014; CHAIMANEE *et al.*, 2016). Devido a essas dificuldades há uma necessidade de se aprofundar nos estudos voltados sobre este tema em abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Caracterizar os espermatozoides de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no semiárido, produzidos no período de safra e entressafra.

2.2. Específicos

- Verificar o efeito dos fatores climáticos sobre os parâmetros espermáticos de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no semiárido.
- Verificar o efeito da época do ano sobre os parâmetros espermáticos de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) no semiárido.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biologia e reprodução dos zangões

A abelha rainha é a fêmea dominante na colônia de *Apis mellifera*, sendo responsável pelo controle da colônia e postura dos ovos (KRAUS *et al.*, 2003). As rainhas só acasalam no início de suas vidas, através cópula com múltiplos machos, e estes após a cópula morrem, pois perdem parte do abdome e aparelho genital. Os zangões só existem para acasalar, não executam função útil no ninho e grande parte morre antes de acasalar (WINSTON, 2003).

Apesar de existir uma grande quantidade de informações sobre a produção de abelhas rainhas, assim como a necessidade de utilizar zangões (*Apis mellifera* L.) na reprodução da espécie, ainda são poucos comentados os métodos de seleção, criação e manutenção dos zangões, tanto em pesquisas de melhoramento quanto em empresas especializadas em produção de rainhas (RHODES, 2002; 2011). Certas empresas levam em conta características relacionadas à capacidade produtiva das operárias, e não os atributos importantes para o acasalamento bem sucedido em condições adversas. A título de exemplo a criação de um grande número de zangões, independente das condições sazonais e nutricionais do ambiente, de sua conservação e manutenção; é possível conseguir maior tempo de vida útil, assim como sua seleção tomando como critério o volume de sêmen, o qual permitirá selecionar zangões com maior conteúdo seminal, por tanto contendo mais espermatozoides, com alta viabilidade e a motilidade (RHODES *et al.*, 2011; GONTARZ *et al.*, 2016).

As colônias tendem a produzir zangões em épocas que coincidem com a produção de rainhas virgens, geralmente em épocas com abundância de alimento (NOVAES, 2011). Segundo Free & Williams (1975) em países temperados, os ovos de zangões normalmente aparecem na primavera e atingem seu auge no início do verão, já no início do outono deixam de serem postos.

Os zangões nascem de um ovo não fecundado, proveniente de células chamadas zanganeiras. Eles são os únicos machos da colônia e não realizam nenhuma função além

da fecundação. Na falta de alimento, principalmente nos final das floradas, geralmente eles são mortos pelas operárias como forma de melhorar a eficiência do uso dos alimentos (WINSTON, 1991; CARVALHO, 2010).

Os órgãos reprodutivos dos zangões incluem um endófalo, testículos pareados, vesículas seminais e glândulas mucosas (Figura 1). O endófalo é o órgão copulatório, sendo um ducto membranoso longo e macio que fica dentro do abdome. Os espermatozoides são produzidos nos testículos e migram para as vesículas seminais até o processo de maturação, processo fisiológico que funciona em conjunto com as glândulas mucosas, que ao ser esvaziadas liberam espermatozoides juntamente com um muco branco pelo ducto seminal, o qual é secretado por zangões adultos (WINSTON, 1991; RHODES, 2011; KAULENAS, 2012).

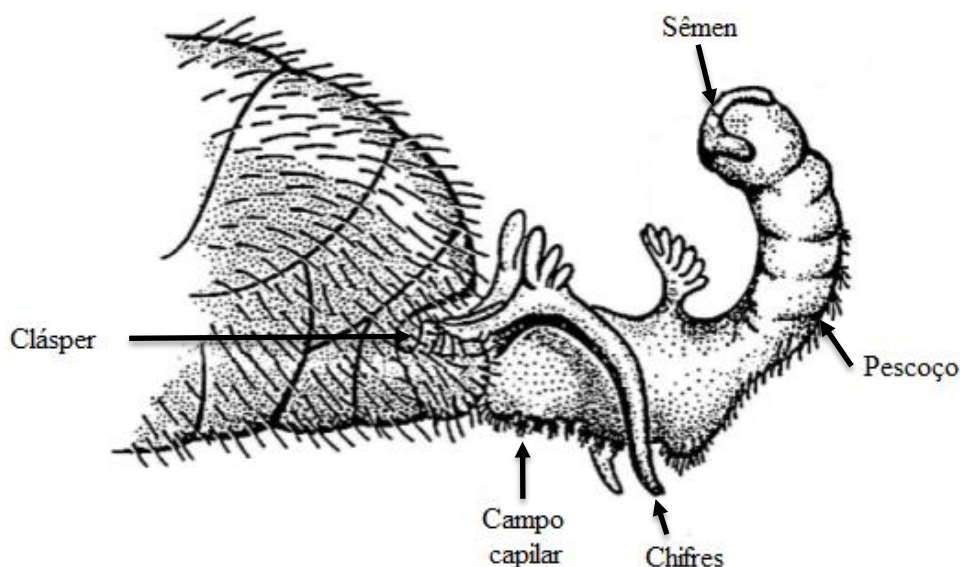


Figura 1. Sistema reprodutivo dos zangões. Fonte: Ontario Beekeeping Manual, 1993.

O sêmen consiste em uma mistura de varias substancias e células, principalmente de espermatozoides produzidos nos testículos. Outra substancia que forma parte dela é o muco, produzido por grandes glândulas mucosas. A produção de espermatozoides é considerada completa pelo tempo que os zangões atingem a maturidade sexual, ou quando têm em média de 9 a 12 dias de idade e já conseguem realizar voos de reconhecimento (COBEY, 2007). Cada zangão ejacula cerca de 6 a 12

milhões de espermatozoides, sendo que o sêmen de cada acasalamento se acumula nos ovidutos da rainha (WOYKE, 1962; COBEY, 2007; PAILLARD *et al.*, 2017). A maioria deste sêmen é expulso da rainha posteriormente, mas cerca de 5 a 6 milhões migram para a espermateca onde são armazenados até serem liberados em pequenas quantidades quando a rainha começa a realizar postura (PAGE, 1986; HARBO, 1990; COBEY, 2007).

O acasalamento é a função mais significativa de um zangão adulto. Durante o acasalamento o sêmen do zangão é transferido para o órgão genital de uma rainha virgem, através do endófalo, durante a cópula (WOYKE, 1964; SAWARKAR & TEMBHARE, 2015). Após a cópula, as secreções e partes dos órgãos reprodutivos dos zangões permanecem no trato genital da rainha e significam um "sinal de acasalamento" (WOYKE & RUTTNER, 1958). Segundo Sawarkar & Tembhare (2015) isto pode evitar que o sêmen saia do trato reprodutor da rainha.

3.2. Importância da Inseminação Instrumental em abelhas

O melhoramento genético em abelhas depende “basicamente” das técnicas de controle de cruzamentos, pois como mencionado anteriormente, as rainhas copulam no ar com vários machos e geralmente em locais distante dos apiários, tornando-se impossível o controle parental nestas condições. Um método alternativo de controlar o acasalamento é através da inseminação instrumental de abelhas rainhas. Esta técnica é muito eficaz, pois coleta-se o sêmen de zangões de colônias selecionadas e utilizam em rainhas selecionadas.

A técnica de inseminação instrumental proporciona por meio de equipamentos adequados, a transferência dos espermatozoides coletados dos machos, para o sistema reprodutivo da fêmea, técnica essa bem sucedida em vertebrados, no entanto ainda a ser aperfeiçoada nos invertebrados, sendo utilizada como ferramenta econômica ou de conservação biológica (MARTINEZ *et al.*, 2013). Os diferentes métodos de controle reprodutivo visam aumentar o taxa de sucesso do melhoramento genético, no entanto estão associados a uma maior endogamia, diferente da inseminação instrumental, que

obtem um melhor controle sobre a endogamia e evitar a propagação de doenças (COLLINS, 2000).

A inseminação instrumental em abelhas surgiu em 1920, sendo aperfeiçoada com o desenvolvimento e melhoria de equipamentos e programas de melhoramento genético, oferecendo ao setor apícola o total controle sobre a qualidade das abelhas. Assim, a inseminação permite a manutenção de características, sejam elas produtivas ou comportamentais, tornando-se uma ferramenta indispensável em programas comerciais de criação, programas de pesquisa e melhoramento de abelhas *Apis mellifera* L. (COBEY, 2007; MARTINEZ, *et al.*, 2013).

