



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE ZOOTECNIA

LILIAN LEAL DANTAS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE
ZANGÕES DE ABELHAS ITALIANAS (*Apis mellifera ligustica*, Linnaeus, 1758) E
ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera L.* Linnaeus, 1758) NO SEMIÁRIDO DO
RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.**

MOSSORÓ

2025

LILIAN LEAL DANTAS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE
ZANGÕES DE ABELHAS ITALIANAS (*Apis mellifera ligustica* Linnaeus, 1758) E
ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L. Linnaeus, 1758) NO SEMIÁRIDO DO
RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Zootecnia.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva, Prof.
Dr.

MOSSORÓ

2025

© 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 tomar-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.

DD192 Dantas, Lilian.
a AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS DE ZANGÕES DE ABELHAS ITALIANAS (*Apis mellifera ligustica*, Linnaeus, 1758) E ABELHAS
AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L. Linnaeus, 1758)
NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL /
Lilian Dantas. - 2025.
51 f. : il.

Orientador: Alexandre Silva.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Zootecnia, 2025.

1. zangões. 2. sêmen. 3. conservação. 4.
parâmetros espermáticos. 5. microscopia eletrônica
de varredura. I. Silva, Alexandre, orient. II.
Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

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.

LILIAN LEAL DANTAS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE
ZANGÕES DE ABELHAS ITALIANAS (*Apis mellifera ligustica* Linnaeus, 1758) E
ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera* L. Linnaeus, 1758) NO SEMIÁRIDO DO
RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Zootecnia.

Defendida em: __ 01 __ / __ 07 __ / __ 2025 ____.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ALEXANDRE RODRIGUES SILVA**
Data: 02/07/2025 21:02:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente

Documento assinado digitalmente
 **KATIA PERES GRAMACHO**
Data: 02/07/2025 22:39:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Kátia Peres Gramacho, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **ANDREIA MARIA DA SILVA**
Data: 03/07/2025 08:15:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Andréia Maria da Silva, Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Amailza Leal, e ao meu pai, Clementino Dantas, por todo apoio, amor e incentivo ao longo da minha vida. Obrigada por me tornarem quem sou, por toda a educação e pelos ensinamentos. Vocês são fundamentais na minha vida, e nada disso seria possível sem vocês.

Às minhas primas Valéria Dantas e Vanessa Dantas, a Frank de Jong e à minha amiga, Titia, agradeço por sempre estarem ao meu lado, torcendo e vibrando comigo em cada etapa da minha vida.

Ao meu passarinho Pequeno, que, durante nove anos, foi meu companheiro fiel e melhor amigo. Você me ensinou e me mostrou o amor mais puro que existe neste mundo. Esteve presente nos meus melhores e piores momentos, me viu crescer desde o ensino fundamental até a graduação, comendo as folhas do caderno, o fio do notebook, me fazendo parar tudo que estava fazendo, afastando minha mão para alisar sua cabeça. Você faz tanta falta, meu cheiroso. Você foi muito mais que uma calopsita.

À minha namorada, Leila Leite. Compartilhar a vida com você é incrível. Os dias são melhores quando estamos juntas. Obrigada por todo amor, apoio e incentivo, meu bem, e por acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu duvidava.

Ao meu amigo, Jonatas Marinho, por dividir comigo essa jornada desde o primeiro semestre até o encerramento deste ciclo. Obrigada por tornar as aulas e os dias mais leves e divertidos, por dividir as tensões das provas e apresentações de trabalho. Minha graduação não teria sido a mesma sem você, não existe Lilian sem Jonatas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Rodrigues, por contribuir para minha formação e por me mostrar um lado incrível da ciência, que me inspira cada dia mais. Sua dedicação à pesquisa é fascinante. Obrigada por seus ensinamentos e conselhos, que levarei para minha vida pessoal e profissional.

À Andréia Maria, por todos os conhecimentos compartilhados, pela disponibilidade, apoio, orientações e incentivo à pesquisa desde o primeiro dia que entrei no laboratório. Você é uma grande inspiração.

Aos meus amigos do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, por todo aprendizado, pela dedicação e pelo companheirismo ao longo dessa jornada. Cada experiência compartilhada contribuiu para minha formação acadêmica e para meu crescimento pessoal. Vocês são incríveis, e eu sou muito feliz em fazer parte dessa equipe. Sou grata por tudo que

aprendi com vocês. Em especial, ao meu amigo, Pedro Augusto e Lizziane Constância por tornar a rotina do laboratório e dos experimentos mais leve e divertida.

Ao meu amigo, Caio Sérgio, por todo apoio e incentivo, pelas conversas, risadas, conselhos e aprendizados que contribuíram para meu crescimento, tanto profissional quanto pessoal.

À banca examinadora, Profa. Katia Peres e Profa. Andréia Maria, por aceitarem fazer parte deste momento tão importante, pelos conhecimentos compartilhados e por contribuírem para o aprimoramento deste trabalho.

À equipe do Núcleo de Capacitação Tecnológica em Apicultura da UFERSA, em especial ao Leandro Alves, pela parceria e troca de conhecimentos.

Muito obrigada!!

RESUMO

As abelhas são polinizadores essenciais do ponto de vista ecológico e econômico, com diversas espécies que diferem morfológica e fisiologicamente. Assim, compreender as variações nos parâmetros reprodutivos entre genótipos é essencial, especialmente dada a escassez de estudos comparativos conduzidos no mesmo ambiente. Este estudo teve como objetivo comparar as características espermáticas de zangões italianos (*Apis mellifera ligustica*) e africanizados (*Apis mellifera L.*) criados no bioma Caatinga. Para tanto, foram utilizados nove zangões italianos e dezesseis africanizados sexualmente maduros de diferentes colônias. A coleta de sêmen foi realizada pela técnica de eversão do endofalo, seguida de diluição em solução fisiológica na proporção de 1:20. Os parâmetros analisados incluíram: motilidade, viabilidade espermática, integridade funcional da membrana plasmática, morfologia e morfometria, além da análise ultraestrutural dos espermatozoides por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados foram expressos como média e erro padrão. Para a análise estatística, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos resíduos e o teste de Bartlett para verificar a homoscedasticidade. A comparação entre os grupos foi realizada por meio dos testes de Mann-Whitney e o teste t Student. Todas as análises foram conduzidas no software GraphPad Prism 9.3, adotando-se um nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram motilidade de 90% em ambos os genótipos. A viabilidade espermática foi de $82,4 \pm 2,5\%$ nos italianos e $81,1 \pm 2,4\%$ nos africanizados, enquanto a integridade funcional da membrana plasmática foi de $93,4 \pm 1,8\%$ e $91,6 \pm 1,5\%$, respectivamente. Em relação à morfologia, a porcentagem de espermatozoides normais com cauda reta foi de $10,89 \pm 1,66\%$ nos italianos e de $12,06 \pm 1,01\%$ nos africanizados. Já a porcentagem de espermatozoides normais com cauda enrolada foi de $88,56 \pm 1,7$ nos italianos e de $87,63 \pm 1,1$ nos africanizados, sendo essa uma característica decorrente do padrão de nado dos espermatozoides. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre esses parâmetros. No entanto, a morfometria da cabeça dos espermatozoides foi significativamente maior ($P < 0,05$) nos italianos ($10,04 \pm 0,03 \mu\text{m}$) em comparação aos africanizados ($9,33 \pm 0,04 \mu\text{m}$). A análise de microscopia eletrônica não revelou diferenças ultraestruturais entre os genótipos. Em conclusão, há grande similaridade nos parâmetros espermáticos de ambos os genótipos sob as mesmas condições ambientais, indicando a viabilidade de aplicar estratégias reprodutivas semelhantes.

Palavras-chave: zangões; sêmen; conservação; parâmetros espermáticos; microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

Bees are essential pollinators from both ecological and economic perspectives, with various species differing morphologically and physiologically. Therefore, understanding the variations in reproductive parameters among genotypes is crucial, especially given the scarcity of comparative studies conducted under the same environmental conditions. This study aimed to compare the sperm characteristics of Italian drones (*Apis mellifera ligustica*) and Africanized drones (*Apis mellifera* L.) reared in the Caatinga biome. For this purpose, nine sexually mature Italian drones and sixteen Africanized drones from different colonies were used. Semen was collected using the endophallus eversion technique and diluted in physiological solution at a 1:20 ratio. The analyzed parameters included: motility, sperm viability, functional integrity of the plasma membrane, morphology, morphometry, and ultrastructural analysis of the spermatozoa by scanning electron microscopy (SEM). Results were expressed as mean $\pm$ standard error. Statistical analyses included the Shapiro-Wilk test to assess the normality of residuals and the Bartlett test to verify homoscedasticity. Group comparisons were performed using the Mann-Whitney and Student's t-tests. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism version 9.3, with a significance level set at 5%. The results showed 90% motility in both genotypes. Sperm viability was $82.4 \pm 2.5\%$ in Italian drones and $81.1 \pm 2.4\%$ in Africanized drones, while the functional integrity of the plasma membrane was $93.4 \pm 1.8\%$ and $91.6 \pm 1.5\%$, respectively. Regarding morphology, the percentage of normal spermatozoa with straight tails was $10.89 \pm 1.66\%$ in the Italian group and $12.06 \pm 1.01\%$ in the Africanized group. The percentage of normal spermatozoa with coiled tails was $88.56 \pm 1.7\%$ in the Italian group and $87.63 \pm 1.1\%$ in the Africanized group, a characteristic resulting from the spermatozoa's swimming pattern. However, sperm head morphometry was significantly greater ($P < 0.05$) in Italian drones ($10.04 \pm 0.03 \mu\text{m}$) compared to Africanized drones ($9.33 \pm 0.04 \mu\text{m}$). The scanning electron microscopy analysis revealed no ultrastructural differences between the genotypes. In conclusion, there is a high degree of similarity in the sperm parameters of both genotypes under the same environmental conditions, indicating the feasibility of applying similar reproductive strategies.

Keywords: drones; semen; conservation; sperm parameters; scanning electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Zangão (<i>Apis mellifera</i>). Fonte: Blog Apiário Esperança.....	19
Figura 2	–	Esquema do aparelho reprodutor masculino de <i>A. mellifera</i> . A. Macho recém-emergido. B. Macho maduro para o acasalamento. Notar a involução dos testículos (T) e o crescimento da glândula de muco (glm) no macho maduro. vd = vaso deferente; vs = vesícula seminal; de = duto ejaculador. Fonte: Landim, 2009.....	19
Figura 3	–	Sistema reprodutivo dos zangões. Fonte: Ontario Beekeeping Manual, 1993.	20
Figura 4	–	Representação esquemática de um túbulo seminífero de testículo maduro e correspondentes Eletromicrografias mostrando as várias regiões ao longo de seu comprimento. A. Germário, B. Zona de crescimento, C. Zona de maturação, D. Zona de transformação; E. Zona com espermatozóides. ca = célula apical; ci = células do cisto; ct = cistócitos; e = espermatozóides; ep = espermátides; ept = primeira divisão da meiose – espermátócitos I; espA = espermatogônia A; espB = espermatogônia B ou cistoblasto; f = fusoma; mp = membrana peritoneal; fu = fusoma; esp = espermátides. Fonte: Landim, 2009.....	21
Figura 5	–	Produção de espermatozoides em zangões durante o desenvolvimento. A espermatogênese, a produção de espermatozoides, ocorre durante o desenvolvimento larval tardio e pré-pupal. A espermiogênese, a diferenciação espermática, ocorre durante a fase de pupação. Assim que os zangões emergem como adultos, a produção de espermatozoides já está completa. No entanto, os zangões produzem fluidos seminais nas glândulas mucosas durante o início da emergência adulta. Fonte: Amy Geffre (Adaptado).....	22
Figura 6	–	Durante a cópula, os zangões transferem espermatozoides e fluidos seminais para o oviduto da rainha, e os espermatozoides serão armazenados na spermateca. Uma vez armazenado, as rainhas usarão esses espermatozoides até a morte. Fonte: Amy Geffre (Adaptado).....	23
Figura 7	–	Espermatozoide de zangão Italiano (<i>Apis mellifera ligustica</i>).....	23

