



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

KEWEN SANTIAGO DA SILVA LUZ

**INFLUÊNCIA DO AUMENTO DA TEMPERATURA SOBRE A
QUALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES DE *Melipona*
subnitida (APIDAE, MELIPONINI)**

MOSSORÓ

2018

KEWEN SANTIAGO DA SILVA LUZ

**INFLUÊNCIA DO AUMENTO DA TEMPERATURA SOBRE A
QUALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES DE *Melipona*
subnitida (APIDAE, MELIPONINI)**

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

Orientador: Prof. Dr. Michael Hrnckir

MOSSORÓ

2018

© 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.

L979i Luz, Kewen Santiago da Silva.
INFLUÊNCIA DO AUMENTO DA TEMPERATURA SOBRE A
QUALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES DE Melipona
subnitida (APIDAE, MELIPONINI) / Kewen Santiago
da Silva Luz. - 2018.
28 f. : il.

Orientador: Michael Hrcir.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2018.

1. Melipona. 2. Espermatozoides. 3. Mudanças
Climáticas. 4. Conservação. I. Hrcir, Michael,
orient. II. Título.

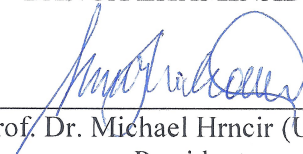
KEWEN SANTIAGO DA SILVA LUZ

**INFLUÊNCIA DO AUMENTO DA TEMPERATURA SOBRE A
QUALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES DE *Melipona*
subnitida (APIDAE, MELIPONINI)**

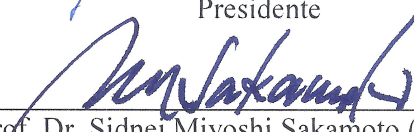
Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Defendida em: 17 / 09 / 2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Michael Hrnir (UFERSA)
Presidente



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFERSA)
Membro Examinador



Me. Andréia Maria Da Silva (UFERSA)
Membro Examinador

*Ao meu avô João Batista da Silva, à minha
grande amiga Soneide Leal (In Memoriam).*

Aos meus amados pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Maria Inês da Silva Luz e Maridelson Santos Luz por todo carinho e ensinamentos. Por sempre me apoiarem nas minhas escolhas, acreditarem no meu potencial e por serem meus exemplos de vida.

Agradeço ao meu orientador, Michael Hrnair, pelos ensinamentos, pela paciência, orientação e pelo exemplo como profissional.

Agradeço a Camila Maia da Silva por todo o conhecimento transmitido, apoio e orientação durante toda minha vida acadêmica.

Agradeço ao corpo docente do curso de Biotecnologia, em especial a Alexsandra Fernandes, Ana Carla Diógenes, Camila Pinheiro Jereissati, Fernanda Matias e Taffarel Torres, os quais terão sempre minha admiração e respeito.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Semi-Árido pelo apoio ao meu desenvolvimento como profissional.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Agradeço aos membros da banca examinadora por aceitarem avaliar e contribuir com o trabalho.

Agradeço a equipe do Laboratório de Ecologia Comportamental (BeeLab), em especial a Vinício Heidy, Noeide Ferreira, Sara Santiago, João Batista Filho, Aline de Souza e Paloma Fernandes, por todo auxílio, amizade e conselhos.

Agradeço a equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA), em especial a Andréia Maria, Alexandre Rodrigues e Constancia Nunes pelo apoio a execução desta pesquisa.

Agradeço a Sara Cilea, Belícia Santana, Francilane Costa, Luiz Fernando, Romana Rênerly, Bruna de Araújo e Tasyely Freire pela amizade construída ao longo desse período, por todo apoio emocional e ajuda nessa jornada.

Agradeço a Breno Holanda por sempre acreditar nas minhas ideias malucas, pelo incentivo e por sempre me ajudar nas horas que mais precisei.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização dessa pesquisa e com minha formação profissional e pessoal. A todos os meus sinceros agradecimentos.