Em climas temperados as rainhas demoram de dois a quatro anos para esgotar os espermatozoides armazenados. No entanto, em climas tropicais a rainha pode realizar postura o ano inteiro, entretanto seu desgaste é alto necessitando ser trocada no final da safra (MANRIQUE & SOARES, 2002). É de suma importância frisar no tempo de troca de rainhas, pois para ser considerada boa, tem que ser capaz de uma postura diária de 1.500 ou mais ovos durante o período de 6 a 9 semanas (ROBERTS, 1946). Entretanto o envelhecimento dessas rainhas reduzem progressivamente seu desempenho na colônia, fazendo com que ela mesmo sendo considerada de genética boa, torne-se inadequada para a colônia, vindo a ser eliminada pelas próprias operárias (SILVA *et al.*, 1991).

Importante observar que os dados encontrados na literatura referem-se às abelhas europeias, encontradas em clima temperado. Já em climas mais quentes as rainhas não interrompem sua postura, devido a não passar pelos períodos de hibernação, fazendo com o que a oviposição seja diária, variando apenas a intensidade, de acordo com o fluxo de alimento. Por isso, o desgaste das rainhas em climas quentes é maior, tornando necessária sua substituição em períodos inferior a um ano (HAUSER & LENSKEY, 1994).

3.3. Criopreservação

A técnica de criopreservação consiste no armazenamento de espermatozoides submetido à refrigeração moderada e controlada, visando preservar seus recursos genéticos, uma vez que, sua capacidade de fertilização possa ser recuperada após o processo de congelamento e descongelamento (HOLT, 2000a; ORFÃO *et al.* 2011).

A capacidade de sobrevivência dos espermatozoides depende de sua tolerância ao método de criopreservação utilizado, aos crioprotetores e velocidade de redução da temperatura (CASTELO *et al.*, 2015; PAILLARD *et al.*, 2017). As relações entre o tempo e a temperatura durante o processo de criopreservação implicam nas características morfofuncionais das membranas plasmáticas, assim como o resfriamento dos espermatozoides podem acarretar em perdas irreversíveis na motilidade e alterações na integridade da membrana plasmática (ENGLAND, 1993; GILMORE *et al.*, 1998; WATSON, 2000;).

No entanto o desenvolvimento de um protocolo eficiente para a criopreservação do sêmen de zangões de abelhas tem sido uma tarefa difícil por mais de 40 anos (TAYLOR *et al.*, 2009). Tentativas anteriores sobre criopreservação de sêmen de zangão apresentaram resultados em motilidade e/ou viabilidade insatisfatórios, assim como no trabalho de Paillard *et al.* (2017), que tentaram armazenar o sêmen em nitrogênio líquido (-196°C) utilizando diferentes crioprotetores que embora alguns espermatozoides se mostrassem viáveis após o descongelamento, não foram capazes de desenvolver a técnica para ultracongelamento a longo prazo com um alto índice de sobrevivência dos espermatozoides. Em um resultado similar Harbo (1983), inseminou instrumentalmente rainhas de abelhas com sêmen armazenado em nitrogênio líquido, na qual a maioria das rainhas puseram mais ovos não fertilizados do que ovos fertilizados, indicando que o sêmen utilizado para inseminação era de má qualidade ou perdeu qualidade durante o processo de criopreservação.

Várias condições de armazenamento e congelamento de espermatozoides como forma de melhorar a preservação em abelhas foram testadas. Muitos compostos foram utilizados como crioprotetores intracelulares, tais como, glicerol, metanol, etileno-glicol e o dimetilsulfóxido (HARBO, 1979; HOLT, 2000a). Entretanto, o glicerol e

dimetilsulfóxido apresentaram resultados relativamente satisfatórios em comparação a outros crioprotetores, levando em consideração o tempo de armazenamento, na qual rainhas inseminadas com sêmen armazenado por 4 dias produziram 22% de crias de operárias, enquanto inseminadas com sêmen armazenadas por 2 anos produziu apenas 8% de crias de operárias (HARBO, 1983).

3.4. Parâmetros espermáticos

A avaliação da qualidade espermática está ligada a necessidade de qualificar a fertilidade dos reprodutores na fecundação das rainhas (CBRA, 1998). O estudo das características seminais vem sendo utilizada como ferramenta de avaliação da qualidade dos animais para reprodução no processo de fertilização (COLLINS, 2004a; COBEY *et al.*, 2013).

O espermatozoide pode ser avaliado através dos seus aspectos físicos (volume, coloração, motilidade, integridade da membrana, concentração de espermatozoides, entre outros) e aspectos morfológicos (anormalidades no acrossoma, cabeça e cauda) (LIMA, 2014).

3.4.1. Motilidade espermática

A motilidade espermática é fundamental para determinar a qualidade do sêmen, sendo de grande importância no momento da fertilização devido a sua mobilidade como indicador de funcionamento do metabolismo espermático e da integridade das membranas (GRANEMANN, 2006). Este parâmetro está fortemente relacionado à viabilidade espermática, ou seja, a porcentagem de células móveis é altamente correlacionada com a quantidade de espermatozoides viáveis, apesar de que nem sempre representa correlação significativa com a fertilidade (BORTOLOZZO *et al.*, 2008).

Além disso, este parâmetro é utilizado para estabelecer o limite aceitável para o uso do sêmen na produção apícola para inseminação das rainhas, sendo frequentemente

considerado o valor mínimo de 60% de motilidade espermática (JOHNSON *et al.*, 2000; BORTOLOZZO *et al.*, 2005). A utilização de valores abaixo de 60% de motilidade espermática afeta negativamente a taxa fertilização dos espermatozoides nas fêmeas de mamíferos (FLOWERS, 1997; GADEA, 2005).

O método mais utilizado para avaliação da motilidade espermática é realizado através da avaliação visual, pois é um teste rápido e de baixo custo; no entanto é um método subjetivo e pode ser influenciado pelo avaliador (VARNER, 2008). Essa avaliação é fundamental para averiguar a capacidade de fertilização dos espermatozoides de um ejaculado (JOHNSON *et al.*, 2000). Existem alguns fatores que interferem na motilidade espermática, alterando sua funcionalidade.

As soluções usadas para avaliação desempenham um importante papel nas taxas de motilidade dos espermatozoides, visto que em soluções hipotônicas os espermatozoides não apresentam nenhuma motilidade (KAFTANOGLU & PENG, 1984). O tempo de armazenamento dos espermatozoides após a coleta também pode alterar as taxas de motilidade dos espermatozoides, assim como um baixo número de espermatozoides móveis pode ser compensado pelo aumento dos espermatozoides totais no ejaculado. (FOXCROFT *et al.*, 2008; PAILLARD *et al.*, 2017). Além desses fatores, as condições ambientais, como calor ou frio excessivo, luz, osmolaridade e pH do diluente, tem influencia na motilidade espermática, tornando assim necessário proteger o sêmen de agentes ou condições prejudiciais antes da análise (TRENTIN, 2018).

3.4.2. Integridade da membrana plasmática

A membrana plasmática dos espermatozoides apresenta um importante papel na capacidade de fertilização, que se modifica ao longo do processo de espermatogênese, armazenamento, ejaculação e capacidade de penetração no ovócito (HOLT, 2000b; YESTE, 2016). Diante disso, é necessário que esta estrutura se apresente íntegra e funcional, permitindo a viabilidade e capacidade de fertilização do espermatozoide (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

A seleção genética dos zangões parece ser um fator importante para a aptidão das colônias, já que tanto o número de zangões no acasalamento, quanto o sucesso individual desses zangões são determinados pela colônia ou pela genética da rainha (KRAUS *et al.*, 2003).

Um dos métodos mais comuns para avaliação da viabilidade espermática se dá através de sondas fluorescentes, devido à capacidade de fixar-se em estruturas específicas da membrana, capaz de detectar integridade estrutural, possibilitando assim a avaliação de várias estruturas celulares (CELEGHINI *et al.*, 2007; FORERO-GONZALEZ *et al.*, 2012).