Figura 8	– Coleta sêmen zangão Africanizado (<i>Apis mellifera</i> L.). (A) Suave pressão no abdômen; (B) Eversão parcial do endófalo; (C) Eversão completa do endófalo com sêmen exposto.....	32
Figura 9	– Análises de espermatozoides de zangões. (A) Viabilidade espermática de zangão italiano (<i>Apis mellifera ligustica</i>). (B) Viabilidade espermática de zangão africanizado (<i>Apis mellifera</i> L.); avaliada por sondas fluorescentes: espermatozoides viáveis (seta azul; Hoechst 33342) e não viáveis (seta vermelha; iodeto de propídio). (C) Integridade funcional da membrana plasmática (teste hiposmótico, HOST) de zangão italiano (<i>Apis mellifera ligustica</i>); membrana funcionalmente intacta com cauda levemente enrolada (seta amarela), membrana funcionalmente intacta com cauda totalmente enrolada (seta preta). (D) Integridade funcional da membrana plasmática (HOST) de zangão africanizado (<i>Apis mellifera</i> L.); membrana plasmática comprometida (seta branca), membrana funcionalmente intacta com cauda totalmente enrolada (seta preta).....	36
Figura 10	– Fotomicroscopias de espermatozoides de zangão corados com Rosa Bengala. (A) Espermatozoides italianos normais (<i>Apis mellifera ligustica</i>); (B) Espermatozoides africanizados normais (<i>Apis mellifera</i> L.); (C) Espermatozoides com cauda enrolada de um zangão italiano (<i>Apis mellifera ligustica</i>); (D) Espermatozoides com cauda enrolada de um zangão africanizado (<i>Apis mellifera</i> L.); (E) Espermatozoides com cauda quebrada de um zangão africanizado (<i>Apis mellifera</i> L.).....	37
Figura 11	– Ultraestrutura dos espermatozoides da abelha zangão. (A) Italiano (<i>Apis mellifera ligustica</i>); (B) Africanizado (<i>Apis mellifera</i> L.).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Média ($Média \pm EP$) para motilidade espermática, viabilidade espermática e funcionalidade da membrana de zangões de abelhas italianas (<i>Apis mellifera ligustica</i>) e africanizadas (<i>Apis mellifera L.</i>) 35
Tabela 2	– Média ($Média \pm EP$) para morfologia e morfometria espermática de zangões italianos (<i>Apis mellifera ligustica</i>) e africanizados (<i>Apis mellifera L.</i>).....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
mg	Miligrama
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
mOsm	Miliosmol
EP	Erro Padrão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
°C	Graus Célsius

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
°	Graus
'	Minutos
"	Segundos
%	Porcentagem
>	Maior que
<	Menor que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 BIOLOGIA E REPRODUÇÃO DE <i>APIS MELLIFERA</i>	17
2.2 BIOLOGIA E REPRODUÇÃO DOS ZANGÕES.....	18
2.3 TÉCNICAS DE COLETA DE SÊMEN EM ABELHAS	24
2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS.....	25
2.4.1 Motilidade espermática	25
2.4.2 Viabilidade espermática.....	26
2.4.3 Integridade funcional da membrana	27
2.4.4 Morfologia espermática	27
2.4.5 Morfometria espermática	28
2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VERREDURA	28
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	39
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A polinização é essencial para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas, e as abelhas, os principais polinizadores, desempenham um papel crucial nesse processo, além de serem responsáveis pela produção de mel e outros produtos apícolas (Khalifa *et al.*, 2021). Abelhas e outros insetos são responsáveis por aproximadamente 75% das frutas e sementes consumidas pelos humanos, tornando-os fundamentais para a preservação da biodiversidade (Why Bees Matter, 2018). Mundialmente, são conhecidas mais de 20.000 espécies de abelhas descritas, distribuídas em sete famílias distintas, que se diferenciam tanto morfológicamente quanto fisiologicamente (Ascher, Pickering 2020).

No entanto, nas últimas décadas, tem-se observado um declínio nas populações desses polinizadores, devido à perda, alteração e fragmentação de habitats naturais (Kline; Joshi, 2020), da intensificação das práticas agrícolas e da monocultura (Hemberger; Crossley; Gratton, 2021), da exposição a parasitas e pesticidas (Bird *et al.*, 2021), do aumento das temperaturas climáticas (Soroye; Newbold; Kerr, 2020). Nesse contexto, é essencial compreender a biologia e os parâmetros reprodutivos de diferentes espécies de abelhas para promover ajustes de manejo e aprimorar os protocolos de conservação de germoplasma, ampliando o conhecimento sobre a reprodução dessas espécies.

Um fator limitante para a reprodução é a qualidade do sêmen (Yániz; Silvestre; Santolaria, 2020, Zhao *et al.*, 2021), visto que a rainha armazena espermatozoides viáveis em sua espermateca por vários anos (Degueldre; Aron, 2023). Isso determinará o sucesso reprodutivo da rainha e a produtividade da colônia (Pettis *et al.*, 2016), bem como o sucesso da inseminação instrumental (Khan *et al.*, 2022; Güler *et al.*, 2022). Nesse contexto, o potencial de fertilidade do macho pode influenciar a saúde geral da colônia (Murray *et al.*, 2023).

Estudos indicam que pode haver diferenças na qualidade do sêmen entre machos de diferentes raças animais, como aves (Ayeneshet *et al.*, 2024), porcos (Wysokińska & Szablicka, 2021) e outros mamíferos. Para as abelhas, comparações sobre a qualidade reprodutiva de abelhas caucasianas (*Apis mellifera caucasica*) e italianas (*Apis mellifera ligustica*) conduzidas em Ancara, Turquia, revelaram que os zangões caucasianos apresentam peso corporal, volume ejaculado, número de espermatozoides nas vesículas seminais significativamente maiores, além de maior proporção de ejaculação, eficiência de ejaculação e eficiência de coleta de sêmen do que os italianos (Kahya; Gençer, 2023). Esses achados indicam que pode haver diferenças nos parâmetros reprodutivos entre os outros genótipos de

abelhas. No entanto, estudos comparativos são escassos. Os principais estudos concentram-se na caracterização de detalhes espermáticos de indivíduos específicos, conforme relatado para zangões africanizados (*Apis mellifera L.*) no bioma Caatinga no Brasil (Moraes *et al.*, 2022) e para zangões de abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*) na região da Campânia, na Itália (Power *et al.*, 2019).

Apesar da influência genética, fatores ambientais também podem contribuir para diferenças nas características reprodutivas e espermáticas, mesmo entre zangões com origens genéticas e distribuição geográfica semelhantes (Taha; Alqarni, 2013; Kahya; Gençer, 2023). Assim, a hipótese que norteia esta pesquisa é que zangões de diferentes genótipos, criados em condições ambientais semelhantes no bioma Caatinga, podem apresentar variações significativas na qualidade espermática, considerando que fatores genéticos, adaptativos e fisiológicos influenciam diretamente na produção, estrutura e funcionalidade das células espermáticas (Rangel; Fisher, 2019).

Dada a importância prática deste tema, a identificação de possíveis diferenças nos parâmetros espermáticos entre genótipos teria aplicações importantes para o manejo reprodutivo de colônias no bioma Caatinga. Permitiria a seleção de genótipos com vantagens reprodutivas e maior adequação para programas de melhoramento genético, inseminação instrumental ou conservação de germoplasma. Por outro lado, a ausência de diferenças significativas também seria relevante, pois indicaria que ambos os genótipos são igualmente viáveis do ponto de vista reprodutivo, proporcionando maior flexibilidade nas práticas de manejo.

Nessa perspectiva, é necessário compreender de que forma as diferenças genéticas entre os genótipos impactam as características espermáticas sob uma mesma condição ambiental, a fim de aprofundar o conhecimento sobre o potencial reprodutivo desses genótipos. Portanto, este trabalho busca responder à seguinte questão: existe diferença entre os parâmetros espermáticos dos genótipos *Apis mellifera ligustica* e *Apis mellifera L.* criadas em condições ambientais semelhantes no bioma Caatinga?

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOLOGIA E REPRODUÇÃO DE *APIS MELLIFERA*

No Brasil, a Apicultura teve início no ano de 1839, quando o Padre Antônio Carneiro conseguiu autorização de Dom Pedro II para importar de Portugal para o Rio de Janeiro, algumas colônias de abelhas da espécie *Apis mellifera* (abelha europeia) (Kerr, 1980). No intuito de buscar quais abelhas apresentavam maior potencial de adaptação no Brasil, o pesquisador de apicultura brasileira Dr. Warwick Estevan Kerr comparou a produtividade das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata*, com as abelhas europeias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) (Camargo; Pereira; Lopes, 2002). Acidentalmente, as abelhas africanas cruzaram com as abelhas europeias, originando populações poli-híbridas, conhecidas como abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) (Kerr, 1967).

Essa hibridação fez com que as abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*), se diferenciasse fisiologicamente das abelhas europeias e africanas, apresentando elevada capacidade de defesa e adaptação a novos ambientes, além de uma capacidade reprodutiva muito mais eficiente, com maior tendência à enxameação. Esse comportamento pode ser atribuído às características genéticas e comportamentais que favorecem a reprodução e a expansão de novas colônias. Também se destacam por sua rusticidade, podendo ser mantidas em climas mais severos, maior tolerância a doenças, melhores desempenho na polinização e maior produção de mel e própolis (de Jong, 1996).

Além disso, a organização social das abelhas é composta por três castas: rainha, operárias e zangões, que apresentam morfologia e funções distintas. Seu desenvolvimento ocorre em três fases: ovo, larva e pupa. Nas abelhas europeias (*Apis mellifera*), esse ciclo de desenvolvimento é mais longo, com duração de 21 dias para as operárias, 24 dias para os zangões e 16 dias para a rainha. Enquanto nas abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*), o ciclo é ligeiramente mais curto: 20 dias para as operárias, 24 dias para os zangões e 15 dias para rainha (MAPA, 2023).

A principal função da rainha na colmeia é a ovoposição, podendo depositar ovos fertilizados (diplóides) ou não fertilizados (haplóides). Os ovos diploides, que são ovos fecundados, podem originar rainhas ou operárias, dependendo da quantidade de dieta de geleia real fornecida durante seu desenvolvimento larval (Slater; Yocum; Bowsher, 2020). Já os ovos haplóides, que não são fecundados, desenvolvem-se exclusivamente em zangões.

O sistema reprodutor das fêmeas das abelhas inclui dois ovários, formados por ovariolos ou túbulos de ovarianos, com número e comprimento variáveis de 160 a 180 ovariolos por ovário, além de um par de ovidutos laterais que convergem para um oviduto comum mediano, o qual se liga à vagina. Adicionalmente, o sistema reprodutor conta com a espermateca e uma glândula acessória. A espermateca é uma bolsa globular única onde os espermatozoides são armazenados, comunicando-se com a extremidade proximal dorsal do oviduto comum por um duto curto. Já a glândula acessória, está localizada na face dorsal da vagina (Landim, 2009).

As rainhas podem armazenar entre 3 e 8 milhões de espermatozoides, que serão utilizados ao longo de sua vida reprodutiva, a qual dura, em média, de 1 a 2 anos (Szabo; Heikel, 1987; Al-Lawati; Kamp; Bienefeld, 2009). Durante os voos de acasalamento, as rainhas copulam com 20 a 25 machos (Moritz, 1984; Page; Peng, 2001). Esse elevado número de acasalamentos contribui para o sucesso reprodutivo da rainha, aumentando a diversidade genética da prole e prolongando sua vida útil. No entanto, esse sucesso está condicionado à produção de zangões de boa qualidade seminal e em quantidade. A poliandria da rainha é um fator determinante para o desempenho reprodutivo, influenciando diretamente a sobrevivência e a produtividade da colônia (Pettis *et al.*, 2016). Por outro lado, a má qualidade seminal gera rainhas de pior qualidade, sendo considerada uma das principais causas de perda de colônias (Lee *et al.*, 2019).

As operárias são responsáveis por todas as atividades realizadas na colmeia e apresentam os mesmos órgãos reprodutivos que a abelha rainha (Dallai, 1975). No entanto, possuem de 2 a 12 ovariolos por ovário (Landim, 2009), quantidade associada à baixa concentração do hormônio juvenil durante o período larval (Winston, 1991). Nessas abelhas, a oogênese é iniciada, porém é interrompida antes da vitelogênese devido à ação do feromônio produzido pela glândula mandibular da rainha, o qual desencadeia morte celular programada, inibindo assim a produção dos ovos (Ronai; Oldroyd; Vergoz, 2016).

2.2 BIOLOGIA E REPRODUÇÃO DOS ZANGÕES

Os zangões têm como principal função na colmeia o acasalamento. Eles não executam nenhum trabalho para a colônia e são alimentados pelas operárias. Suas estruturas relacionadas à orientação, ao voo e ao acasalamento são altamente desenvolvidas, apresentando olhos compostos maiores e asas mais largas (Figura 1) do que as das operárias (Winston, 1991).



Figura 1. Zangão (*Apis mellifera*). Fonte: Blog Apiário Esperança.

O aparelho reprodutor masculino dos zangões é composto por pares de testículos, vasos eferentes, ductos genitais, um par de glândulas acessórias (vesículas seminais e as glândulas de muco) (Figura 2), além do endofalo interno, que é evertido durante a ejaculação, e por um par de ganchos copulatórios, responsáveis por prender a rainha durante o acasalamento (Slater, 2022; Winston, 1991) (Figura 3). Os ductos genitais são formados pelos ductos deferentes, provenientes de cada testículo, e por um canal ejaculador único e mediano (Landim, 2009). O sistema reprodutivo do zangão é projetado para que o órgão genital seja evertido no interior da rainha durante a cópula (Winston, 1991).