“O futuro da abelha jandaíra será escrito por nós e pelas próximas gerações. O maior desafio será neutralizar os efeitos das mudanças climáticas, já em curso. Para isso, contamos com um exército de abelhas adaptadas aos locais de origem e o suporte para reconstrução ambiental trazido pelo conhecimento científico e pelo tradicional, um ao lado do outro. E pela união de todos em torno do uso sustentável e da conservação das abelhas.”

Vera Lucia Imperatriz-Fonseca

RESUMO

A abelha jandaíra, *Melipona subnitida*, é uma abelha sem ferrão que ocorre em toda a extensão do bioma Caatinga. Adaptada a temperaturas mais elevadas, baixa precipitação anual e elevado índice de radiação, essa abelha desenvolveu estratégias para sobreviver ao ambiente. Porém, devido à sua alta especialização, qualquer variação ambiental pode ocasionar mudanças fisiológicas que acarretem problemas ao seu processo reprodutivo. Com a previsão do aumento da média de temperatura do bioma Caatinga em 4 ° C, são necessários estudos que busquem identificar como a espécie reagirá fisiologicamente a essa mudança. Dessa forma é essencial o emprego de ferramentas de diagnóstico que permitam compreender a biologia reprodutiva da abelha jandaíra mediante elevações de temperatura. O trabalho objetivou estudar a qualidade dos espermatozoides na espermateca de rainhas na espécie de abelhas sem ferrão (*Melipona subnitida*) identificando o efeito da elevação da temperatura sobre a motilidade e viabilidade desses espermatozoides. Durante o estudo, foram produzidas e coletadas dezoito rainhas fisogástricas (fecundadas e com abdômen dilatado, devido ao desenvolvimento do aparelho reprodutor) um mês após fecundação. Desses indivíduos, seis foram submetidos a 30 °C, seis a 32 °C e seis a 34 °C em estufas incubadoras D.B.O. Após 24 horas na temperatura experimental, as rainhas foram sacrificadas e suas espermatecas foram extraídas por meio de dissecação. As espermatecas foram maceradas em 20 µL de solução fisiológica e o material obtido foi submetido às análises de viabilidade e motilidade. As análises revelaram que as abelhas expostas às temperaturas mais elevadas apresentam menor viabilidade e motilidade dos espermatozoides armazenados em suas espermatecas (viabilidade média: 30 °C: $81,2 \pm 15,1$ %; 32 °C: $74,5 \pm 10,2$ %; 34 °C: $35,8 \pm 16,1$ %; motilidade média: 30 °C: $52 \pm 21,4$ %; 32 °C: $55 \pm 10,5$ %; 34 °C: $7,5 \pm 9,8$ %). Com as previsões que demonstram um cenário de aumento de 4° C na temperatura do bioma, a reprodução e dispersão natural da espécie pode estar criticamente ameaçada devido à queda no número de indivíduos produzidos por rainhas que passaram pelo estresse fisiológico de um pico elevado de temperatura.

Palavras-chave: *Melipona*. Espermatozoides. Mudanças Climáticas. Conservação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Dessecação de rainhas de <i>Melipona subnitida</i>	15
Figura 2	–	Espermatozoides de <i>Melipona subnitida</i> marcados com iodeto de propídeo e hoescht 33342	17
Figura 3	–	Análise da sobrevivência e comportamento de rainhas de <i>Melipona subnitida</i> após submetidas a 24 horas em diferentes temperaturas.	18
Figura 4	–	Qualidade espermática de 18 rainhas de <i>Melipona subnitida</i> (n = 6 por tratamento) expostas a temperatura normal (30 ° C), média (32° C) e elevada (34 ° C) por um período fixo de tempo (24 horas)	19
Figura 5	–	Espermatozoide de <i>Melipona subnitida</i> corado com rosa de bengala, aumento de 400 vezes	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1	PRODUÇÃO DE MINICOLÔNIAS DE <i>MELIPONA SUBNITIDA</i>	13
2.2	EXPOSIÇÃO DE RAINHAS DE <i>MELIPONA SUBNITIDA</i> A DIFERENTES TEMPERATURAS	14
2.3	EXTRAÇÃO, COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO	14
2.3.1	Extração e coleta das espermatecas das rainhas fisogástricas	14
2.3.2	Análise da viabilidade espermática	15
2.3.3	Análise da motilidade espermática	16
2.3.4	Análise estatística	16
3	RESULTADOS	17
3.1	COMPORTAMENTO E MORTALIDADE DAS RAINHAS	17
3.2	QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN	18
4	DISCUSSÃO	20
4.1	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE QUALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES	20
4.2	PREVISÕES FUTURAS	22
5	REFERÊNCIAS	23
	APÊNDICE – CARACTERIZAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE <i>Melipona subnitida</i>	28