A utilização de sondas fluorescentes foi descrita por Gardner *et al.* (1986), testando essas sondas em espermatozoides de vários mamíferos. Já em zangões se deu a partir do desenvolvimento da inseminação instrumental de abelhas, onde se incrementou o interesse na avaliação e armazenamento *in vitro* do sêmen de zangões em programas de seleção e melhora genética (COLLINS & DONOGHUE, 1999). O iodeto de propídeo é um corante impermeável à membrana plasmática que se liga e cora o DNA, ele consegue penetrar apenas em células lesadas, sendo demonstrado em microscópio de fluorescência pela cor vermelho (HARRISON & VICKERS, 1990; HOLT, 2000a). Outro corante é o Hoesch, de característica permeável à membrana plasmática que é hidrolisado dentro da célula resultando em um composto fluorescente e impermeável a membrana plasmática intacta, susceptível de ser observado em microscópio de fluorescência pela cor azul (PORTUGAL & WARING, 1988).

3.4.3. Concentração espermática

A qualidade dos zangões é de extrema importância para o sucesso do acasalamento, no qual a rainha necessita de um número suficiente de zangões maduros contendo o volume de sêmen e a quantidade de espermatozoides necessários para durar por toda sua vida (RUTTNER, 1983; RHODES, 2011). O baixo número de espermatozoides encontrados nos zangões resulta na redução da produção das colônias (COBEY, 2007).

Um zangão produz cerca de 10×10^6 milhões de espermatozoides e 1 μL de sêmen contem em média $7,5 \times 10^6$ milhões de espermatozoides (WOYKE, 1962). Segundo Rhodes & Somerville (2003), a concentração de espermatozoides está associada à idade dos zangões. Diversos autores descobriram que cerca de 70% dos zangões de uma colônia, com idade aproximadamente 10 dias, não liberam sêmen no endofalo após eversão manual (COLLINS & PETTIS, 2001; WOYKE *et al.*, 2001; ANDERSON, 2004). Além da idade, efeitos nutricionais como a ausência de proteína tem influência sobre o número de espermatozoides encontrados em zangões atrasando sua maturidade sexual, que normalmente é atingida dos 12 a 16 dias de vida após emergir; em ausência de fonte nutricional de proteína, a maturidade pode ser atingida em até 20 dias após emergir (NGUYEN, 1999).

3.4.4. Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática pode indicar o potencial de fertilidade do espermatozoide na presença de altas porcentagens de anormalidade de primeiro e segundo grau. As de primeiro grau ocorrem durante o processo de espermatogênese e as de segundo grau ocorrem durante o percurso dos espermatozoides pelos ductos seminíferos e ejaculados (DOWSETT *et al.*, 1984; CHENOWETH, 2005). Células com defeito na cabeça e acrossoma estão associadas com infertilidade, assim como a concentração de espermatozoides anormais (LOVE, 2011).

Segundo Collins & Donoghue (1999), são necessárias a utilização de várias técnicas para a coloração de espermatozoides de acordo com a sua morfologia, porque cada técnica pode revelar diferentes detalhes ou defeitos nas estruturas dos espermatozoides. Em mamíferos a avaliação da morfologia espermática pode ser feita com uso do corante Rosa de Bengala, pois permite uma melhor diferenciação das estruturas espermáticas, especialmente o acrossoma (ZAMBELLI & CUNTO, 2006; SOUSA *et al.*, 2013).

As características morfológicas em espermatozoides nos zangões estão associadas ao seu genótipo e, em menor grau, a idade e a estação do ano (RHODES *et al.*, 2011). Segundo Gontarz *et al.* (2006), as características morfológicas dos

espermatozoides são, até certo ponto, dependentes de fatores ambientais, no entanto, tem se observado que os espermatozoides apresentam mais anormalidades no final da estação reprodutiva, principalmente em sua cauda.

3.5 Perspectivas

A avaliação do sêmen de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) é o primeiro passo para um conhecimento mais aprofundado sobre sua fisiologia reprodutiva e assim oferecer mais subsídios para futuros estudos como à criopreservação e inseminação instrumental e, portanto a criação e manutenção de bancos de germoplasma com materiais selecionados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local e obtenção dos zangões

Foram utilizados 100 zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), sendo 50 obtidas no período de safra e 50 no período de entressafra, com idade controlada de aproximadamente 12 dias estes foram capturados por meio de um escape abelha, onde apenas as operárias tinham livre acesso para o exterior da colmeia (Figura 2), entre os meses de março e junho de 2018 na Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, em Mossoró (5°03'37" de Latitude Sul e 37°23'50" de Longitude Oeste), com uma altitude média de 72 metros e clima semiárido. No período de entressafra, foram coletados zangões entre os meses de outubro e dezembro de 2018, no qual as colmeias foram alimentadas com uma dieta energético proteica. Os zangões foram considerados maduros quando apresentaram inversão completa e presença de sêmen na ponta do endófalo.



Figura 2. Escape abelha utilizado para obtenção dos zangões. Fonte: Arquivo pessoal.

4.2. Coleta do sêmen

A coleta do sêmen foi feita pela técnica de coleta padrão, na qual cada zangão foi preso pela região da cabeça e tórax, sendo seu abdômen pressionado suavemente resultando na eversão do endófalo, conforme a metodologia de Collins & Donoghue (1999) (Figura 3), para sua posterior extração com uma pinça de alumínio. Logo, essa estrutura foi macerada utilizando uma pinça em 40 µl de solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, e em seguida o sêmen foi avaliado quanto a sua qualidade. As análises espermáticas foram realizadas no Laboratório de Conservação e Germoplasma Animal (LCGA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.



Figura 3. Eversão total do endófalo com sêmen. Sêmen presente na cor cremosa, com uma camada branca de muco. Fonte: mdig.com.br.

4.3. Motilidade espermática

Após a maceração, uma alíquota de 5µL contendo espermatozoides foi avaliada quanto a sua motilidade. Este parâmetro foi observado em microscopia de luz (100x) e estimado em porcentagem de 0 a 100% a depender da quantidade de espermatozoides em movimento.

4.4. Integridade da membrana plasmática

Após a realização de cada maceração, uma alíquota de 10 µL contendo espermatozoides foi incubado a 34°C por seis minutos em solução de coloração fluorescente, contendo 1 µL de iodeto de propídio (PI; Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA) e 5 µL Hoechst 342 (H-342; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). As amostras foram avaliadas através de um microscópio de epifluorescência (×400; Leica, Kista, Sweden) para contagem de 100 células. Espermatozoides marcados em azul (H-342) foram classificados como tendo a membrana intacta e os marcados em vermelho foram considerados não intacto (adaptado de HOPKINS & HERR, 2010).

4.5. Concentração espermática

Para a concentração espermática tomou-se alíquota de 5µL do macerado de cada zangão e diluiu-se em 995µL de solução salina formolizada (2,9g de citrato de sódio, 4ml de solução comercial de formaldeído 35% e 100 ml de água destilada) e avaliado em 5 quadrados da câmara de Neubauer. A determinação da concentração espermática foi feita pela seguinte fórmula (adaptado de NGUYEN, 1999):

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células espermáticas} \times 10^6 = \text{Volume do macerado (}\mu\text{L)} \times \text{n}^{\circ} \text{ total de espermatozoides contados em 5 quadrados da câmara de Neubauer} \times 5000.$$

4.6. Morfologia espermática

O corante Rosa de Bengala foi usado para avaliação da morfologia espermática, na qual foram contadas 20 células por zangão, em microscopia de luz (400x) Os espermatozoides foram classificados normais e anormais quando apresentavam defeito de cauda, cabeça e acrossoma.

4.7. Dados climáticos

No decorrer de todo o experimento foram obtidos dados dos fatores climáticos (temperatura, umidade, precipitação pluvial), através dos dados coletados junto ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e da estação climatológica instalada na Fazenda Experimental da UFERSA. Esses dados foram utilizados para avaliar a influência dos fatores climáticos na quantidade e qualidade do sêmen dos zangões.