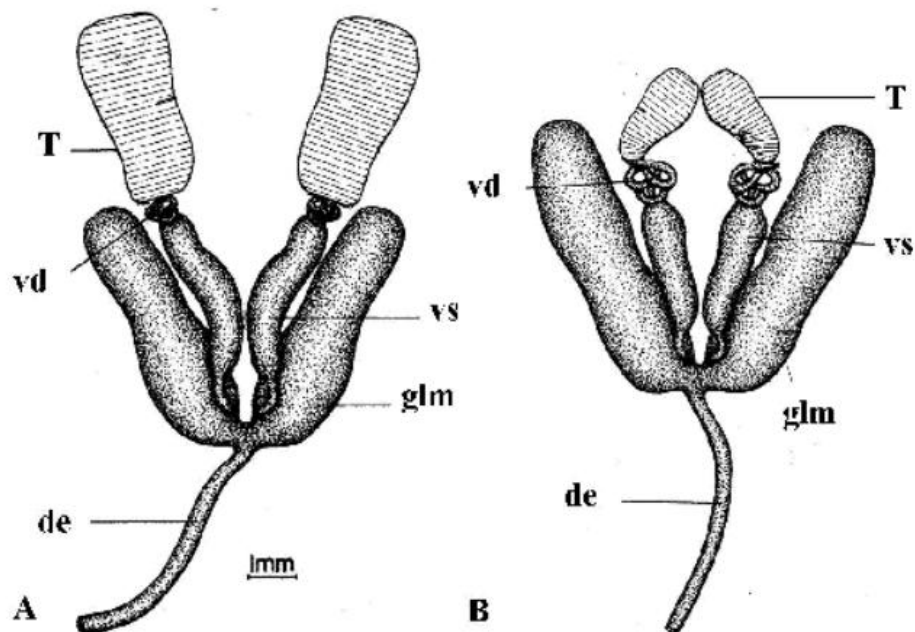


Figura 2. Esquema do aparelho reprodutor masculino de *A. mellifera*. A. Macho recém-emergido. B. Macho maduro para o acasalamento. Notar a involução dos testículos (T) e o crescimento da glândula de muco (glm) no macho maduro. vd = vaso deferente; vs = vesícula seminal; de = duto ejaculador. Fonte: Landim, 2009.

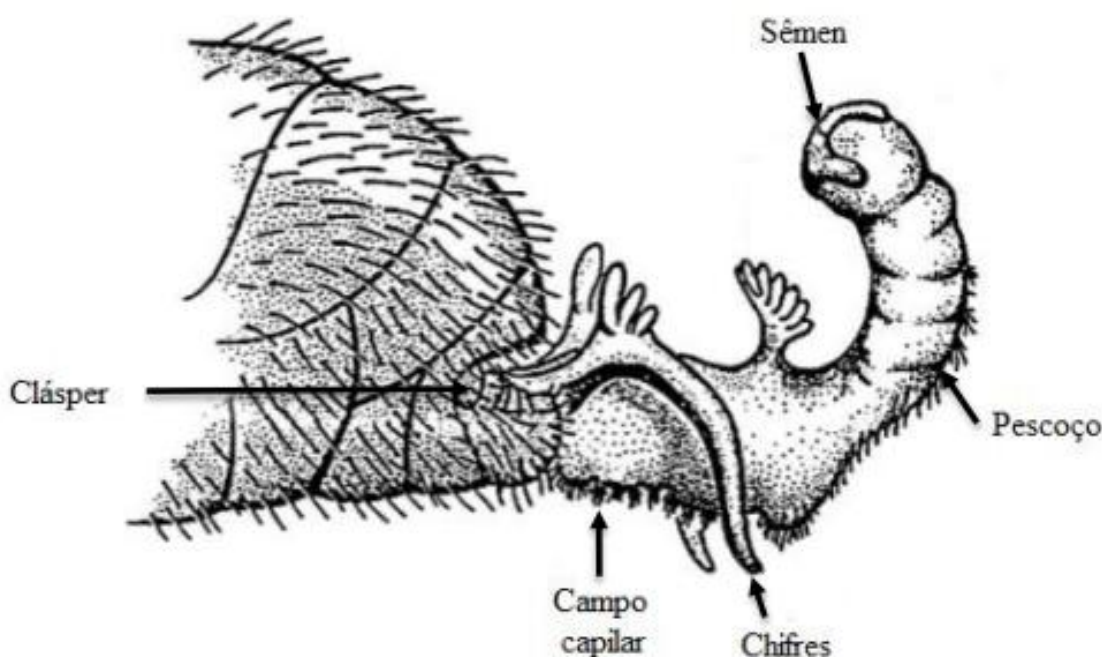


Figura 3. Sistema reprodutivo dos zangões. Fonte: Ontario Beekeeping Manual, 1993.

A espermatogênese dos zangões dura, em média, 25 dias. Eles produzem espermatozoides apenas durante o seu desenvolvimento nas fases larval e pupal (Slater, 2022). Na fase larval, ocorre a espermatogênese com a meiose I; na fase pré-pupa, dá-se continuidade ao processo de espermatogênese com a meiose II; e, na fase de pupal, ocorre a espermiogênese (Figura 4 e 5). Nesse processo, as espermatogônias diferenciam-se em espermatozoides, completando assim a produção espermática (Slater, 2022; Lago *et al.*, 2020). Em seguida, os espermatozoides migram dos testículos para as vesículas seminais, momento em que os zangões são considerados sexualmente maduros (Figura 5) (Klein *et al.*, 2021). Esses espermatozoides permanecem armazenado até o acasalamento, quando é totalmente ejaculado juntamente com o muco proveniente das grandes glândulas de muco. Assim, os zangões eclodem na fase adulta já com todos os espermatozoides que irão produzir formados (Lago *et al.*, 2020).

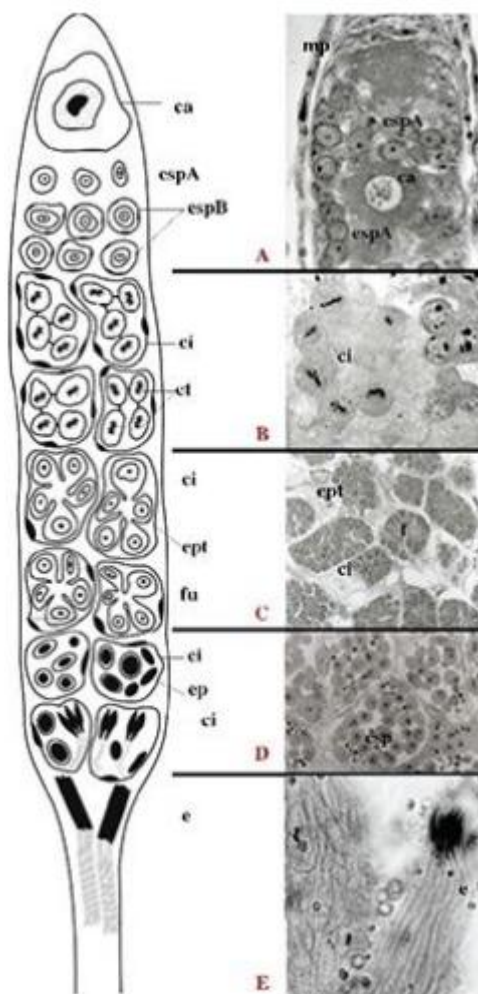


Figura 4. Representação esquemática de um túbulo seminífero de testículo maduro e correspondentes Eletromicrografias mostrando as várias regiões ao longo de seu comprimento. A. Germário, B. Zona de crescimento, C. Zona de maturação, D. Zona de transformação; E. Zona com espermatozoides. ca = célula apical; ci = células do cisto; ct = cistócitos; e = espermatozoides; ep = espermátides; ept = primeira divisão da meiose – espermatócitos I; espA = espermatogônia A; espB = espermatogônia B ou cistoblasto; f = fusoma; mp = membrana peritoneal; fu = fusoma; esp = espermátides. Fonte: Landim, 2009.

Desde a eclosão (emergência) até à maturidade sexual, os testículos dos zangões sofrem uma redução significativa de tamanho, sofrendo atrofia ou involução, em média 90,9% (desvio padrão $\pm 0,3\%$) (Figura 2). Esse processo está relacionado à maturação sexual, durante a qual ocorre a conclusão da espermiogênese, a evacuação dos espermatodesmos - estruturas formadas por aglomerados de espermatozoides unidos por resíduos citoplasmáticos após a espermatogênese (Smith, 1968) - dos lúmens tubulares, atrofia progressiva das células foliculares, uma vez que o espermatozoide é completamente transferido para os vasos deferentes e vesículas seminais, resultando em atrofia completa e colapso do parênquima testicular (Klein *et al.*, 2021).

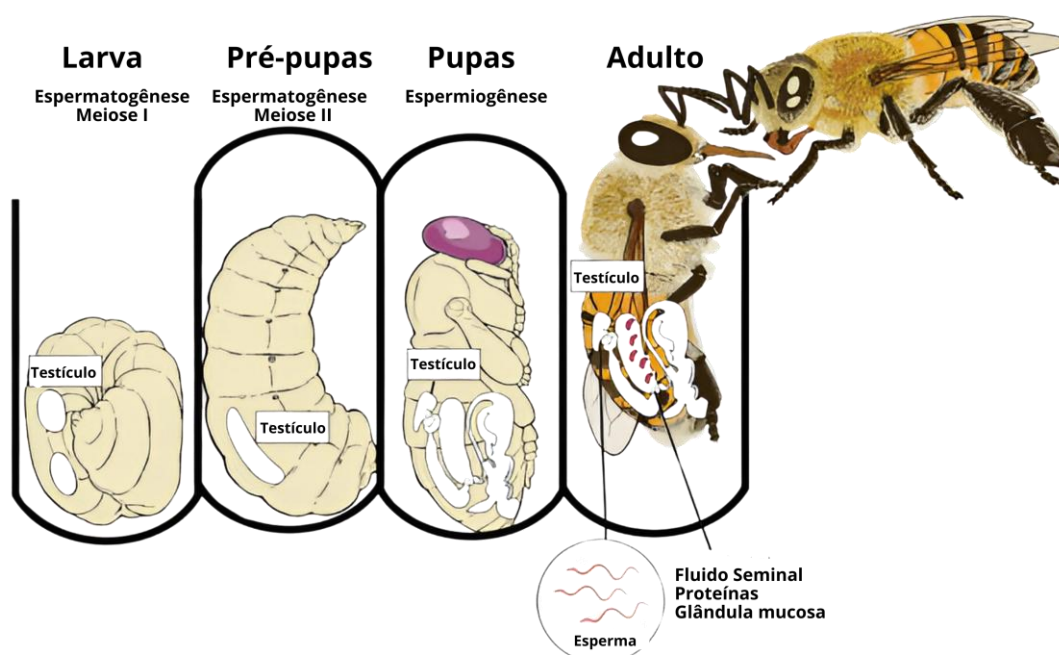


Figura 5. Produção de espermatozoides em zangões durante o desenvolvimento. A espermatogênese, a produção de espermatozoides, ocorre durante o desenvolvimento larval tardio e pré-pupal. A espermiogênese, a diferenciação espermática, ocorre durante a fase de pupação. Assim que os zangões emergem como adultos, a produção de espermatozoides já está completa. No entanto, os zangões produzem fluidos seminais nas glândulas mucosas durante o início da emergência adulta. Fonte: Slater, 2022 (Adaptado).

Durante os primeiros dias de vida, os zangões adultos são alimentados exclusivamente pelas operárias jovens, responsáveis pela produção de comida de cria. Com o passar do tempo, eles passam a consumir mel diretamente dos alvéolos e, aproximadamente, uma semana de idade, tornam-se capazes de se alimentar sozinhos (Winston, 1991). A alimentação oferecida ao zangão recém-emergido consiste em uma mistura de comida de cria larval, pólen e mel e, em alguns casos, inclui produto regurgitado diretamente da vesícula melífera (Free, 1957; Ruttner, 1966; Haydak, 1970). A produção de espermatozoides não depende diretamente da quantidade de proteína fornecida aos zangões jovens; no entanto, a comida de cria e o pólen fornecidos podem influenciar sua longevidade e capacidade de acasalamento. Os zangões mais velhos alimentam-se exclusivamente de mel no favo, o qual fornece a energia necessária para os voos de acasalamento (Winston, 1991).

Um zangão bem-sucedido, durante o acasalamento, everte seu endofalo através da câmara de ferrão da rainha, introduzindo-o no oviduto. A ponta do endofalo é composta por placas cervicais, proteínas de muco coagulantes produzidas pela glândula mucosa interna, pelo tubo do bulbo e por uma secreção lipídica laranja pegajosa, proveniente da glândula cornual (Colonello; Hartfelder, 2005). Esses fluidos seminais interagem com o sêmen, melhorando sua qualidade, prolongando o armazenamento, promovendo a fertilização e

reduzindo a competição com espermatozoides de outros machos (Baer *et al.*, 2009; Den Boer; Baer; Boomsma, 2010). Além disso, o muco estabelece uma forte conexão entre o zangão e a rainha.

O acasalamento ocorre de forma rápida e dura alguns segundos. O zangão só acasala uma vez e morre em seguida, uma vez que grande parte do endofalo é arrancado, pois permanece preso na rainha após a cópula (Figura 6).