1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini) são um grupo de abelhas eussociais com distribuição pantrópica (MICHENER, 1974). A maioria dos meliponíneos ocorre nos neotrópicos, com cerca de 250 espécies descritas no território brasileiro (CAMARGO; PEDRO, 2013). *Melipona subnitida*, popularmente conhecida como abelha jandaíra, é uma abelha sem ferrão nativa do bioma Caatinga (ZANELLA; MARTINS, 2003; CAMARGO; PEDRO, 2013; ZANELLA; CARVALHO, 2017), sendo considerada uma espécie-chave para a região (FERRAZ et al., 2008). Adaptada a temperaturas elevadas, baixa precipitação anual e elevado índice de radiação, características inerentes a Caatinga (AGUIAR et al., 2002; PENNINGTON et al., 2000), essa abelha desenvolveu estratégias para sobreviver em meio das adversidades do ambiente (MAIA-SILVA et al., 2015). Uma das adaptações desenvolvidas pela abelha jandaíra para sobreviver às altas temperaturas desse bioma é a nidificação em ocos de certas espécies de árvores nativas (CAMARA et al., 2004; MARTINS et al., 2004), que fornecem um isolamento térmico suficiente do ninho em relação ao ambiente externo (SEDGELEY, 2001). Além desse mecanismo passivo de termorregulação (JONES; OLDROYD, 2007), *M. subnitida* utiliza de mecanismos ativos para regular o ambiente térmico do ninho, como por exemplo a ventilação, para evitar temperaturas críticas para o desenvolvimento da cria (FERREIRA et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Porém, por ser adaptada ao clima da região semiárida, onde há baixa variação e alta estabilidade na temperatura ambiental ao longo do ano (MAIA-SILVA et al., 2015; TORRES et al., 2017), esses mecanismos ativos dessa abelha não são muito desenvolvidos ou eficientes, assim como na maioria das espécies de meliponíneos (JONES; OLDROYD, 2007). Consequentemente, a temperatura do ninho pode variar de acordo com a temperatura ambiental (FERREIRA et al., 2017; SILVA et al., 2017). Mas, na situação climática atual e devido à estabilidade térmica da região, a variação térmica na área de cria é pequena, com temperaturas médias oscilando entre 28 a 32 °C ao longo do ano (FERREIRA, 2014). Ao contrário dos machos e operárias da espécie, as rainhas de *M. subnitida*, só saem uma única vez ao ambiente externo para a cópula (JAFFÉ et al., 2014) e permanecem o resto da sua vida dentro do ninho, especificamente na região dos discos de crias (SOMMEIJER, 1985), dessa forma estão altamente aclimatadas às variações mínima de temperatura dentro do ninho.

O aumento da temperatura ambiental da Caatinga e, por consequente, o aumento da temperatura interna do ninho podem acarretar sérios danos à reprodução da espécie. Silva e

coautores (2017) identificaram, que a rainha interrompe a postura de ovos assim que o ambiente do ninho atinge temperaturas elevadas. Portanto, devido à sua alta especialização, qualquer variação ambiental pode ocasionar mudanças fisiológicas nas rainhas de *M. subnitida*, que acarretem problemas ao seu processo reprodutivo, como visto em abelhas melíferas, *Apis mellifera* (PETTITS et al., 2016). Com a previsão do aumento da média de temperatura do bioma Caatinga por 4 °C até o fim desse século (ACOSTA et al., 2017; TORRES et al., 2017), são necessários estudos que busquem identificar como as espécies desse bioma reagirão fisiologicamente a essa mudança.