4.8. Análise Estatística

As diferenças motilidade espermática, integridade da membrana plasmática, concentração espermática e morfologia espermática de zangões, como variáveis dependentes e assumindo sua normalidade (MUNDRY & FISCHER, 1998), foram analisadas em um desenho completamente randomizado em função dos efeitos fixos da colmeia, o mês de avaliação, e as co-variáveis: precipitação pluvial, umidade, temperatura e a idade aproximada dos zangões, como variáveis independentes. Com o intuito de estudar possíveis diferenças estatísticas nos parâmetros espermáticos entre meses e épocas de avaliação, uma análise de variância (ANOVA) com arranjo de medidas repetidas no tempo foi aplicada levando em consideração várias repetições por cada zangão. As diferenças estatísticas entre as amostras foram testadas usando o teste de Tukey (PROC GLIMMIX, SAS Institute 2012–2015; University Edition) quando o nível de significância entre efeitos fixos, considerando o valor de p , foi inferior a 0,05 de acordo com metodologia de Paillard *et al.*, (2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 são apresentados os dados climáticos médios obtidos ao longo do período de coleta, sendo março, maio e junho de 2018 (período de safra, período que ocorre a entrada de alimento natural na colônia, néctar e pólen) e outubro, novembro e dezembro de 2018 (entressafra, ou seja, período que praticamente não ocorre à entrada de alimento natural na colônia, néctar e pólen). Os fatores climáticos (temperatura, umidade, precipitação pluvial) quando avaliados individualmente não tiveram efeito ($p > 0,05$) sobre os parâmetros espermáticos estudados (Dados brutos no anexo 1), o que pode ser explicado pela constância desses fatores durante o período de coleta do experimento. No entanto, a precipitação pluvial durante os meses que foram considerados como período de safra teve uma média de $59,5 \pm 39,3$ mm e na entressafra $9,2 \pm 15,9$ mm. Segundo Marengo (2010), o clima semiárido é caracterizado por apresentar pouca incidência de chuva, sendo que principal período de chuva ocorre entre os meses de fevereiro a maio. Esse clima é bastante conhecido por apresentar as maiores períodos de secas da região nordeste. Essas secas estão associadas às características climáticas da região, tais como índice de chuvas inferior a 800mm/ano e temperaturas médias em torno de 27°C (NOBRE *et al.*, 2006).

Tabela 1. Médias gerais para as variáveis meteorológicas durante os períodos de safra e entressafra.

	Safra			Entressafra		
	Março	Maio	Junho	Outubro	Novembro	Dezembro
Parâmetros ambientais						
Temperatura média ($^{\circ}\text{C}$)	27,9	26,4	25,8	28	28,8	28,5
Umidade média (%)	78,1	84,2	78,6	67,5	65,3	69,9
Precipitação média (mm)	64,4	96,2	18	0	0	27,6

Foram observados em ambos os períodos que houve influência entre os parâmetros espermáticos observados durante a safra e entressafra ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros espermáticos de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em dois períodos do ano: safra e entressafra (média $\pm$ desvio padrão).

Parâmetros espermáticos	Período	
	Safra	Entressafra
Motilidade (%)	85,6 $\pm$ 8,1 ^a	52,0 $\pm$ 21,2 ^b
Integridade da membrana (%)	80,2 $\pm$ 10 ^a	70,9 $\pm$ 12,8 ^b
Concentração ($\times 10^6$)	3,8 $\pm$ 1,2 ^a	3,0 $\pm$ 1,1 ^b

*Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise de qualidade do sêmen é uma ferramenta para avaliação de fertilidade dos machos e a motilidade espermática está relacionada com o sucesso da fertilização em várias espécies (TOURMENTE *et al.*, 2007). Rhodes (2011) demonstrou que as características espermáticas nos zangões dependem do seu genótipo, da idade e da estação do ano. Assim como nas demais regiões, no semiárido nordestino existem estações do ano que ocorre abundância floral (safra), onde é retirado o néctar e o pólen em grandes quantidades para o desenvolvimento da colônia e outras com pouca ou total ausência de alimento (entressafra) (PEREIRA *et al.*, 2000; VILELA, 2002).

A motilidade média dos espermatozoides encontrados na safra foi significativamente maior que os achados na entressafra (Tabela 2), o que pode ser influenciado por esse déficit de alimento na entressafra, no qual o pólen disponível nessa época é insuficiente para manutenção dos zangões, consequentemente reduzindo a qualidade do sêmen. Em estudos anteriores foram observados os efeitos sazonais sobre a motilidade espermática de várias espécies, onde em épocas com abundância de alimento, também conhecidas como épocas de safra foram determinantes para a fertilização (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2005; PETROCELLI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Assim como encontrado no presente estudo, em outros realizados com mamíferos, amostras de esperma coletadas durante a época de reprodução, normalmente em épocas caracterizadas pela abundância de alimento, proporcionaram motilidades espermáticas acima de 80% (MICKELSEN *et al.*, 1981; KOZDROWSKI & DUBIEL, 2004). Já Ciereszko *et al.* (2017), observaram que os espermatozoides dos zangões de abelhas europeias (*Apis mellifera carnica*) demonstraram motilidade média de 69 a 79% durante a safra. Outros estudos com subespécies de abelhas melíferas a motilidade variou de 13 a 70% (VERMA, 1978; WEGENER *et al.*, 2012; CIERESZKO *et al.*,

2017; PAILLARD *et al.*, 2017). Tendo em vista essas observações, podemos confirmar que a alimentação interfere na qualidade espermática.

Baer (2005), em seu trabalho de inseminação instrumental em abelhas estimou que apenas 2,5% dos espermatozoides inseminados migram para a espermateca da abelha rainha quando inseminadas, sendo isso em longo prazo. Wegener *et al.* (2012), encontraram uma correlação forte entre a motilidade espermática e indicadores de desempenho espermático em rainhas inseminadas instrumentalmente, como a postura de ovos. Geralmente quando os espermatozoides são utilizados na inseminação instrumental, não é feita uma avaliação prévia da sua qualidade, o que pode afetar a postura das rainhas. Diante dessa evidência, a importância da seleção de zangões com motilidades superiores a 80% para inseminação instrumental assim como ocorre em mamíferos, mostra que os zangões do período de safra neste trabalho estão aptos para a inseminação (KOZDROWSKI & DUBIEL, 2004).

Em relação às variações da motilidade, estas avaliadas por um método subjetivo, feito através da utilização de um microscópio óptico e os critérios do avaliador para estimá-las, assim torna-se necessário usar métodos mais sofisticados assim como Análise de Esperma Assistida por Computador (CASA), para a determinação de outros parâmetros de motilidade, tais como velocidade, batimento flagelar, entre outros (AL-LAWATI *et al.*, 2009).

A integridade da membrana também chamada de viabilidade espermática, assim como visto na motilidade, a viabilidade espermática em época de safra se mostrou significativamente maior do que na entressafra ($p > 0,05$) (Tabela 2), esse declínio pode ser explicado pelo fato da ausência de alimento na natureza durante a época de entressafra, no qual os zangões não são bem alimentados pelas operárias, portanto mal nutridos e também pelo fato da diminuição populacional das colônias, diminuindo o número de operárias e a produção (FREE & WILLIAMS, 1975; RHODES *et al.*, 2011).

Os fatores climáticos como abordado anteriormente não foram significantes para o parâmetro de viabilidade, possivelmente por apresentarem-se com pouca variação ao longo do experimento. Um estudo no Texas, onde possui clima semelhante ao do nosso estudo mostrou que houve uma diferença significativa entre a viabilidade dos zangões coletados das mesmas colônias durante a mesma época em dois anos, sendo $46,2 \pm$

2,9% em 2013 e $67,0 \pm 3,0\%$ (FISHER *et al.*, 2018). A diferença destes resultados pode estar relacionado a fatores genéticos e presença de pesticidas (STRAUB *et al.*, 2016).

A idade dos zangões não foi parâmetro de avaliação, no entanto não influenciou na viabilidade espermática, pois todos os zangões utilizados tinham aproximadamente 12 dias. Entretanto Locke & Peng (1993) em seu trabalho com zangões de abelhas europeias de idades de 28 e 42 dias, demonstrou que não houve diferenças significativas na viabilidade de $81,4 \pm 1,6\%$ para 28 dias e $80,1 \pm 2,0\%$ para 42 dias, ou seja, a partir dos 12 dias, se houver disponibilidade de alimento, os zangões são viáveis para reprodução.