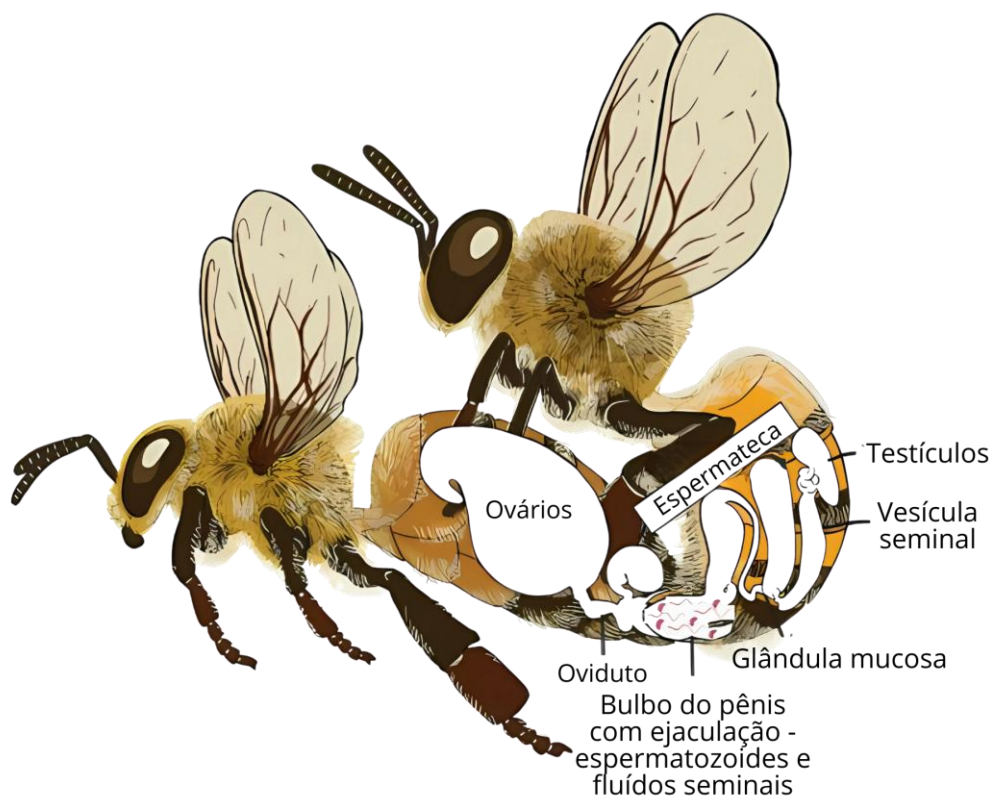


Figura 6. Durante a cópula, os zangões transferem espermatozoides e fluidos seminais para o oviduto da rainha, que eventualmente serão armazenados na espermateca. Uma vez armazenado, as rainhas usarão esse esperma até a morte. Fonte: Slater, 2022 (Adaptado).



Figura 7. Espermatozoide de zangão Italiano (*Apis mellifera ligustica*)

Os espermatozoides dos zangões são considerados células longas e filamentosas, com extremidades afiladas (Figura 7). Diversos fatores podem afetar a qualidade dos espermatozoides de zangões, como a nutrição, a idade, a estação do ano e a genética. A nutrição desempenha um papel fundamental na qualidade reprodutiva dos indivíduos. O acesso limitado ao pólen e ao néctar, bem como sua oferta inadequada desses recursos durante o desenvolvimento larval de abelhas, resulta em menor peso corporal, menor volume de

sêmen e redução da capacidade ejacutória, embora não afete a viabilidade e concentração dos espermatozoides (Czekońska, Chuda-Mickiewicz, Samborski 2015). Da mesma forma, o peso corporal pode influenciar na morfometria espermática (Bratu *et al.*, 2022), bem como no volume do sêmen, no número de espermatozoides e na sua viabilidade (Rinderer, 1985; Schlüns *et al.*, 2003). A idade afeta a viabilidade espermática (Stürup *et al.*, 2013), assim como a estação do ano exerce influência sobre os parâmetros reprodutivos dos zangões (Morais *et al.*, 2022; Rousseau, Fournier; Giovenazzo, 2015; Rhodes *et al.*, 2010)

A genética igualmente exerce influência sobre as características espermáticas. Estudos realizados por Taha e Alqarni (2014) identificaram diferenças significativas nos espermatozoides e em outras características associadas à fertilidade entre subespécies de abelhas. Na qual verificou-se que os zangões de *Apis mellifera carnica* possuem glândulas mucosas, testículos e vesículas seminais maiores em comparação com os de *Apis mellifera jemenetica*, além de produzirem, de forma significativa, maior quantidade de espermatozoides por ejaculação. Da mesma forma, estudos realizados por Quartuccio *et al.*, (2020), com *Apis mellifera siciliana* e *Apis mellifera ligustica*, demonstraram que ambas as subespécies apresentaram diferenças significativas na concentração e na longevidade dos espermatozoides.

2.3 TÉCNICAS DE COLETA DE SÊMEN EM ABELHAS

Existem duas principais técnicas para a coleta de sêmen em zangões: a dissecação das vesículas seminais e a indução da ejaculação. Nos primeiros estudos com zangões, o sêmen era obtido por meio da dissecação das vesículas seminais, procedimento no qual se realiza a abertura da cavidade abdominal do zangão, removendo as vesículas que serão abertas para a coleta de sêmen (Yániz *et al.*, 2024). Embora esse método possa proporcionar um maior volume de sêmen, apresenta um risco elevado de contaminação bacteriana, tanto da superfície externa quanto do trato digestivo do zangão. Além disso, exige maior habilidade técnica, rigor na esterilização e representa um risco maior de transmissão de patógenos bacterianos para a rainha (Yániz *et al.*, 2024).

Na última década, a técnica de eversão do endofalo tem sido o principal método utilizado para a coleta de amostras de sêmen em zangões. Para realizá-la é feita a eversão parcial do endofalo, segurando a cabeça e o tórax do zangão entre o polegar e o indicador, pressionando suavemente o seu abdômen, provocando a emersão dos cornos alaranjados. Para alcançar a eversão completa, é feita novamente uma leve pressão, resultando na exposição do

sêmen na ponta do endofalo. O sêmen exposto apresenta coloração de creme, marmorizado e bronzeado, com uma camada subjacente de muco branco, cuja quantidade e consistência podem variar (Cobey; Tarpy; Woyke, 2013). A coleta é feita diretamente da extremidade do endofalo evertido, utilizando um tubo capilar de vidro conectado a uma seringa (Cobey; Tarpy; Woyke, 2013).

2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

Após a coleta, o sêmen dos zangões deve ser avaliado com base em parâmetro macroscópicos e microscópicos (Woyke, 1963). Esses parâmetros podem variar entre os indivíduos devido a diversos fatores, como a idade, nutrição, tamanho, peso corporal, estação do ano e genótipos (Rangel & Fisher, 2019; Zhao *et al.*, 2021). A avaliação espermática não apenas fornece dados sobre a funcionalidade, estrutura e viabilidade dos espermatozoides, como também contribui para preencher lacunas de conhecimentos, oferecendo informações detalhadas que podem ser relacionadas ao sucesso potencial da fertilização.

2.4.1 Motilidade espermática

A motilidade dos espermatozoides é fundamental para a migração até a espermateca da rainha e, consequentemente, para o sucesso da fertilização do óvulo (Yániz *et al.*, 2020). Diferentemente de outras espécies, os zangões apresentam um padrão de movimento espermático predominantemente circular, com formato helicoidal (Tofilski *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2022). Em estudos mais recentes, a motilidade tem sido expressa como a porcentagem de espermatozoides móveis, sendo avaliada através da avaliação visual por meio de microscopia de contraste de fase. Essa análise é realizada de forma subjetiva e considera qualquer tipo de movimento circular ativo, sendo reconhecida como um bom indicador de qualidade espermática (Wegener *et al.*, 2012).

Além disso, deve ser realizada imediatamente após a coleta, pois o tempo de armazenamento e as condições ambientais como temperaturas extremas de frio ou calor e exposição à luz podem influenciar negativamente a motilidade espermática (Trentin, 2018). A análise desse parâmetro é essencial para estabelecer um limite aceitável para o uso do sêmen na inseminação instrumental de rainhas, sendo considerado como valor mínimo adequado

60% de motilidade, amostras com valores inferiores não devem ser utilizadas (Murray *et al.*, 2023).

Uma curiosidade a se destacar é que devido às características morfológicas dos espermatozoides de zangão, que possuem cabeça fina e estreita, sendo indistinguíveis de suas caudas, suas análises não conseguem ser realizadas no equipamento de Análise de Sêmen Assistida por Computador (CASA). Com isso, foi desenvolvido o sistema CASABee, um software de código aberto projetado especificamente para a análise automática da motilidade e concentração de espermatozoides em zangões. No estudo de Divasón *et al.* (2023), o software foi utilizado para comparar a análise manual e a análise realizada pelo CASABee em relação aos valores de motilidade e concentração espermática. Os resultados demonstram a eficiência do software, que permite realizar a análise de forma rápida e precisa, reduzindo o tempo necessário para cerca de 10 a 20 segundos.

2.4.2 Viabilidade espermática

A viabilidade dos espermatozoides é determinada em percentagem de espermatozoides viáveis considerados com a integridade estrutural da membrana (Silva *et al.*, 2013). Sendo essa considerada uma das análises mais comuns na avaliação do sêmen de zangões e é fundamental para a fertilização. Em adição, é essencial que essa estrutura apresente esteja íntegra, permitindo a proteção do material genético até o momento da fertilização (Guimarães *et al.*, 2017).

Os métodos utilizados para avaliar a integridade estrutural da membrana são realizados no intuito de verificar se há rompimento ou não na membrana, como sondas fluorescentes (Nur *et al.*, 2012; Morais *et al.*, 2022; Kaya; Uysal, 2023). O fluorocromo mais amplamente utilizado para a marcação das células espermáticas inviáveis, cuja membrana não está íntegra, é o iodeto de propídio. Essa sonda atravessa as membranas danificadas, liga-se ao DNA e emite uma fluorescência vermelha intensa. O iodeto de propídio pode ser combinado com outras sondas, como o Hoechst 33342, SYBR-14 ou laranja de acridina, que atravessam a membrana plasmática intacta dos espermatozoides viáveis, ligando-se ao DNA e emitem fluorescência azul (Hoeschst 33342) ou verde (SYBR-14 e laranja de acridina) nas células vivas (Yániz *et al.*, 2020).

2.4.3 Integridade funcional da membrana

Para além de integridade estrutural é importante que a membrana plasmática do espermatozoide seja funcional, uma vez que essa análise é essencial para verificar a capacidade dos membrana se adequar a diferentes ambientes osmóticos durante seu trajeto até o momento da fertilização. Por isso, é importante avaliar tanto a integridade estrutural quanto a funcionalidade da membrana espermática (Hafez, 1993). Nesse contexto, foi desenvolvido o teste hipo-osmótico (HOST) por Jeyendran *et al.*, (1984). Esse teste baseia-se na semipermeabilidade da membrana celular intacta, que permite o inchaço do espermatozoide em soluções hipo-osmóticas. O inchaço da cauda, observado após a exposição de espermatozoides com membranas plasmáticas íntegras à solução hipo-osmótica, indica que o transporte de água através da membrana está ocorrendo normalmente, evidenciando a preservação da integridade funcional (Jeyendran *et al.*, 1984).

O teste da água também foi desenvolvido com o mesmo objetivo por Lomeo e Giambersio (1991) e Fuse *et al.*, (1993), utilizando água destilada como solução hipo-osmótica. Nur *et al.*, (2012) compararam a atividade funcional da membrana plasmática utilizando o teste de água e soluções com osmolaridade de 50, 100 e 150 mOsm/kg, obtendo resultados semelhantes entre o teste com água e o teste de HOST a 50 mOsm/kg. Fuse *et al.* (1993) sugeriram que o teste da água é mais simples e rápido do que o teste HOST convencional.

2.4.4 Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática pode indicar o potencial de fertilidade dos espermatozoides, especialmente na presença de altas porcentagens de anormalidade. Essas anomalias podem ser classificadas em defeitos de primeiro e segundo grau, referentes à origem, seja durante a espermatogênese ou durante o trânsito fisiológico, em defeitos maiores e menores, de acordo com seu potencial de interferência na fertilidade (Arruda *et al.*, 2011).

Os espermatozoides são células translúcidas, e sua visualização sob microscopia óptica comum nem sempre é nítida (Arruda *et al.*, 2011). Por esse motivo, a utilização de corantes como Rosa Bengala, Diff-Quick e Hematoxilina e Eosina são frequentemente utilizados para evidenciar a estrutura espermática de zangões, bem como suas anormalidades (Moraes *et al.*, 2022; Bratu *et al.*, 2022; Power *et al.*, 2019).

Os principais defeitos observados nos espermatozoides de zangões incluem variações no formato e no tamanho do núcleo (macrocefálico e microcefálico) e presença de múltiplas cabeças e ausência de cabeça. São identificadas alterações como formato anormal da cabeça, acrossomos danificados, flexionados, curvados ou ausentes, além de cabeças duplas e a ausência da cabeça (Bratu *et al.*, 2022; Power *et al.*, 2019). A respeito da cauda, as alterações morfológicas mais comuns são cauda enroladas, dobradas, fragmentadas, curtas, múltiplas e desfiadas (Bratu *et al.*, 2022; Morais *et al.*, 2022).