Torna-se essencial o emprego de ferramentas de diagnóstico que permitam compreender a biologia reprodutiva da abelha jandaíra mediante elevações de temperatura (MENESES et al., 2014). Entre as ferramentas para avaliar a biologia reprodutiva de abelhas podemos destacar o estudo da viabilidade espermática (proporção de espermatozoides viáveis em relação aos inviáveis), uma importante ferramenta de avaliação da qualidade do sêmen (COLLINS; DONOGHUE, 1999; DEN BOER et al., 2009; BAER et al., 2016). Outra ferramenta empregada é identificação da motilidade espermática, classificação da capacidade de deslocamento dos espermatozoides (WERNER; SIMONS, 2008).

Em abelhas, a análise de sêmen pode ser utilizada para determinar a qualidade dos machos reprodutivos de uma espécie como também a qualidade das fêmeas fecundadas (KOFFLER et al., 2016; PIEPLOW et al., 2017; JENKINS; GUZMAN, 2018). As fêmeas férteis das abelhas sociais, conhecidas como rainhas, possuem órgãos de armazenamento de espermatozoides no qual eles são mantidos viáveis até a fertilização, esse órgão é denominado espermateca (PITNICK et al., 1999). As rainhas de *M. subnitida* copulam com apenas um único macho durante toda sua vida reprodutiva e armazenam estes espermatozoides em suas espermatecas, mantendo-os viáveis por todo seu período de produção de crias (HUNTER; BIRKHEAD, 2012; JAFFÉ et al., 2014; KOFFLER et al., 2016). A qualidade desses espermatozoides armazenados na espermateca está diretamente relacionada à homeostase das rainhas (BAER et al., 2009; PETTIS et al., 2016; PAYNTER et al., 2017). Assim, qualquer elevação de temperatura pode ocasionar desregulações fisiológicas nas fêmeas férteis, que resultem na menor qualidade do sêmen armazenado, levando a queda da viabilidade e motilidade dos espermatozoides. Avaliando os cenários previstos para o futuro do bioma Caatinga, um aumento significativo de 4° C na temperatura pode interferir negativamente no sucesso reprodutivo de *M. subnitida* e sua qualidade espermática pode ser comprometida devido à elevação da temperatura do ambiente ocasionada pelas mudanças climáticas.

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo estudar a qualidade dos espermatozoides na espermateca de rainhas em *M. subnitida* e tentar identificar o efeito da elevação da temperatura sobre a motilidade e viabilidade desses espermatozoides. Esperava-se que abelhas rainhas submetidas a temperaturas acima do normal mostram uma redução na qualidade de seus espermatozoides, o que poderia prejudicar sua capacidade reprodutiva.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE MINICOLÔNIAS DE *MELIPONA SUBNITIDA*

Ao longo do experimento foram produzidas 8 minicolônias de *M. subnitida*. Em cada minicolônia foram introduzidos dois favos de cria maduros, identificados através de sua coloração amarelo clara, com cerca de 10 cm de diâmetro cada. Os favos foram colocados em cima de uma base de pilares de cera para evitar o contato direto com a madeira das caixas. Adicionalmente entre 30 a 40 de abelhas operárias recém-eclodidas foram colocadas nas minicolônias, destinadas aos cuidados e manutenção dos favos de cria. Posteriormente foram disponibilizados no interior de cada minicolônia cera de *Apis mellifera* (abelha africanizada), copos de café descartáveis contendo xarope de açúcar 50% como alimento energético (VILLAS-BÔAS, 2012) e potes semiartificiais de pólen como alimento proteico (VENTURIERI et al., 2015). Durante os 10 dias iniciais as minicolônias foram mantidas fechadas para evitar a interferência de algum inimigo natural ao experimento (ROUBIK, 1989; MAIA-SILVA et al., 2013). Foi registrado o desenvolvimento de cada minicolônia e a eclosão das rainhas virgens. Após a eclosão, as minicolônias foram abertas, o que possibilitou a saída das rainhas para o voo nupcial. Após a fecundação a rainha desenvolve seus ovários e dilata seu abdome (fisogastria) indicando o início da postura de ovos (VENTURIERI, 2009). Após o desenvolvimento das rainhas fisogástricas, processo que durou em média trinta dias, elas foram coletadas e submetidas as análises. Entre fevereiro de 2016 a agosto de 2018 as minicolônias foram observadas, e a cada 30 dias uma rainha fisogástrica jovem era coletada e destinada às análises. Após a retirada da rainha, cada minicolônia utilizada permaneceu 30 dias em observação e foi acompanhado o desenvolvimento de uma nova rainha fisogástrica para ser utilizada.