Os espermatozoides são armazenado na espermateca da rainha e pode perder progressivamente sua viabilidade (TARPY & OLIVAREZ, 2014). Segundo Gençer *et al.* (2014), durante o segundo estágio de eversão do endófalco, ocorre naturalmente uma ligeira redução de $\sim 10\%$ na viabilidade espermática. Uma variabilidade significativa na viabilidade de espermatozoides armazenados na espermateca das rainhas foi observada por Rousseau *et al.* (2015) no Canadá, reforçando a importância da escolha de zangões com alta viabilidade. Collins (2000) analisou a funcionalidade de rainhas inseminadas instrumentalmente com espermatozoides de baixa viabilidade, então foi constatado que as rainhas que receberam sêmen contendo 42,5% ou mais de espermatozoides viáveis produziram crias de operárias. Em outro estudo posterior Collins (2004b) observou que rainhas inseminadas que recebiam sêmen contendo 42,5% de espermatozoides viáveis colocavam ovos fertilizados com 6 a 8 meses após a inseminação. No entanto, não se sabe ao certo o motivo dos zangões em épocas de entressafra apresentarem valores baixos em relação aos produzidos em épocas de safra, o que se especula é a disponibilidade de alimento e o tipo de alimento ingerido nas épocas de produção de zangões.

O número de espermatozoides por zangão é um dado usado para compreender vários aspectos da fisiologia dos mesmos, incluindo sua aptidão, poliandria e competição espermática (KOENIGER *et al.*, 2005). O número médio de espermatozoides para zangões de abelhas africanizadas no clima semiárido em época de safra foi de $3,8 \pm 1,2 \times 10^6$, demonstrando significativamente maior que os encontrados na entressafra $3,0 \pm 1,1 \times 10^6$. Rinderer *et al.* (1985) nos Estados Unidos, encontrou uma média de $4,6 \pm 0,9 \times 10^6$ em zangões de abelhas africanizadas e $5,7 \pm 0,9 \times 10^6$ para

zangões de abelhas europeias. Já Duay *et al.* (2002) encontrou uma média $7,5 \pm 2,8 \times 10^6$ em abelhas *Apis mellifera carnica* na Alemanha. Essas diferenças podem estar associadas a fatores genéticos e/ou ambientais (NEUMANN & MORITZ, 2000; MATTILA & SEELEY, 2007).

O estudo demonstrou um número de espermatozoides relativamente baixo comparado a outros trabalhos com zangões de *Apis mellifera* L (Tabela 3). Essa variação de resultados pode ter ocorrido devido ao método de coleta utilizado e a espécie utilizada, pois na maioria dos trabalhos o sêmen é coletado da ponta do endófalo, com um capilar de vidro, com atenção para evitar a coleta do muco (COLLINS & DONOGHUE, 1999; COBEY, 2013). O método utilizado neste trabalho foi através da maceração do aparelho reprodutor masculino.

Tabela 3. Número de espermatozoides de diferentes espécies e regiões de abelhas do gênero *Apis*.

Autor	Região da amostra	Espécies	Nº de espermatozoides ($\times 10^6$)
Rinderer <i>et al.</i> (1985)	Venezuela	<i>Apis mellifera</i> L.*	$4,6 \pm 0,9$
Rinderer <i>et al.</i> (1985)	Venezuela	<i>Apis mellifera</i> L.**	$5,7 \pm 0,9$
Berg (1990)	Alemanha	<i>Apis mellifera carnica</i>	$7,1 \pm 1,9$
Schlüns <i>et al.</i> (2003)	Alemanha	<i>Apis mellifera carnica</i>	$11,9 \pm 1$
Presente estudo (Safrá)	Brasil	<i>Apis mellifera</i> L.*	$3,8 \pm 1,2$
Presente estudo (Entressafrá)	Brasil	<i>Apis mellifera</i> L.*	$3 \pm 1,1$

* Abelhas africanizadas. ** Abelhas europeias.

Em comparação com resultados do número de espermatozoides de zangões de abelhas europeias, o presente estudo demonstrou que as abelhas africanizadas produziram menos espermatozoides, o que pode estar associado a fatores morfológicos como o tamanho dos zangões (RINDERER *et al.* 1985; BERG & KOENINGER, 1990; HUNT, 1998). SCHLÜNS *et al.* (2003) verificaram que há uma correlação positiva entre o tamanho do zangão de *Apis mellifera carnica* e a quantidade de espermatozoides, onde zangões grandes produziram em média de $11,9 \pm 1,0 \times 10^6$ e zangões pequenos $7,4 \pm 0,4 \times 10^6$. Demonstrando que a quantidade espermática dos zangões africanizados possa estar associada ao tamanho corporal. De fato, Berg *et al.* (1997) relatou pequenas diferenças no número de espermatozoides entre zangões grandes e pequenos com *Apis mellifera carnica* assim como desvantagem reprodutiva de pequenos zangões.

Segundo Rhodes *et al.* (2011), o aumento do número de espermatozoides não corresponde ao volume do ejaculado e em seu estudo, os zangões que apresentaram maior volume e concentração espermática estavam associados a sazonalidade, com zangões produzidos no outono apresentaram significativamente mais espermatozoide do que os zangões produzidos no verão. Assim como nesse estudo, onde os zangões encontrados durante os meses mais secos apresentaram menor quantidade de espermatozoides comparados aos encontrados durante os meses que mais chuveram, indicando um efeito sazonal na produção de espermatozoides assim como nas demais qualidades. De fato, os dados apresentados nesse estudo indicam que a genética dos zangões e a sazonalidade sustentam todos os aspectos da produção dos espermatozoides e sua qualidade.

Os zangões avaliados no presente estudo liberaram sêmen com aproximadamente 12 dias. Segundo Bishop (1920) a produção de espermatozoides em zangões está completa quando zangões adultos atingem sua maturidade sexual e liberam seus fluidos seminais quando evertido, ou quando têm cerca de 9 a 12 dias de idade. Já zangões adultos com mais de 20 dias de idade produzem mais sêmen em relação a zangões mais jovens, necessitando assim de mais estudos relacionando a idade dos zangões comparada com a quantidade de espermatozoides (ANDERSON, 2004).

Assim como os demais parâmetros ainda há a necessidade de estudos sobre a concentração espermática de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e seus métodos de coleta, pois, a maioria dos estudos são realizados com outras subespécies que mesmo filogeneticamente próximas das africanizadas ainda há uma divergência de resultados.

A Tabela 4 apresenta as características morfológicas dos espermatozoides de zangões de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L.. Neste trabalho foi encontrada diferença entre os defeitos espermáticos encontrados nos espermatozoides dos zangões relacionados à época de safra e entressafra, onde os espermatozoides coletados na safra apresentaram maior quantidade de alterações morfológicas que os da entressafra ($p > 0,05$). Essa anormalidade dos espermatozoides pode estar associada fatores ambientais, incluindo a estação do ano, o tipo de alimentação (RHODES *et al.*, 2011 GONTARZ *et al.*, 2016).

Tabela 4. Percentual médio das características morfológicas de espermatozoides de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) obtidos na safra e entressafra da região semiárida do Brasil.

Morfologia espermática	Safra	Entressafra
Normal	30,8 ± 2,3 ^b	36,6 ± 1,8 ^a
Anormal		
Cauda enrolada	64,9 ± 5,1 ^a	60,7 ± 5,7 ^b
Cauda quebrada	3,6 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,1 ^b
Cauda dupla	1,1 ± 0,01 ^a	1,1 ± 0,07 ^a

*Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os espermatozoides encontrados apresentaram uma alta porcentagem de cauda enrolada (Fig. 4) em ambas as épocas, assim como foi visto por Gontarz *et al.* (2016) em *Apis mellifera* L.. Além disso, outros autores observaram uma porcentagem elevada de espermatozoides com defeitos morfológicos, tais como caudas enroladas, caudas quebradas, caudas duplas e cabeças duplas (TARLIYA *et al.*, 1999). No entanto não se sabe ao certo o que ocasiona essas anormalidades em zangões, entretanto a maioria dos espermatozoides apresentaram caudas levemente enroladas, o que pode estar relacionado à redução brusca de temperatura. Blom (1966) identificou nos espermatozoides de um touro Jersey um forte enrolamento na peça intermediária e na cauda ocasionado por defeito de caráter hereditário. Ainda assim há a necessidade de estudos relacionados a essas anormalidades e o motivo de sua alta incidência no período de safra, onde os demais parâmetros avaliados apresentaram os melhores resultados.