2.4.5 Morfometria espermática

A análise morfométrica permite uma avaliação objetiva das características morfológicas espermáticas, possibilitando a identificação de regiões estruturais e de detalhes que não seriam detectados por métodos convencionais. Os dados morfométricos são obtidos a partir da digitalização de imagens de espermatozoides previamente corados, com o auxílio de câmeras de capturas acopladas ao microscópio óptico. A partir das fotomicrografias captadas, podem ser aplicados métodos manuais de medição por meio do software analisador de imagens ImageJ (Morais *et al.*, 2022).

Dentre os principais parâmetros morfométricos avaliados destacam-se o comprimento cabeça, o comprimento da cauda (flagelo) e o comprimento total do espermatozoide. Em alguns casos, dependendo do corante utilizado, é possível medir também o comprimento do núcleo e do acrossomo. Esses dados fornecem informações relevantes para a caracterização espermática e podem estar associados à qualidade seminal e ao potencial reprodutivo dos zangões, incluindo aspectos relacionados à seleção sexual. Por exemplo, machos maiores e com espermatozoides mais longos podem apresentar vantagem competitiva na disputa por parceiros ou na competição espermática (Janicke; Fromonteil, 2021).

2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VERREDURA

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) funciona de forma semelhante aos microscópios ópticos, no entanto utilizam um feixe focalizado de elétrons em vez de luz para obter imagens. Os microscópios eletrônicos permitem ampliações significativamente maiores e apresentam um poder de resolução superior ao dos microscópios ópticos, possibilitando a visualização de objetos em níveis subcelulares, moleculares e atômicos (Kannan, 2018). Trata-se de um dos instrumentos mais versáteis disponíveis para o exame e análise da

morfologia de microestruturas, bem como para a caracterizações da composição química (Zhou, 2007).

A MEV utiliza um feixe de elétrons focalizado que varre sistematicamente a superfície da amostra, produzindo diversos sinais de eletrônicos. Essa técnica é empregada para registrar características topográficas da superfície da amostra processada, gerando imagens tridimensionais com elevada profundidade de campo (Zhou, 2007). Para essa avaliação, é necessário imobilizar os componentes moleculares e as estruturas de organismos, órgãos, tecidos, células e biomoléculas por meio da fixação química com reticuladores. Em seguida, as amostras são tratadas com sais de metais pesados para aumentar a densidade de massa dos componentes. Posteriormente, realiza-se o revestimento por pulverização catódica com metais como ouro, com o objetivo de reduzir danos às superfícies e melhorar a condutividade. Esse revestimento permite a obtenção de imagens em alta resolução estrutural, que são geradas e captadas pelo sistema de detecção, sendo então convertidos em imagens, exibidas em um monitor ligado ao microscópio eletrônico de varredura (Zhou, 2007).

Na área de tecnologia do sêmen, estudos descritivos e comparativos com MEV permitem caracterizar padrões espermáticos entre diferentes espécies, ou auxiliar na avaliação da eficiência de biotecnologias aplicadas à reprodução de espécies ameaçadas (Matos, 2023). No caso das abelhas, ainda são escassos os estudos com microscopia eletrônica de varredura. A estrutura e organização dos espermatozoides na espermateca de rainhas foi descrita por Zennouche *et al.*, (2016). Contudo, há estudos ultraestruturais realizados com a microscopia eletrônica de transmissão que analisam os espermatozoides de zangões (Lino-Neto; Báó; Doller, 2000; Gulov; Bragina, 2022; Peng, Yin, Yin, 1993).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar os espermatozoides do sêmen de zangões de abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica* Linnaeus, 1758), e compará-los com os espermatozoides do sêmen de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L. Linnaeus, 1758).

Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade espermática conforme motilidade, viabilidade espermática, integridade funcional da membrana plasmática, morfologia, morfometria e análise ultraestrutural de microscopia eletrônica de varredura.
- Fazer inferências entre a relação das características espermáticas dos zangões das abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*) com os zangões das abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Local do experimento

O estudo foi conduzido entre os meses de fevereiro e junho de 2025, durante a estação chuvosa com animais provenientes do Núcleo de Capacitação Tecnológica em Apicultura da Estação Experimental da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, situado na cidade de Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte, localizado na região Nordeste do Brasil. Essa área possui caracterização climática do tipo semiárido sob as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 5°03'37" Sul, Longitude: 37°23'50" Oeste), com temperatura média variando entre 25°C e 28,7°C. As análises experimentais foram conduzidas no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Animais experimentais

Neste estudo, foram utilizados um total de 25 zangões de abelhas, sendo 9 zangões italianos (*Apis mellifera ligustica*) e 16 africanizados (*Apis mellifera L.*), capturados em diferentes colônias localizadas no mesmo apiário da Estação Experimental da UFERSA. Em ambos os grupos, foram coletados zangões sexualmente maduros, capturados por escape no alvado das colmeias, com idade aproximada de 25 dias, durante a estação chuvosa. Nestes, os zangões foram avaliados quanto à maturidade, sendo considerados maduros quando apresentaram eversão completa da ponta do endofalo, com presença de sêmen. Somente indivíduos maduros foram utilizados para o experimento (Collins; Donoghue, 1999).

Coleta do sêmen

Os zangões foram encaminhados para o Laboratório de Conservação e Germoplasma Animal (LCGA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), para realização da coleta e processamento das amostras. A coleta do sêmen foi realizada por meio da técnica padrão de eversão do endofalo (Cobey; Tarpy; Woyke, 2013). A estimulação foi realizada manualmente, aplicando-se uma leve pressão sobre o abdômen do zangão, induzindo à exposição parcial do endofalo, seguida de sua eversão completa, expondo o sêmen na ponta do endofalo, próximo a uma secreção mucosa de coloração branca (Mendes, 2008) (Figura 8). Aproximadamente 1 µL de sêmen foi coletado com auxílio de uma seringa de inseminação

instrumental HARBO. Em seguida, as amostras foram diluídas em solução fisiológica na proporção de 1:20, para posterior análise.



Figura 8. Coleta sêmen zangão Africanizado (*Apis mellifera* L.). (A) Suave pressão no abdômen; (B) Eversão parcial do endófalo; (C) Eversão completa do endófalo com sêmen exposto.

Análises do sêmen

Imediatamente após a coleta e diluição, as amostras foram submetidas à avaliação dos parâmetros microscópicos de motilidade espermática (%). Para isso, foi utilizada uma alíquota de 5 μ L, depositada sobre uma lâmina de vidro pré-aquecida a 34 °C, sendo observada por meio de microscopia de contraste de fase, com aumento de 10x. A motilidade foi estimada em porcentagem, variando de 0 a 100%, de acordo com a quantidade de espermatozoides em movimento (Collins, 2005).

A avaliação da viabilidade espermática (%) foi realizada utilizando sondas fluorescente. Para isso, uma alíquota de 5 μ L de sêmen foi incubada a 34 °C durante 10 minutos, em uma solução fluorescente composta por 1 μ L de iodeto de propídio (PI; Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, EUA) e 5 μ L de Hoechst 33342 (H-342; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As amostras foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (40x; Episcopic Fluorescent Attachment “EFA” Halogen Lamp Set; Leica, Kista, Suécia). Para cada amostra, foram contados 100 espermatozoides. Os espermatozoides com cabeças marcadas em azul foram classificados como viáveis, com membranas intactas, enquanto aqueles marcados parcial ou completamente em vermelho foram considerados não viáveis, com membranas não intactas (Hopkins; Herr, 2010).

O teste de integridade funcional da membrana (teste hiposmótico) foi realizado utilizando água destilada como solução hiposmótica (0 mOsm/L), com base na observação do enrolamento e inchaço das caudas dos espermatozoides. Para isso, 5 μ L de sêmen foram

incubados em 45 μ L da solução hiposmótica, durante 60 minutos, a 34 °C (Nur *et al.*, 2012). Após o período de incubação, 10 μ L da solução hiposmótica contendo os espermatozoides foram depositados sobre uma lâmina de vidro, coberta com uma lamínula, e avaliados em microscópio de contraste de fase (40x). Foram analisados 100 espermatozoides por lâmina, em campos microscópicos selecionados aleatoriamente, e a porcentagem de espermatozoides com caudas enroladas foi calculada (Nur *et al.*, 2004).

Análise morfológica e morfométrica

Para a avaliação da morfologia espermática, foram preparadas lâminas coradas com Rosa Bengala (Cromato, SP, Brasil), utilizando 5 μ L de sêmen em 45 μ L de corante, com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, uma alíquota de 10 μ L foi depositada sobre uma lâmina de vidro e coberta com uma lamínula. Após a preparação das lâminas, foram contadas 100 células por zangão, em campos selecionados aleatoriamente, sob microscopia de luz (40x). Os espermatozoides foram classificados como normais ou anormais com base na presença de defeitos na cauda ou na cabeça (Tarliyah; Boediono; Walujo, 1999).

A morfometria espermática foi realizada utilizando as lâminas de morfologia coradas com Rosa Bengala. De cada zangão, foram analisados de sete a onze espermatozoides, totalizando 300 imagens capturadas em microscópio óptico (40x) com auxílio do software Leica LAS V.4.13 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Em cada imagem, os componentes espermáticos foram medidos utilizando o software de análise de imagens ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, Maryland, EUA). Os parâmetros morfométricos medidos incluíram as dimensões da cabeça do espermatozoide, do flagelo e do comprimento total (Gontarz *et al.*, 2016).

Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a avaliação da morfologia tridimensional dos espermatozoides por microscopia eletrônica de varredura (MEV), seguiu-se o protocolo descrito por Santos *et al.*, (2022), com algumas modificações. Para a avaliação de espermatozoides em superfície tridimensional, foi feita uma adaptação no protocolo utilizando amostras fixadas em lâminas de morfologia com Rosa Bengala por 24 h. Em seguida, os espermatozoides foram secos em ambiente climatizado, e as lâminas foram fixadas com fita adesiva em pinos de latão. Posteriormente, as amostras foram revestidas com ouro, utilizando o metalizador Sputter Coater Quorum, Q150R

ES (Reino Unido), e observadas em microscópio eletrônico de varredura (Tescan®, Type VEGA 3 LMU, No. VG13671479, 50/60 Hz; Brno, República Tcheca). As amostras foram então processadas para avaliação por MEV no laboratório do Centro de Pesquisa em Ciências Vegetais do Semiárido, da UFERSA.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão. A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Para comparar os parâmetros espermáticos entre os grupos, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para as variáveis que não seguiram distribuição normal (hiposmótica e cauda quebrada), enquanto o teste t de Student foi aplicado para aquelas com distribuição normal (motilidade, espermatozoides viáveis, espermatozoides normais e cauda enrolada).

A utilização de diferentes testes foi justificada pelo fato de que, durante a verificação dos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, algumas variáveis apresentaram distribuição normal e outras não. As variáveis analisadas pelo teste de Mann-Whitney (hiposmótica e cauda quebrada) foram classificadas como não paramétricas, por não apresentarem distribuição normal, sendo necessária a utilização deste teste. Por outro lado, as variáveis analisadas pelo teste t de Student foram consideradas paramétricas, pois apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, permitindo a aplicação de testes paramétricos. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism®, versão 9.3 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), adotando-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Influência dos genótipos na motilidade espermática, viabilidade e funcionalidade da membrana plasmática.

Ambos os genótipos apresentaram motilidade espermática em torno de 90% (Tabela 1), com viabilidade espermática de $82,44 \pm 2,5\%$ nos zangões italianos e $81,14 \pm 2,4\%$ nos zangões africanizados. A integridade funcional da membrana plasmática nos zangões italianos foi de $93,44 \pm 1,7\%$, enquanto nos zangões africanizados foi de $91,60 \pm 1,5\%$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos ($P > 0,05$), ambas apresentaram excelente qualidade espermática.

Tabela 1. Média (Média $\pm$ EP) para motilidade espermática, viabilidade espermática e funcionalidade da membrana de zangões de abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*) e africanizadas (*Apis mellifera L.*).

Variáveis Seminais	Italianas (Média $\pm$ EP)	Intervalo	Africanizadas (Média $\pm$ EP)	Intervalo
Motilidade (%)	90,00 $\pm$ 0,0	90	90,00 $\pm$ 0,0	90
Viabilidade espermática (%)	82,44 $\pm$ 2,5	71–99	81,14 $\pm$ 2,4	65–94
Funcionalidade da membrana (%)	93,44 $\pm$ 1,8	84–98	91,60 $\pm$ 1,5	80–97

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de genótipos ($P > 0,05$).