2.2 EXPOSIÇÃO DE RAINHAS DE *MELIPONA SUBNITIDA* A DIFERENTES TEMPERATURAS

Após atingirem a fisogastria, as rainhas foram coletadas através de gaiolas de captura artesanais. Adicionalmente foram coletadas quatro operárias para cada rainha com o objetivo de propiciar sua corte e alimentação, já que a rainha necessita de operárias para alimentá-la (MICHENER et al., 1974; SAKAGAMI et al., 1982; VILLAS-BÔAS, 2012).

No Laboratório de Ecologia Comportamental da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) cada grupamento de cinco abelhas (uma rainha mais quatro operárias) foi posto em uma pequena gaiola feita de madeira de 1,8 centímetros de espessura e com dimensões 14 x 06 x 14 cm, com suas laterais recobertas de tela (voil 100% poliéster) e foram fornecidos 5 ml de xarope de açúcar 50% em pequenos recipientes contendo algodão. Seis grupamentos experimentais foram submetidos a 30 °C (grupo controle, T30), seis a 32 °C (grupo experimental 1, T32) e seis a 34 °C (grupo experimental 2, T34) por 24 horas em estufas incubadoras D.B.O (Novatecnica NT 703) para simular uma temperatura limítrofe (32 °C) e um aumento de 2 °C acima da temperatura limítrofe (34 °C) em relação ao padrão de temperatura média encontrado nos discos de crias em volta de aproximadamente 30 °C (FERREIRA, 2014; FERREIRA et al., 2017; SILVA et al., 2017). Após de 24 horas foram avaliados o comportamento e a sobrevivência das rainhas e os indivíduos foram retirados da incubadora. O comportamento das rainhas foi definido como (i) sem anomalias, (ii) agitação ou (iii) letargia, dependendo do respectivo estado de cada indivíduo.

2.3 EXTRAÇÃO, COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO

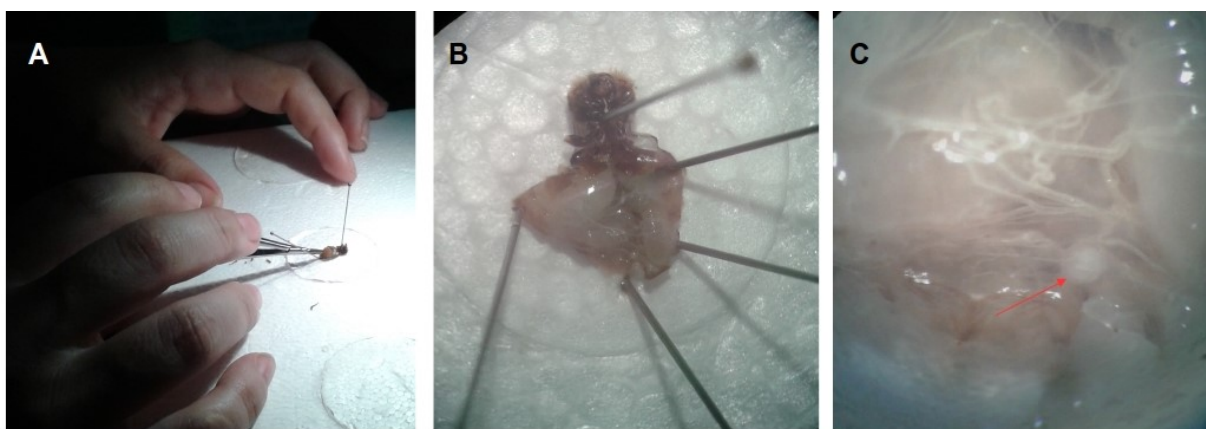
As extrações e análises do material obtido foram feitas no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