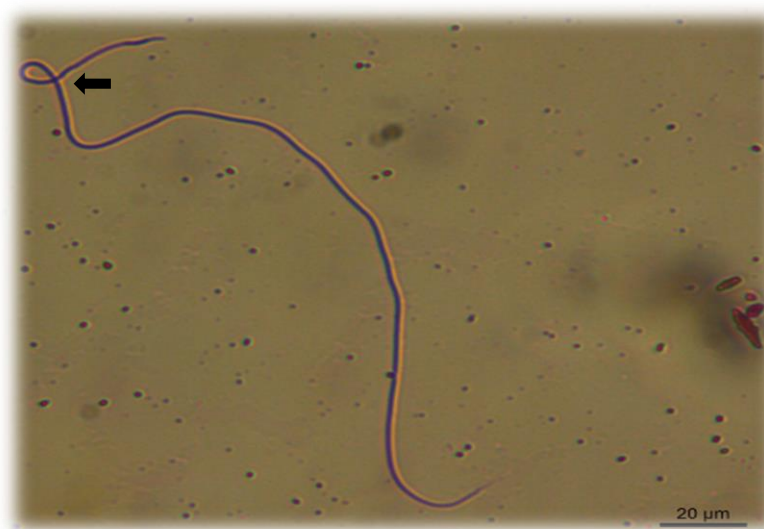


Figura 4. Espermatozoide anormal apresentando defeito de cauda enrolada (40x). Fonte: Arquivo pessoal.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período de coletado dos espermatozoides influencia em suas características espermáticas. Os espermatozoides avaliados no período de safra apresentaram motilidade, viabilidade e concentração superiores aos espermatozoides avaliados na entressafra. No entanto, em relação à morfologia, os espermatozoides de safra, apresentaram mais defeitos morfológicos, sendo cauda enrolada o principal, quando comparados com os avaliados na entressafra.

Os fatores climáticos da região não influenciaram nos parâmetros espermáticos, quando tratados individualmente, mas sim quando agrupados por período de safra e entressafra, pois na safra devido à precipitação pluviométrica no semiárido ocorre a oferta de pólen e néctar em abundância, enquanto na entressafra esse alimento é escasso ou não existe, interferindo na produção e qualidade espermática. Portanto recomenda-se um maior incentivo e aprofundamento nas pesquisas com alimentos complementares nesta época, visando a obtenção de zangões quantitativa e qualitativamente semelhantes aqueles produzidos durante o período de safra.

Os dados espermáticos dos zangões de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. e características seminais poderão servir como parâmetros para as referidas avaliações dentro da espécie. Entretanto, sugerem-se mais estudos sobre as características seminais de diferentes épocas para os zangões de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L..

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELKADER, F. B.; KAIRO, G.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; SENECHAL, J.; CRAUSER, D.; VERMANDERE, J. P.; ALAUX, C.; CONTE, Y. L.; BELZUNCES, L. P.; BARBOUCHE, N.; BRUNET, J. L. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 215-223, 2014.

AL-LAWATI, H.; KAMP, G.; BIENEFELD, K. Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. **Journal of insect physiology**, v. 55, n. 2, p. 117-122, 2009.

ALMEIDA, M. A. D.; CARVALHO, C. M. S. Apicultura: uma oportunidade de negócio sustentável. **Salvador: Sebrae, Bahia**, 2009.

ANDERSON, D. Improving queen bee production. **Rural Industries Research and Development Corporation**, Canberra, Australia. 2004.

BAER, B.; ZAREIE, R.; PAYNTER, E.; POLAND, V.; MILLAR, A. H. Seminal fluid proteins differ in abundance between genetic lineages of honeybees. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 18, p. 5646-5653, 2012.

BERG, S.; KOENIGER, N. Larger drones (*Apis mellifera*) have more offspring. In: **Proc. German Zoological Society, 83rd Meeting, Frankfurt am Main, Gustav Fischer Verlag**. p. 614. 1990

BERG S.; KOENIGER N.; KOENIGER G.; FUCHS S. Body size and reproductive success of drones (*Apis mellifera* L). **Apidologie**, v. 28, n. 6, p. 449-460, 1997.

BISHOP, G. H. Fertilisation in the honey-bee. **Journal of Experimental Zoology**, v. 31, n. 2, p. 225-266, 1920.

BLOM, E. A new sterilizing and hereditary defect (the 'Dag defect') located in the bull sperm tail. **Nature**, v. 209, n. 5024, p. 739, 1966.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, RS. Vol. 33, n. 1, p. 17-32, 2005.

BORTOLOZZO, F. P.; GOLDBERG, A. M. G.; WENTZ, I. Até onde é possível reduzir o número de espermatozóides empregados na inseminação artificial intra-cervical em suínos sem comprometer a fertilidade. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, 2008.

CARVALHO, R. G. *Apis mellifera*: reprodução, polinização e produção do mel. **São Paulo: Faculdades Falibe**, 36p, 2010.

CASTELO, T. S. SILVA, A. M.; BEZERRA, L. G. P.; COSTA, C. Y. M.; LAGO A. E. A.; BEZERRA, J. A. B.; CAMPOS, L. B.; PRAXEDES, E. C. G.; SILVA A. R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 442-447, 2015.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (Ed.). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 1998.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDREADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHAIMANEE, V.; EVANS, J. D.; CHEN, Y.; JACKSON, C.; PETTIS, J. S. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. **Journal of insect physiology**, v. 89, p. 1-8, 2016.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 457-468, 2005.

CIERESZKO, A. WILDE, J.; DIETRICH, G. J.; SIUDA, M.; BAŁK, B.; JUDYCKA, S.; KAROL, H. Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. **Apidologie**, v. 48, n. 2, p. 211-222, 2017.

COBEY, S. W. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. **Apidologie**, v. 38, n. 4, p. 390-410, 2007.

COBEY, S. W.; TARPY, D. R.; WOYKE, J. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, p. 1-18, 2013.

COLLINS, A. M.; DONOGHUE, A. M. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1513-1523, 1999.

COLLINS, A. M. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. **Apidologie**, v. 31, n. 3, p. 421-429, 2000.

COLLINS, A. M.; PETTIS, J. S. Effect of varroa infestation on semen quality. **American Bee Journal**, v. 141, n. 8, p. 590, 2001.

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. Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. **Journal of apicultural research**, v. 43, n. 4, p. 167-171, 2004b.

DOWSETT, K. F.; OSBORNE, H. G.; PATTIE, W. A. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 463-472, 1984.

DUAY, P.; DE JONG, D.; ENGELS, W. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. **Genetic Molecular Research**, v. 1, n. 3, p. 227-232, 2002.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 47, p. 243-255, 1993.

FISHER, A.; HARRISON, K.; LOVE, C.; VARNER, D.; RANGEL, J. Spatio-Temporal Variation in Viability of Spermatozoa of Honey Bee, *Apis mellifera*, Drones in Central Texas Apiaries. **Southwestern Entomologist**, v. 43, n. 2, p. 343-356, 2018.

FLOWERS, W. L. Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated. **Journal of Animal science**, v. 80, n. 1, p. 47-53, 2002.

FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44, p. 154-159, 2012.

FOXCROFT, G.R.; DYCK, M.K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W.T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1324–1336, 2008.

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

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 431-444, 2005.

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHSON, L. A. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 127-138, 1986.

GENÇER, H. V.; KAHYA, Y.; WOYKE, J. Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. **Apidologie**, v. 45, n. 6, p. 757-770, 2014.

GILLEY, D. C.; TARPY, D. R.; LAND, B. B. Effect of queen quality on interactions between workers and dueling queens in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 55, n. 2, p. 190-196, 2003.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 1, p. 28-36, 1998.

GONTARZ, A.; BANASZEWSKA, D.; GRYZINSKA, M.; ANDRASZEK, K. Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 40, n. 5, p. 598-602, 2016.

GRAMACHO, K. P. G. Considerações sobre o melhoramento de abelhas com base no comportamento higiênico. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA**. 2004.

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

GUIMARÃES, D. B.; BARROS, T. B.; TILBURG, M. F.; MARTINS, J. A. M.; MOURA, A. A.; MORENO, F. B.; MOREIRA, A. C. M.; MOREIRA, R. A.; TONIOLLI, R. Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. **Animal reproduction science**, v. 183, p. 27-38, 2017.