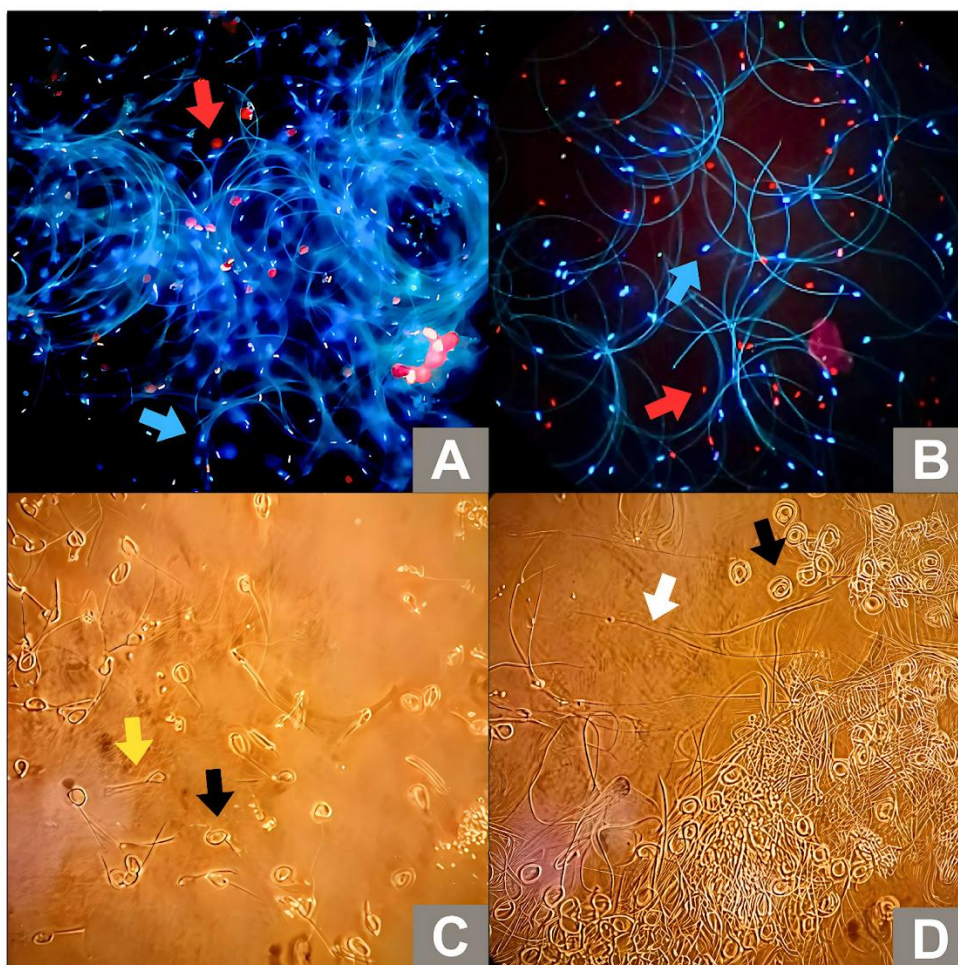


Figura 9. Análises de espermatozoides de zangões. (A) Viabilidade espermática de zangão italiano (*Apis mellifera ligustica*). (B) Viabilidade espermática de zangão africanizado (*Apis mellifera* L.); avaliada por sondas fluorescentes: espermatozoides viáveis (seta azul; Hoechst 33342) e não viáveis (seta vermelha; iodeto de propídio). (C) Integridade funcional da membrana plasmática (teste hiposmótico, HOST) de zangão italiano (*Apis mellifera ligustica*); membrana funcionalmente intacta com cauda levemente enrolada (seta amarela), membrana funcionalmente intacta com cauda totalmente enrolada (seta preta). (D) Integridade funcional da membrana plasmática (HOST) de zangão africanizado (*Apis mellifera* L.); membrana plasmática comprometida (seta branca), membrana funcionalmente intacta com cauda totalmente enrolada (seta preta).

Influência dos genótipos na morfologia

Em relação à morfologia dos espermatozoides, a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais foi de $10,89 \pm 1,66\%$ nos zangões italianos e $12,06 \pm 1,01\%$ nos zangões africanizados, sem diferença estatística significativa entre os grupos, conforme mostrado na Tabela 2. O defeito mais prevalente observado foi a cauda enrolada. A Tabela 2 apresenta os aspectos morfológicos avaliados, juntamente com suas respectivas médias e erros padrão. A Figura 10 apresenta espermatozoides morfolologicamente normais, bem como alguns dos defeitos encontrados.

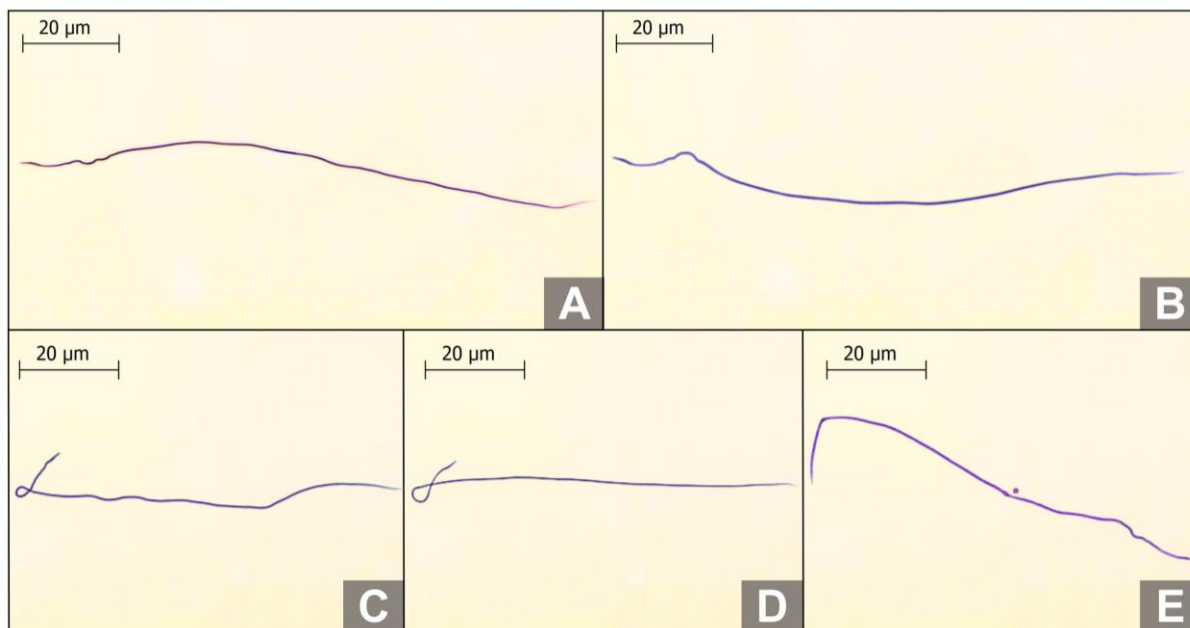


Figura 10. Fotomicroscopias de espermatozoides de zangão corados com Rosa Bengala. (A) Espermatozoides italianos normais (*Apis mellifera ligustica*); (B) Espermatozoides africanizados normais (*Apis mellifera L.*); (C) Espermatozoides normais com cauda enrolada de um zangão italiano (*Apis mellifera ligustica*); (D) Espermatozoides normais com cauda enrolada de um zangão africanizado (*Apis mellifera L.*); (E) Espermatozoides com cauda quebrada de um zangão africanizado (*Apis mellifera L.*).

Influência dos genótipos na morfometria

Houve diferença significativa na morfometria dos espermatozoides entre os zangões dos dois genótipos (Tabela 2). As medidas morfométricas revelaram que os espermatozoides dos zangões italianos apresentaram cabeças significativamente ($P < 0,05$) maiores ($10,04 \pm 0,03 \mu\text{m}$) em comparação aos dos zangões africanizados ($9,33 \pm 0,04 \mu\text{m}$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nas medidas do flagelo e no comprimento total, com aproximadamente $260 \mu\text{m}$ de comprimento em ambos os grupos.

Tabela 2. Médias (média $\pm$ erro padrão da média) para morfologia e morfometria espermática de zangões italianos (*Apis mellifera ligustica*) e africanizados (*Apis mellifera* L.).

Variáveis seminais	Italianos (Média $\pm$ EP)	Intervalo	Africanizados (Média $\pm$ EP)	Intervalo
Morfologia normal				
Cauda reta (%)	10,89 $\pm$ 1,7	4–20	12,06 $\pm$ 1,0	7–21
Cauda enrolada (%)	88,56 $\pm$ 1,7	80–96	87,63 $\pm$ 1,1	78–93
Morfologia anormal				
Cauda quebrada (%)	1,25 $\pm$ 0,3	1–2	1,00 $\pm$ 0,0	1
Morfometria				
Comprimento da cabeça (μm)	10,04 $\pm$ 0,03 ^a	8,47–11,59	9,33 $\pm$ 0,04 ^b	7,98–11,79
Comprimento da cauda (μm)	249,7 $\pm$ 0,64 ^a	221,3–298,3	250,2 $\pm$ 0,70 ^a	222,0–301,5
Comprimento total (μm)	259,7 $\pm$ 0,65 ^a	231,4–308,3	259,9 $\pm$ 0,73 ^a	230,3–311,2

^{a, b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Influência dos genótipos na microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação ultraestrutural permitiu a identificação detalhada da vesícula acrossômica cônica e da superfície definida do núcleo, características que não eram claramente observáveis com a coloração convencional de Rosa Bengala. No acoplamento cabeça-flagelo, foi possível visualizar em paralelo o principal derivado mitocondrial e o axonema, sem que fossem identificadas diferenças entre os grupos.

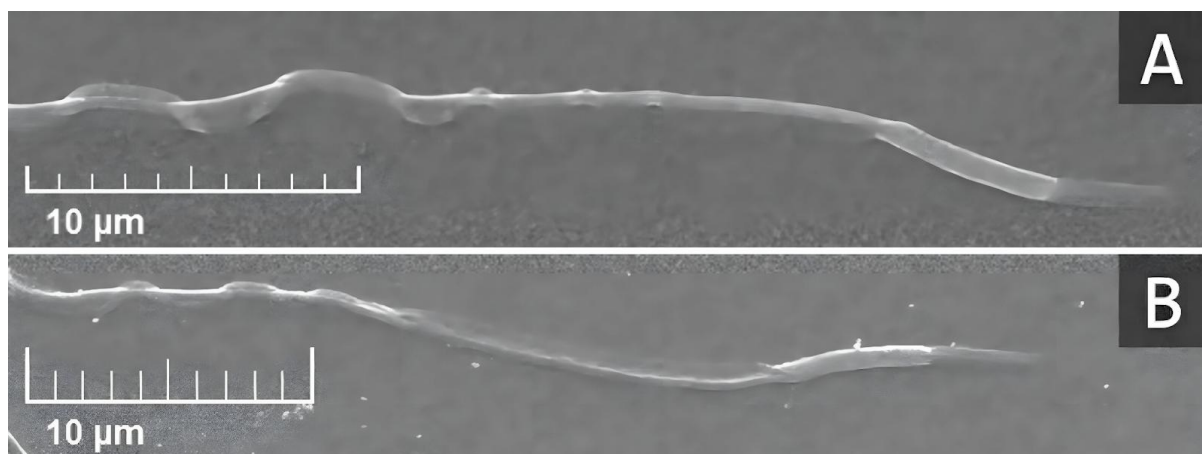


Figura 11. Ultraestrutura dos espermatozoides da abelha zangão. (A) Italiano (*Apis mellifera ligustica*); (B) Africanizado (*Apis mellifera* L.).

6 DISCUSSÃO

O potencial reprodutivo masculino tem um efeito substancial sobre a dinâmica populacional de uma determinada espécie (Rankin; Kokko, 2007). Portanto, vale a pena considerar a investigação de diferentes aspectos da fertilidade masculina, inclusive em abelhas. Este estudo apresenta uma comparação inédita dos parâmetros espermáticos de zangões de abelhas africanizadas e italianas presentes no mesmo ambiente, o bioma Caatinga. Foi demonstrado que, em geral, ambos os genótipos de zangões apresentam características espermáticas semelhantes, diferindo apenas na morfometria da cabeça do espermatozoide. Além disso, vale destacar que ambas as abelhas, quando coletadas durante o período chuvoso no mesmo ambiente semiárido, apresentam boa qualidade espermática.

A motilidade dos espermatozoides dos zangões destaca-se como um dos parâmetros mais relevantes, pois está diretamente relacionada à capacidade dos espermatozoides de migrar para a espermateca e ao sucesso da fertilização (Yániz; Silvestre; Santolaria, 2020). Diferente do que é observado em outras espécies, a motilidade dos espermatozoides de zangões segue um padrão de movimento predominantemente circular, com forma helicoidal (Tofilski *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2023). No presente experimento, ambos os genótipos apresentaram esse padrão de movimento circular, considerado um indicador de qualidade espermática (Yániz; Silvestre; Santolaria, 2020). Além disso, ambas as espécies apresentaram, em média, 90% de espermatozoides móveis quando coletadas durante a estação chuvosa da Caatinga. Esses resultados são equivalentes aos apresentados por Moraes *et al.*, (2022), que encontraram médias de 85,6% de espermatozoides móveis em zangões de abelhas africanizadas durante a estação chuvosa.