2.3.1 Extração e coleta das espermatecas das rainhas fisogástricas

Após retirada da incubadora, as rainhas foram dissecadas seguindo o protocolo de Dade (1994) com o auxílio de um estereomicroscópio (Wild/Leica® M3Z), tesoura oftalmológica (Abc®) placas de isopor 8 x 8 cm e alfinetes entomológicos nº 1 (Ento

Sphinx®) sem uso de protocolo anestésico para evitar qualquer interferência química proveniente da anestesia no metabolismo dos espermatozoides (MACKENSEN, 1947; PETTIS et al., 2016). Primeiro cortou-se a cabeça da rainha, depois as asas e as pernas. Posteriormente alfinetou-se o tórax na posição dorsoventral para fixar seu corpo à base de isopor. Depois de fixada alfinetou-se o último segmento abdominal dorsoventralmente na região anal deixando o abdômen imóvel para ser cortado. Com cuidado e precisão foram cortados os esternos longitudinalmente do último ao primeiro segmento abdominal (Figura 1A). As regiões cortadas foram alfinetadas e as vísceras abdominais expostas (Figura 1B). Após a exposição das vísceras localizou-se a espermateca (pequena esfera branca) nos segmentos finais do abdômen (Figura 1C), ela foi coletada com a ponta de um alfinete. Cada espermateca coletada foi macerada em um microtubo contendo 20 µl de solução fisiológica (COLLINS; DANOGHUE, 1999), o material obtido foi submetido às análises.

Figura 1 – Dessecação de rainhas de *Melipona subnitida*. (A) Abertura do abdômen longitudinalmente. (B) Rainha alfinetada com as vísceras abdominais expostas. (C) Localização da espermateca, indicado pela seta.



Fonte: Kewen Santiago (2017).

2.3.2 Análise da viabilidade espermática

Para avaliar a viabilidade dos espermatozoides seguiu-se o protocolo de Collins e Danoghe, (1999) com adaptações. Em um microtubo foram adicionados 5 µl do macerado obtido, em seguida foram adicionados 4 µl de solução Hoechst 33342 a 0,04 µg/mL, após 5 minutos foi adicionado mais 1 µl de solução de Iodeto de propídeo a 0,5 µg/mL e aguardou-se três minutos. Logo em seguida o material foi analisado em microscópio de fluorescência com

câmera acoplada (Olympus® DP72), foram analisados 100 espermatozoides por amostra e calculada a porcentagem dos espermatozoides viáveis e inviáveis (Figura 2).

2.3.3 Análise da motilidade espermática

A motilidade espermática pode ser analisada de forma subjetiva através de um avaliador treinado ou utilizando-se de métodos mais sofisticados, através da análise de sêmen assistida por computador (AL-LAWATI et al. 2009; CIERESZKO et al., 2017). Neste experimento, a metodologia clássica descrita por Kaftanoglu e Peng (1984) foi utilizada para a análise da motilidade dos espermatozoides. Devido à natureza da célula espermática, alongada, filamentosa e sem cabeça nuclear perceptível dos espermatozoides de *M. subnitida* (veja APÊNDICE), as metodologias tipicamente usadas em mamíferos domésticos (avaliação da motilidade assistida por computador) não foram possíveis (JENKINS; GUZMAN, 2018). Os espermatozoides se movem em ambientes líquidos e sua motilidade é determinada pela interação do flagelo ondulante com o meio circundante (MOORE; TAGGART, 1995).