HARBO, J. R. Storage of honeybee spermatozoa at – 196 C. **Journal of Apicultural Research**, v. 18, n. 1, p. 57-63, 1979.

HARBO, J. R. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (–196 C). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 76, n. 5, p. 890-891, 1983.

HARBO, J. R. Artificial mixing of spermatozoa from honeybees and evidence for sperm competition. **Journal of Apicultural Research**, v. 29, n. 3, p. 151-158, 1990.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HAUSER, H.; LENSKY, Y. The effect of the age of the honey bee (*Apis mellifera* L) queen on worker population, swarming and honey yields in a subtropical climate. **Apidologie**, v. 25, n. 6, p. 566-578, 1994.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000a.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000b.

HOPKINS, B. K.; HERR, C.. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. **Apidologie**, v. 41, n. 5, p. 548-556, 2010.

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, n. 3, p. 1203-1213, 1998.

IBRAHIM, A.; SPIVAK, M. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to Varroa destructor. **Apidologie**, v. 37, n. 1, p. 31-40, 2006.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172, 2000.

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

KAULENAS, M. S. Insect accessory reproductive structures: function, structure, and development. **Springer Science & Business Media**, 2012.

KHAN, A. S.; MATOS, V. D.; LIMA, P. V. P. S. Desempenho da apicultura no estado do Ceará: competitividade, nível tecnológico e fatores condicionantes. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 47, n. 3, p. 651-676, 2009.

KOENIGER, G.; KOENIGER, N., TINGEK, S.; PHIANCHAROEN, M. Variance in spermatozoa number among *Apis dorsata* drones and among *Apis mellifera* drones. **Apidologie**, v. 36, n. 2, p. 279-284, 2005.

KOZDROWSKI, R.; DUBIEL, A. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. **Animal reproduction science**, v. 80, n. 3-4, p. 281-289, 2004.

KRAUS, F. B.; NEUMANN, P.; SCHARPENBERG, H.; VAN PRAAGH, J.; MORITZ, R. F. A et al. Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). **Journal of evolutionary biology**, v. 16, n. 5, p. 914-920, 2003.

LENSKY, Y.; BEN-DAVID, E.; SCHINDLER, H. Ultrastructure of the spermatozoon of the mature drone honeybee. **Journal of apicultural research**, v. 18, n. 4, p. 264-271, 1979.

LIMA, D. M. A. **Correlação dos Parâmetros Espermáticos Com a Fertilidade de Duas Linhagens Comerciais de Suínos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. 2014.

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.

LOVE, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 547-557, 2011.

MANRIQUE, A. J.; SOARES, A. E. E. Início de um programa de seleção de abelhas africanizadas para a melhoria na produção de própolis e seu efeito na produção de mel. **Interciencia**, v. 27, n. 6, p. 312-316, 2002.

MARENGO, J. A. Vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima no semi-árido do Brasil. **Parcerias estratégicas**, v. 13, n. 27, p. 149-176, 2010.

MARTINEZ, O. A.; SOUZA, J.; BEZERRA-LAURE, M. A. F.; SOARES, A. E. E. A inseminação instrumental em abelhas *Apis mellifera* como ferramenta no melhoramento genético. **Apacame**, 2013.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; GARCIA-MACIAS, V.; DE PAZ, P.; ALVAREZ, M.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Season effect on genitalia and epididymal sperm from Iberian red deer, roe deer and *Cantabrian chamois*. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1857-1875, 2005.

MARTINS, E. S. P. R.; MAGALHÃES, A. R. A seca de 2012–2015 no Nordeste e seus impactos. **Parcerias Estratégicas**, 2015.

MATTILA, H. R.; SEELEY, T. D. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. **Science**, v. 317, n. 5836, p. 362-364, 2007.

MICKELSEN, W. D.; PAISLEY, L. G.; DAHMEN, J. J. The effect of season on the scrotal circumference and sperm motility and morphology in rams. **Theriogenology**, v. 16, n. 1, p. 45-51, 1981.

MORITZ, F. A.; KÜHNERT, M. Seasonal effects on artificial insemination of honeybee queens (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 15, n. 2, p. 223-231, 1984.

MUNDRY, R.; FISCHER, J. Use of statistical programs for nonparametric tests of small samples often leads to incorrect Pvalues: examples from Animal Behaviour. **Animal behaviour**, v. 56, n. 1, p. 256-259, 1998.

NEUMANN, P.; MORITZ, R. F. A. Testing genetic variance hypotheses for the evolution of polyandry in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Insectes Sociaux**, v. 47, n. 3, p. 271-279, 2000.

NGUYEN, V. N. Effect of protein nutrition and pollen supplementation of honey bee (*Apis mellifera* L.), colonies on characteristics of drones with particular reference to sexual maturity. **The Australasian Beekeeper**, v. 101, p. 374-375, 1999.

NOBRE, P.; MARENGO, J. A.; CAVALCANTI, I. F. A.; OBREGON, G. Seasonal-to-decadal predictability and prediction of South American climate. **Journal of climate**, v. 19, n. 23, p. 5988-6004, 2006.

NOVAES, A. B. Produção e Inseminação artificial de rainhas de abelhas *Apis mellifera*. **Uberlândia: EDUFU**, 2011. 132 p.

ORFÃO, L. H.; NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, F. M.; COSSON, J.; VIVEIROS, A. T. Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on the motility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus* (Characiformes). **Aquaculture**, v. 311, n. 1-4, p. 241-247, 2011.

PAGE, R. E. Sperm utilization in social insects. **Annual review of entomology**, v. 31, n. 1, p. 297-320, 1986.

PAGE, R. E.; PENG, C. Y. S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental gerontology**, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, 2001.

PAILLARD, M.; ROUSSEAU, P.; GIOVENAZZO, P.; BAILEY, J. L. Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. **Journal of economic entomology**, v. 110, n. 4, p. 1412-1418, 2017.

PEREIRA, F. M.; GONÇALVES, J.; OLIVIERA, L.; SILVA, A.; LOPES, J. Gargalos tecnológicos e não tecnológicos. IN: VILELA, S. L. O; ALCOFORADO-

FILHO, F. G. (Org.). **Cadeia produtiva do mel no estado do Piauí. Teresina: Embrapa Meio-Norte**, p. 30-49, 2000.

PETROCELLI, H.; BATISTA, C.; GOSÁLVEZ, J. Seasonal variation in sperm characteristics of boars in southern Uruguay. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 44, n. 1, p. 1-7, 2015.

PORTUGAL, J.; WARING, M. J. Assignment of DNA binding sites for 4', 6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 949, n. 2, p. 158-168, 1988.

RHODES, J. W. Drone honey bees: rearing and maintenance. **Agnote DAI**, v. 112, 2002.

RHODES, J.; SOMERVILLE, D. Introduction and Early Performance of Queen Bees: Some Factors Affecting Success: a Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. **Rural Industries Research and Development Corporation**, 2003.

RHODES, J. W. HARDEN, S.; SPOONER-HART, R.; ANDERSON, D. L.; WHEEN, G. Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. **Apidologie**, v. 42, n. 1, p. 29-38, 2011.

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

RINDERER, T. E.; COLLINS, A. M.; PESANTE, D.; DANIEL, R.; LANCASTER, V.; BAXTER, J. A comparison of Africanized and European drones: weights, mucus gland and seminal vesicle weights, and counts of spermatozoa. **Apidologie**, v. 16, n. 4, p. 407-412, 1985.

RINDERER, T. E. Africanized bees: the Africanization process and potential range in the United States. **Bulletin of the ESA**, v. 32, n. 4, p. 222-227, 1986.

ROBERTS, W. C. Performance of the queen bee. **American Bee Journal**, v. 85, p. 185-186, 1946.

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

RUTTNER, F. **Queen rearing; biological basis and technical instruction**. 1983

SAWARKAR, A. B.; TEMBHARE, D. B. Histomorphological study of the male reproductive system in the Indian drone Honeybee, *Apis cerana indica* (Hymenoptera). In: **National Conference on Advances in Bioscience & Environmental Science: Present & Future (ABES)**. p. 63, 2015.

SCHLÜNS, H. E. A.; VAN PRAAGH, J.; MORITZ, R. F. Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. **Apidologie**, v. 34, n. 6, p. 577-584, 2003.