No presente estudo, quanto à viabilidade espermática, observou-se que os zangões italianos apresentaram valores semelhantes aos dos zangões africanizados, sem diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos analisados. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Moraes (2022), durante a mesma estação chuvosa. No estudo comparativo conduzido por Kahya e Gençer (2023), que avaliou a qualidade reprodutiva de zangões de abelhas caucasianas (*Apis mellifera caucasica*) e italianas (*Apis mellifera ligustica*), não foram encontradas diferenças significativas na viabilidade dos espermatozoides nas vesículas seminais entre os genótipos. A viabilidade espermática, por sua vez, está intimamente relacionada à fertilidade da rainha e é amplamente utilizada como indicador da qualidade do sêmen (Zhao *et al.*, 2021). Trata-se de um parâmetro fundamental para a fertilidade dos zangões, uma vez que apenas os espermatozoides com membranas plasmáticas intactas são

capazes de manter o metabolismo celular, alcançar a espermateca da rainha e participar efetivamente do processo de fertilização (Yániz, Silvestre; Santolaria, 2020).

A motilidade e a integridade estrutural da membrana do espermatozoide (viabilidade) são parâmetros essenciais para a avaliação da qualidade seminal, ambos diretamente relacionados ao potencial fertilizante dos espermatozoides. A manutenção de uma membrana plasmática intacta é essencial para garantir a estabilidade das funções metabólicas, de modo que danos a essa estrutura podem comprometer a capacidade de fertilização (Yániz *et al.*, 2013). Nesse contexto, a análise conjunta da motilidade e da viabilidade é essencial, uma vez que espermatozoides com membranas plasmáticas danificadas, embora móveis, podem não ser funcionalmente competentes para a fertilização. Da mesma forma, ejaculados com baixa motilidade espermática podem comprometer a capacidade reprodutiva do animal (Aguiar *et al.*, 2024). Em adição, a integridade da membrana não é importante apenas para o metabolismo espermático, mas uma mudança correta nas propriedades da membrana é necessária para uma união bem-sucedida dos gametas masculino e feminino. Assim, a integridade e a atividade funcional da membrana espermática são de fundamental importância no processo de fertilização (Bratu *et al.*, 2022).

Portanto, é necessário que a estrutura da membrana espermática não seja apenas viável, mas também funcional. Nesse contexto, o uso de uma solução 0 mOsm/L mostrou-se eficaz na identificação da integridade funcional da membrana plasmática, com base no grau de enrolamento da cauda. Os resultados indicaram boa integridade funcional da membrana plasmática em solução 0 mOsm/L para ambos os zangões italianos e africanizados, sem diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos.

Por outro lado, um ponto a ser questionado é se, embora ambos os genótipos sejam funcionais e respondam bem osmoticamente à solução 0 mOsm/L, pode haver diferença na composição da membrana espermática, favorecendo uma melhor adaptação aos sistemas fisiológicos da fêmea. Além disso, na solução presente na espermateca da fêmea, os espermatozoides responderão da mesma forma ou de maneira diferente? Essas questões representam lacunas que devem ser investigadas em estudos futuros.

No tocante a análise da morfologia os zangões dos genótipos de abelhas italiana (*Apis mellifera ligustica*) e africanizada (*Apis mellifera*) revelou características típicas da espécie, com células longas, filamentosas e extremidades afiladas (Yániz, Silvestre e Santolaria, 2020). Essa morfologia é comum entre abelhas do gênero *Apis* e tem sido associada à adaptação evolutiva para o armazenamento prolongado na espermateca da rainha ao longo de sua vida fértil e à seleção sexual. Espermatozoides longos possuem maior capacidade de

produção de energia e maior eficiência de movimentação dentro do órgão de armazenamento. Além disso, espermatozoides com maior longevidade têm maior probabilidade de fertilizar os óvulos, tornando a morfologia e o comprimento características altamente selecionadas (Slater, 2022).

Anomalias morfológicas podem contribuir para a redução das taxas de fertilização (Larson-Cook *et al.*, 2003). Tanto para os zangões italianos quanto para os africanizados, a ocorrência de caudas enroladas foi a anomalia morfológica mais predominante. Esses achados são semelhantes aos relatados por Moraes *et al.*, (2022), ao investigarem zangões de abelhas africanizadas no mesmo ambiente. Há a observação de caudas enroladas nos espermatozoides esteja relacionada ao padrão de movimento helicoidal exibido pelos espermatozoides das abelhas (Tofilski *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2023). Portanto, essa característica pode ser considerada uma consequência do padrão de natação desses gametas.

Os resultados morfométricos demonstraram uma diferença significativa no tamanho da cabeça dos espermatozoides de zangões italianos, sendo esta maior em comparação à dos zangões africanizados. Essa diferença pode estar relacionada à organização da cromatina no núcleo espermático, que influencia diretamente o volume da cabeça. Após a meiose e durante a espermiogênese, as espermátides redondas diferenciam-se em espermatozoides maduros. Nesse processo, ocorre a condensação da cromatina, durante a qual o volume nuclear é drasticamente reduzido. Inicialmente, proteínas como as histonas são adicionadas à cromatina, mas, ao longo da maturação espermática, essas são gradualmente substituídas por pequenas proteínas nucleares, as protaminas. A condensação da cromatina contribui para a formação de uma estrutura nuclear hidrodinâmica e compacta, protege o genoma de danos físicos e químicos, e podem estar envolvidas na regulação epigenética (Kathke *et al.*, 2014).

Considerando que a maior parte da cabeça do espermatozoide é composta por cromatina altamente compactada, o formato nuclear pode estar diretamente associado ao relacionado principalmente ao estado da cromatina do espermatozoide (Saraiva *et al.* 2007). A condensação da cromatina é um processo fundamental de compactação e reorganização da estrutura do DNA durante a espermatogênese, sendo essencial para a integridade e transmissão precisa do material genético (Vagnarelli, 2013).

Dessa forma, é possível que os espermatozoides dos zangões italianos apresentem uma cromatina menos condensada ou um arranjo nuclear com menor quantidade de proteínas estabilizadoras do DNA, como protaminas, o que resultaria em uma cabeça espermática de maior tamanho. Por outro lado, nos zangões africanizados, uma cromatina mais compactada ou uma maior presença de proteínas nucleares pode contribuir para uma cabeça espermática

menor, ainda que mantendo a funcionalidade reprodutiva. Assim, as diferenças morfométricas observadas neste estudo podem refletir adaptações ao empacotamento do material genético entre os genótipos analisados, com possíveis implicações para a estabilidade genômica, longevidade dos espermatozoides e sucesso reprodutivo da rainha. Sendo necessários, estudos específicos sobre a temática.

Embora essa diferença no tamanho da cabeça tenha sido observada, o comprimento dos flagelos e o comprimento total dos espermatozoides não apresentaram variações significativas entre os grupos. De modo geral, os valores morfométricos médios observados neste estudo são consistentes com aqueles descritos para espermatozoides de abelhas europeias Buckfast encontrados durante a estação chuvosa na região central da Romênia (Bratu *et al.*, 2022; Lino-Neto, Báó, Dolder, 2000). Vale mencionar que o experimento foi estendido até julho de 2024, ao final da estação chuvosa. No entanto, os flagelos e o comprimento total não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Diferentemente dos animais vertebrados, os espermatozoides dos insetos não possuem peça intermediária. Eles são filamentosos, com uma cabeça alongada e uma cauda extremamente longa, composta por um flagelo derivado do filamento axial e estruturas mitocondriais que o envolvem (Peng, Yin, Yin, 1993). Isso pode ser observado por meio da análise por microscopia eletrônica de varredura dos zangões italianos e africanizados, a qual permitiu uma identificação detalhada da vesícula acrossômica cônica e da superfície bem definida do núcleo, mas não da peça intermediária. Na junção entre a cabeça e o flagelo, foi possível visualizar o principal derivado mitocondrial e o axonema. Contudo, não foram identificadas diferenças entre os grupos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa forma, este estudo, ao avaliar os parâmetros espermáticos de zangões de diferentes genótipos, contribui para a definição das características morfológicas, morfométricas e funcionais dos espermatozoides de ambas. Em adição, a microscopia eletrônica de varredura permitiu a caracterização da ultraestrutura espermática, visualizando regiões imperceptíveis por outros métodos de avaliação convencionais. Em conclusão, há grande similaridade nos parâmetros espermáticos de zangões italianos (*Apis mellifera ligustica*) e africanizados (*Apis mellifera L.*) criados no bioma Caatinga. Essas informações contribuem para a compreensão da fisiologia reprodutiva dos genótipos e enfatizam a possibilidade de aplicação de manejos reprodutivos semelhantes para ambas, permitindo o desenvolvimento de estratégias para a conservação dessas abelhas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, S. F. *et al.*, Fisiologia do movimento espermático. **Ciência Animal**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 73–93, 2024. <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/14728>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.10.010>
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIME, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n2/RB385%20Arruda%20145151.pdf>
- ASCHER, J. S.; PICKERING, J. Discover life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). 2020. http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide_Apoidea_species
- AYENESHET, B *et al.*, Comparative analysis of semen quality and fertility in diverse rooster breeds: a systematic review. **World's Poultry Science Journal**, v. 80, n. 3, p. 947-975, 2024. <https://doi.org/10.1080/00439339.2024.2338347>
- BAER, B. *et al.*, The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. **Proteomics**, v. 9, n. 8, p. 2085-2097, 2009. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800708>
- BANASZEWSKA, D.; KATARZYNA A. Identification of honey bee sperm structures following the use of various staining techniques. **Journal of Veterinary Research** v. 67, n. 1, p. 131, 2023. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2023-0001>
- BIRD, G. *et al.*, Parasites and pesticides act antagonistically on honey bee health. **Journal of Applied Ecology**, v. 58, n. 5, p. 997-1005, 2021. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13811>.
- BRATU, I.C., *et al.*, The Influence of Body Weight on Semen Parameters in *Apis mellifera* Drones. **Insects** v. 13, n. 12, p. 1141, 2022. <https://doi.org/10.3390/insects13121141>
- BRASIL. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. *Sistema de produção: mel*. Versão eletrônica. Brasília, DF: Embrapa, 2023. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1156063/1/SistemaProducaoMelVersaoEletronica2023.pdf> . Acesso em: 8 maio 2025.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. *Manual de doenças das abelhas*. Brasília, DF: MAPA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/ManualdeDoencasdasaBelhaswebcomprimido.pdf>. Acesso em: 8 maio 2025.
- CAMARGO, R.C.R. de; PEREIRA, F. de M.; LOPES, M.T. do R. Produção de mel. **Teresina: Embrapa Meio-Norte**, 2002.

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. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.09>

COLONELLO, N.A.; HARTFELDER, K. She's my girl-male accessory gland products and their function in the reproductive biology of social bees. **Apidologie**, v. 36, n. 2, p. 231-244, 2005. <https://doi.org/10.1051/apido:2005012>

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. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00094-1)

COLLINS, A. M. Insemination of honey bee, *Apis mellifera*, queens with non-frozen stored semen: sperm concentration measured with a spectrophotometer. **Journal of apicultural research**, v. 44, n. 4, p. 141-145, 2005. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101168>

CZEKOŃSKA, K., CHUDA-MICKIEWICZ, B. & SAMBORSKI, J. Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. **Apidologie** v. 46, p. 1–9 2015. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0296-z>

DALLAI R. Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v.21, p.89-109, 1975. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90072-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90072-4)

DEGUELDRE, F.; ARON, S. Long-term sperm storage in eusocial Hymenoptera. **Biological Reviews**, v. 98, n. 2, p. 567-583, 2023. <https://doi.org/10.1111/brv.12919>

DE JONG, David. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, n. 2, p. 67-70, 1996. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1996.11099289>

DEN BOER, S.P.A.; BAER, B.; BOOMSMA, J.J. Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects. **Science**, v. 327, n. 5972, p. 1506-1509, 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1184709>

DIVASÓN, J., et al. In vitro maintenance of drones and development of new software for sperm quality analysis facilitate the study of honey bee reproductive quality. **Journal of Apicultural Research**, 63(5), 1088-1095, 2023. <https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2231673>

FREE, J. B. The food of adult drone honeybees (*Apis mellifera*). **The British journal of animal behaviour**, v. 5, p. 7-11, 1957.

FUSE, H. *et al.* Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water. **Archives of andrology**, v. 30, n. 2, p. 111-116, 1993. <https://doi.org/10.3109/01485019308987743>

GONTARZ, A. *et al.*, Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 40, n. 5, p. 598-602, 2016. <https://doi.org/10.3906/vet-1511-6>

GUIMARÃES, Daianny B. *et al.* Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 183, p. 27-38, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.005>

GULER, A. *et al.*, The effects of instrumental insemination on selected and unselected breeding characteristics in honeybee (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 53, n. 4, p. 35, 2022. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00947-0>

GULOV, A.N., BRAGINA, Y.E. Morphofunctional Changes in Frozen-Thawed Sperm of *Apis Mellifera* Linnaeus Drones. *Russ. Agricult. Sci.* 48, 512–520, 2022. <https://doi.org/10.3103/S1068367422060040> . Acesso em: 19 de fev. de 2025

HAFEZ, Elsayed Saad Eldin; HAFEZ, B. (Ed.). **Reproduction in farm animals**. John Wiley & Sons, 2013.

HAYDAK, Mykola H. Honey bee nutrition. **Annual review of entomology**, v. 15, n. 1, p. 143-156, 1970.