SILVA, E. C. A.; ALVES, M. L. T.; M.; SILVA, R. M. B.; MORETI, A. C. C. Longevidade de rainhas de abelhas africanas neotropicais (*Apis mellifera* L.). **Periódicos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, p. 57 – 62, 1991.

SOUSA, P. C.; SANTOS, E. A.; SOUZA, A. L.; LIMA, G. L.; BARROS, F. F.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 924-930, 2013.

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**, v. 13, n. 2, 2012.

STRAUB, L.; VILLAMAR-BOUZA, L.; BRUCKNER, S.; CHANTAWANNAKUL, P.; GAUTHIER, L.; KHONGPHINITBUNJONG, K.; RETSCHNIG, G.; TROXLER, A.; VIDONDO, B.; NEUMANN, P.; WILLIAMS, G. R. Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 283, n. 1835, p. 20160506, 2016.

TARLIYAH, L.; BOEDIONO, Ar.; WALUJO, D. PERGERAKAN SPERMATOZOA LEB AH MADU *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) PADA

BERBAGAI SUHU PENYIMPANAN DALAM MEDIA PENGECER DENGAN KADAR GLUKOSA YANG BERBEDA. **Media Veteriner**, v. 6, n. 4, p. 15-20, 1999.

TARPY, D. R.; HATCH, S.; FLETCHER, D. J. C. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. **Animal behaviour**, v. 59, n. 1, p. 97-101, 2000.

TARPY, David R.; OLIVAREZ JR, Ray. 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.

TAYLOR, M. A.; GUZMAN-NOVOA, E.; MORFIN, N.; BUHR, M. M. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 149-159, 2009.

TOURMENTE, M.; CARDOZO, G. A.; GUIDOBALDI, H. A.; GIOJALAS, L. C.; BERTONA, M.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm motility parameters to evaluate the seminal quality of *Boa constrictor occidentalis*, a threatened snake species. **Research in veterinary science**, v. 82, n. 1, p. 93-98, 2007.

TRENTIN, J. M. **Tampões e antioxidantes na qualidade do sêmen de pôneis**. 2018. 87 f. Tese de Doutorado - Curso de Medicina Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

VAN-ENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, p. S80-S95, 2010.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 448-462, 2008.

VERMA, L. R. Biology of honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. 1. Effect of different diluents on motility and survival. **Apidologie**, v. 9, n. 3, p. 167-174, 1978.

VIDAL, M. F. Efeitos da seca de 2012 nas exportações nordestinas de mel. **Informe Rural**, v.8, n.3, p.1-6, 2014.

VILELA, S. L. O. Cadeia produtiva do mel no estado do Rio Grande do Norte. **SEBRAE-RN**; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 128 p., 2002.

WANG, W. LUO, J.; SUN, S.; XI, L.; GAO, Q.; HAILE, A. B.; ZHANG, W.; SHI, H. The Effect of Season on Spermatozoa Motility, Plasma Membrane and Acrosome Integrity in Fresh and Frozen–Thawed Semen from Xinong Saanen Bucks. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 1, p. 23-28, 2015.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

WEGENER, J.; MAY, T.; KNOLLMANN, U.; KAMP, G.; MÜLLER, K. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. **Cryobiology**, v. 65, n. 2, p. 126-131, 2012.

WINSTON, M. L. The biology of the honey bee. **Harvard university press**, 1991.

WOYKE, J.; RUTTNER, F. An anatomical study of the mating process in the honeybee. **Bee World**, v. 39, n. 1, p. 3-18, 1958.

WOYKE, J. Natural and artificial insemination of queen honeybees. **Bee World**, v. 43, n. 1, p. 21-25, 1962.

WOYKE, J. Causes of repeated mating flights by queen honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 3, n. 1, p. 17-23, 1964.

WOYKE, J.; WILDE, J.; WILDE, M. *Apis dorsata* drone flights, collection of semen from everted endophalli and instrumental insemination of queens. **Apidologie**, v. 32, n. 5, p. 407-416, 2001.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47-64, 2016.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: techniques and analysis. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 159-165, 2006.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Dados brutos (sem estatísticas) dos parâmetros ambientais e dos parâmetros espermáticos do período de safra e entressafra.

Colmeia	Data	Temp. Média (°C)	Umid. Média (%)	Pec. Pluvial (mm)	Período	Zangão (Unidade)	Motilidade (%)	Concentração (5 µL)	Viabilidade (%)
5	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	01	90	122	70
5	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	02	90	215	68
5	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	03	100	233	86
5	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	04	90	107	63
5	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	05	100	283	67
24	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	06	70	189	88
24	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	07	50	79	95
24	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	08	60	186	83
24	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	09	80	217	92
24	06/03/2018	27,9	80,7	0	Safra	10	70	176	91
22	08/03/2018	27,6	79,0	0	Safra	11	80	157	85
22	08/03/2018	27,6	79,0	0	Safra	12	90	149	67
22	08/03/2018	27,6	79,0	0	Safra	13	100	87	77
22	08/03/2018	27,6	79,0	0	Safra	14	70	73	57
22	08/03/2018	27,6	79,0	0	Safra	15	70	81	73
17	21/03/2018	28,4	76,3	0	Safra	16	95	83	47
17	21/03/2018	28,4	76,3	0	Safra	17	95	233	90
17	21/03/2018	28,4	76,3	0	Safra	18	100	132	96
17	21/03/2018	28,4	76,3	0	Safra	19	90	241	68
17	21/03/2018	28,4	76,3	0	Safra	20	90	264	63
26	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	21	90	246	98
26	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	22	90	233	91

26	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	23	90	204	80
26	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	24	90	238	97
26	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	25	95	226	98
27	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	26	80	178	92
27	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	27	90	68	94
27	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	28	95	232	94
27	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	29	95	214	92
27	22/03/2018	28,8	72,1	0	Safra	30	85	183	94
18	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	31	90	183	72
18	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	32	80	167	77
18	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	33	95	179	88
18	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	34	85	168	74
18	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	35	80	136	47
21	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	36	60	122	79
21	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	37	95	248	92
21	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	38	85	241	94
21	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	39	90	199	95
21	05/06/2018	25,5	77,2	0	Safra	40	80	234	97
10	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	41	90	138	70
10	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	42	85	147	91
10	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	43	80	83	66
10	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	44	90	212	97
10	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	45	80	193	90
03	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	46	85	130	94
03	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	47	95	213	83
03	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	48	90	226	95
03	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	49	85	204	92
03	06/06/2018	26,0	80,4	0	Safra	50	80	198	95
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	01	90	178	94

ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	02	10	51	61
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	03	80	187	85
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	04	50	62	82
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	05	50	137	71
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	06	40	67	78
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	07	70	43	98
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	08	50	123	72
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	09	60	157	80
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	10	50	143	63
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	11	10	72	66
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	12	20	97	69
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	13	95	121	60
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	14	10	65	58
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	15	20	58	71
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	16	30	59	53
ES	30/10/2018	28,5	69,4	0	Entressafra	17	90	198	96
ES	20/11/2018	29,0	62,3	0	Entressafra	18	30	183	53
ES	20/11/2018	29,0	62,3	0	Entressafra	19	45	98	55
ES	20/11/2018	29,0	62,3	0	Entressafra	20	30	68	72
ES	20/11/2018	29,0	62,3	0	Entressafra	21	60	192	71
ES	20/11/2018	29,0	62,3	0	Entressafra	22	50	147	63
ES	20/11/2018	29,0	62,3	0	Entressafra	23	80	189	89
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	24	60	136	66
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	25	70	145	71
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	26	50	122	73
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	27	45	85	59
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	28	70	99	68
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	29	30	187	67
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	30	65	165	96

ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	31	50	167	60
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	32	70	99	72
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	33	70	139	74
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	34	45	115	61
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	35	20	167	82
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	36	30	191	84
ES	27/11/2018	29,7	63,4	0	Entressafra	37	55	51	71
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	38	60	111	85
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	39	45	154	66
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	40	50	133	62
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	41	50	86	51
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	42	65	97	57
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	43	50	113	53
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	44	70	89	70
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	45	80	126	71
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	46	65	76	59
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	47	55	128	86
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	48	75	168	91
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	49	30	53	48
ES	11/12/2018	28,7	68,9	0	Entressafra	50	55	196	81