HEMBERGER, J.; CROSSLEY, M.S.; GRATTON, C. Historical decrease in agricultural landscape diversity is associated with shifts in bumble bee species occurrence. **Ecology Letters**, v. 24, n. 9, p. 1800-1813, 2021. <https://doi.org/10.1111/ele.13786>.

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. <https://doi.org/10.1051/apido/20010006>

JANICKE, Tim; FROMONTEIL, Salomé. Sexual selection and sexual size dimorphism in animals. **Biology Letters**, v. 17, n. 9, p. 20210251, 2021. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2021.0251>

JEYENDRAN, R. S. *et al.* Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Reproduction**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>

KAHYA, Y.; GENÇER, H. V. Reproductive quality in drones bred from Caucasian (*A. m. caucasica*) and Italian (*A. m. ligustica*) honey bee colonies. **Apidologie**, v. 54, n. 1, p. 1, 2023. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00973-y>

KAYA, A.; UYSAL, O. In vitro spermatological parameters in drones. **Uludağ Arıcılık Dergisi**, v. 23, n. 2, p. 268-279, 2023. <https://doi.org/10.31467/uluaricilik.1279779>

KANNAN, M. Scanning electron microscopy: Principle, components and applications. **A textbook on fundamentals and applications of nanotechnology**, p. 81-92, 2018. https://www.researchgate.net/profile/M-Kannan-3/publication/341553212_Scanning_Electron_Microscopy_Principle_Components_and_Applications/links/5ec6daed458515626cbf2569/Scanning-Electron-Microscopy-Principle-Components-and-Applications.pdf

KERR, Warwick Estevam. História parcial da ciência apícola no Brasil. In: **Anais do V Congresso Brasileiro de Apicultura**. Confederação Brasileira de Apicultura, 1980.

KERR, W.E. The history of the introduction of African bees in Brazil. **Apiculture in Western Australia**. 2:53.55. 1967.

KHAN, K.A. *et al.*, Instrumental insemination: A nontraditional technique to produce superior quality honey bee (*Apis mellifera*) queens. **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n. 5, p. 102077, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102077>

KLEIN, C. D. *et al.*, Testicular changes of honey bee drones, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), during sexual maturation. **Journal of Insect Science**, v. 21, n. 6, p. 3, 2021. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab049>

KLINE, O.; JOSHI, N.K. Mitigating the effects of habitat loss on solitary bees in agricultural ecosystems. **Agriculture**, v. 10, n. 4, p. 115, 2020. <https://doi.org/10.3390/agriculture10040115>

LAGO, D.C. *et al.*, Testis development and spermatogenesis in drones of the honey bee, *Apis mellifera* L. **Apidologie**, v. 51, p. 935-955, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00773-2>

LANDIM, CC. **Abelhas: morfologia e função de sistemas** [online]. São Paulo: Editora UNESP, 2009. ISBN 978-85-393-0430-1. Available from SciELO Books . <https://doi.org/10.7476/9788539304301>

LARSON-COOK, K. L., *et al.*, Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and sterility**, v. 80, n; 4, p. 895-902, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)01116-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)01116-6)

LEE, K. V. *et al.*, Is the Brood Pattern within a Honey Bee Colony a Reliable Indicator of Queen Quality? **Insects**, v. 10, n. 1, p. 12, 2019.

LEANDERSON, Designer. A vida e a função do zangão na colmeia. **Blog Apiário Esperança**, 16 maio 2018. Disponível em: <https://blog.apiario-esperanca.com.br/a-vida-e-a-funcao-do-zangao-na-colmeia/>. Acesso em: 02 jul. 2025.

LINO-NETO, J., BÁO, S. N., DOLDER, H. Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*)(L)(Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. **Tissue and Cell**, v. 3, n. 4, p. 322-327, 2000. <https://doi.org/10.1054/tice.2000.0119>

LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A. M. 'Water-test': a simple method to assess sperm-membrane integrity. **International journal of andrology**, v. 14, n. 4, p. 278-282, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1991.tb01093.x>

MATOS, Yuri Gonçalves. Biometria testicular e caracterização morfológica, morfométrica e ultraestrutural dos espermatozoides de tigrina *Leopardus tigrinus* (Schreber, 1775) no bioma Caatinga. 2023.

MENDES A.M.C. Inseminação artificial em abelhas rainhas. **Agroforum**, v.16, p. 31-36. 2008. <http://hdl.handle.net/10400.11/5977>

MILLER, G.T.; PITNICK, S. Sperm-female coevolution in *Drosophila*. **Science**, v. 298, n. 5596, p. 1230-1233, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1076968>

MORAIS, L. S. *et al.*, Sperm characteristics of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) drones during dry and wet seasons in the Caatinga biome. **Journal of Apicultural Research**, v. 63, n. 5, p. 1106-1113, 2022. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2113328>

MORITZ, R. F. A. The Effect of Different Diluents on Insemination Success in the Honeybee Using Mixed Semen. **Journal of Apicultural Research**, v. 23, n. 3, p. 164–167, 1984.

MURRAY, J. F., *et al.*, A new fluorescent method to determine honey bee sperm motility parameters with computer-aided sperm analysis. **Journal of Apicultural Research**, v. 62, n. 4, p. 944–952, 2023. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2090729>.

NUR, Z. *et al.*, Relationship between the canine sperm membrane integrity and other semen characteristics. 2004. **The Indian veterinary journal** 81(10):1119-1121

NUR, Z. *et al.*, The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. **Apidologie**, v. 43, p. 31-38, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1>

PAGE JR, 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

PENG C.Y.S., YIN C.M., YIN L.R.S. Ultrastructure of honey-Bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. **Physiol. Entomol.** v. 18, n. 1, p. 93-101, 1993. doi: 10.1111/j.1365-3032.1993.tb00454.x.

PETTIS, J.S. *et al.*, 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. e0147220, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147220>

POWER, K. *et al.*, Morphological and morphometric analysis of the Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*) spermatozoa: A preliminary study in Campania region. **Nucleus**, v. 4, p. 0.61, 2019. <https://doi.org/10.7243/2054-3425-6-2>

QUARTUCCIO, M. *et al.*, The sperm of *Apis mellifera siciliana* and *Apis mellifera ligustica*: A preliminary and comparative note. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1011-1016, 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1752465>.

RANGEL, J., FISHER, A. Factors affecting the reproductive health of honey bee (*Apis mellifera*) drones—a review. **Apidologie**, v. 50, n. 6, p. 759–778, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00684-x>.

RANKIN D.J., KOKKO H. Do males matter? The role of males in population dynamics. **Oikos**, v. 116, n. 2. p. 335-348, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2007.15451.x>

RATHKE, Christina *et al.* Dinâmica da cromatina durante a espermiogênese. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 3, p. 155-168, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2013.08.004>

RINDERER, T. E. *et al.*, 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

RHODES, J. W. *et al.*, Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. **Apidologie**, v. 42, p. 29-38, 2011. <https://doi.org/10.1051/apido/2010026>

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. <https://doi.org/10.4039/tce.2015.12>

RONAI, I.; OLDROYD, B. P.; VERGOZ, V. Queen pheromone regulates programmed cell death in the honey bee worker ovary. **Insect molecular biology**, v. 25, n. 5, p. 646-652, 2016. <https://doi.org/10.1111/imb.12250>

RUTTNER, H. Untersuchungen über die Flugaktivität und das Paarungsverhalten der Drohnen. III. Flugweite und Flugrichtung der Drohnen. **Z. Bienenforsch**, v.8, p. 332-354, 1966.

SANTOS, M.V.O. *et al.*, Heterologous in vitro fertilization and embryo production for assessment of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) frozen-thawed semen in different extenders. **Animal Reproduction**, v. 19, p. e20210093, 2022. doi: 10.1590/1984-3143-AR2021-0093. PMID: 35371300; PMCID: PMC8958878.

SARAVIA, F. *et al.* Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 196-203, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.052>

SCHLÜNS, H. *et al.*, Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. **Apidologie**, v. 34, n. 6, p. 577-584, 2003. <https://doi.org/10.1051/apido:2003051>

SILVA, A.M. *et al.* Validação de sondas moleculares fluorescentes na avaliação da viabilidade de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii*). In: **XIX Seminário de Iniciação Científica da UFERSA**, 2013, Mossoró. Anais do XIX Seminário de Iniciação Científica da UFERSA. Mossoró: UFERSA, 2013. v. 1. p. 158.

SLATER, G.P. How does genetic variation influence honey bee (*Apis mellifera*) drone fertility traits?. Purdue **University Graduate School. Thesis.** 2022. <https://doi.org/10.25394/PGS.20387460.v1>

SLATER, G.P.; YOCUM, G. D.; BOWSHER, J. H. Diet quantity influences caste determination in honeybees (*Apis mellifera*). **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1927, p. 20200614, 2020. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0614>

SMITH, D. S. 1968. **Insect cells: their structure and function**. Oliver & Boyd, Edinburgh, UK

STÜRUP, M. *et al.*, When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. **Behavioral Ecology**, v. 24, n. 5, p. 1192-1198, 2013. <https://doi.org/10.1093/beheco/art049>

SOROYE, P.; NEWBOLD, T.; KERR, J. Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. **Science**, v. 367, n. 6478, p. 685-688, 2020. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aax8591>

SZABO, T.I.; HEIKEL, D. T. Numbers of spermatozoa in spermathecae of queens aged 0 to 3 years reared in Beaverlodge, Alberta. **Journal of Apicultural Research**, v. 26, n. 2, p. 79-82, 1987. <https://doi.org/10.1080/00218839.1987.11100741>

TAHA, E. K.A.; ALQARNI, A.S. Morphometric and reproductive organs characters of *Apis mellifera jemenitica* drones in comparison to *Apis mellifera carnica*. **Int J Sci Eng Res**, v. 4, n. 10, p. 411-415, 2013. https://www.researchgate.net/publication/259493247_Morphometric_and_Reproductive_Organs_Characters_of_Apis_mellifera_jemenitica_Drones_in_Comparison_to_Apis_mellifera_carnica

TARLIYAH, L.; BOEDIONO, A.; PERGERAKAN, D. Spermatozoa lebah madu *Apis mellifera* L.(hymenoptera: Apidae) pada berbagai suhu penyimpanan dalam media pengencer dengan kadar glukosa yang berbeda. **Media Veteriner**, v. 6, p. 15-20, 1999. https://www.researchgate.net/profile/Arief-Boediono/publication/277773040_Motility_of_Honeybee_Apis_Mellifera_L_Hymenoptera_Apidae_Spermatozoa_in_Various_Storage_Temperature_in_Dilution_Media_Containing_Different_Glucose_Levels/links/5c8793e4a6fdcc88c39c343f/Motility-of-Honeybee-Apis-Mellifera-L-Hymenoptera-Apidae-Spermatozoa-in-Various-Storage-Temperature-in-Dilution-Media-Containing-Different-Glucose-Levels.pdf

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.

TOFILSKI, A., CHUDA-MICKIEWICZ, B., & CZEKOŃSKA, K. Circular movement of honey bee spermatozoa inside spermatheca. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 62, n. 2, p. 63–66, 2018. <https://doi.org/10.1080/07924259.2018.1445042> .

VAGNARELLI, Paola. Chromatin reorganization through mitosis. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 90, p. 179-224, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410523-2.00006-7>

WEGENER, J. *et al.* In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. **Cryobiology**, v. 65, n. 2, p. 126-131, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.04.010>

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

WHY BEES MATTER. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2018 <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/0f47dba8-ab04-4968-a2bc-8a9c06218653/content>

WOYKE, J. Die Wirkung aufeinanderfolgender Drohnen auf die Besamung der Königin. In: **Proceedings of International Federation of Beekeepers' Associations Congress of Apimondia, Prague**. 1963. p. 550-552.

WYSOKINSKA, A.; SZABLICKA, D. Integrity of Sperm Cell Membrane in the Semen of Crossbred and Purebred Boars during Storage at 17 C: Heterosis Effects. **Animals**, v. 11, n. 12, p. 3373, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11123373>

YÁNIZ, J.L.; SILVESTRE, M.A.; Santolaria, P. Sperm quality assessment in honey bee drones. **Biology**, v. 9, n. 7, p. 174, 2020. <https://doi.org/10.3390/biology9070174>

YÁNIZ, J.L. *et al.*, Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. **Reproduction in domestic animals**, v. 48, n. 4, p. 598-603, 2013. <https://doi.org/10.1111/rda.12132>

YÁNIZ, J. *et al.*, Microbiota Analysis of Ejaculated Honey Bee Drone Semen and the Effect of Semen Collection Method on Bacterial Loads. **Insects**, v. 15, n. 6, p. 377, 2024. <https://doi.org/10.3390/insects15060377>

ZENNOUCHE, O. S. *et al.* Structure and organization of the spermatozoa within the spermatheca of honey bee queens *Apis mellifera intermissa* L. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 577-581, 2015. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1173426>

ZHAO, H., *et al.*, Factors Influencing the Reproductive Ability of Male Bees: Current Knowledge and Further Directions. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 529, 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12060529> .

ZHOU, Weilie *et al.* Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). **Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications**, p. 1-40, 2007. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1