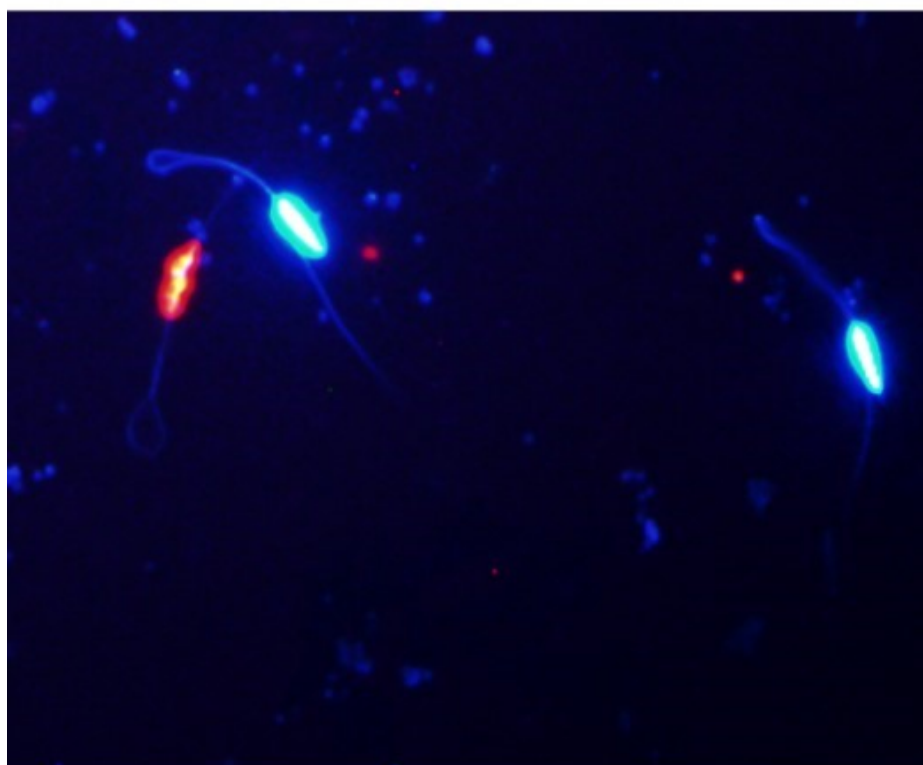
A forma de se caracterizar a motilidade encontrada em insetos é, de certa maneira, diferenciada da forma de classificação da motilidade de espermatozoides dos mamíferos domésticos (LECEWICZ et al., 2016; QIU et al., 2016; ROTA et al., 2018). Diferentemente dos mamíferos de produção que possuem em sua maioria o movimento progressivo de seus espermatozoides (CBRA, 2013), a motilidade dos espermatozoides dos insetos apresenta um padrão de movimento helicoidal duplo caracterizado pela presença de duas ondas flagelares sobrepostas, sendo uma onda de grande amplitude e baixa frequência e outra de pequena amplitude e alta frequência (BACCETTI, 1973). Para o estudo foram destinados 5 µl do macerado obtido para análise em microscopia ótica com aumento de 100 vezes (Eclipse E200, Nikon®). A motilidade da amostra foi classificada como ausente ou presente e quantificada a porcentagem de espermatozoides móveis em todo o campo visual (KAFTANOGLU; PENG, 1984). Esta etapa do procedimento foi executada sempre pelo mesmo avaliador objetivando minimizar os erros por subjetividade.

2.3.4 Análise estatística

A viabilidade e a motilidade dos espermatozoides foram comparadas entre os tratamentos experimentais (30, 32, 34 °C) através de análises de variância (*one way* ANOVA) com análise *post hoc* através do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. O nível de

significância para diferenças estatísticas foi $P \leq 0,05$. No texto, médias são representados como médias aritméticas $\pm$ desvio padrão.

Figura 2 – Espermatozoides de *Melipona subnitida* marcados com iodeto de propídeo e hoescht 33342. Em vermelho espermatozoide inviável marcado com iodeto de propídeo, em azul espermatozoide viável marcado com Hoescht 33342.



Fonte: Kewen Santiago (2016).

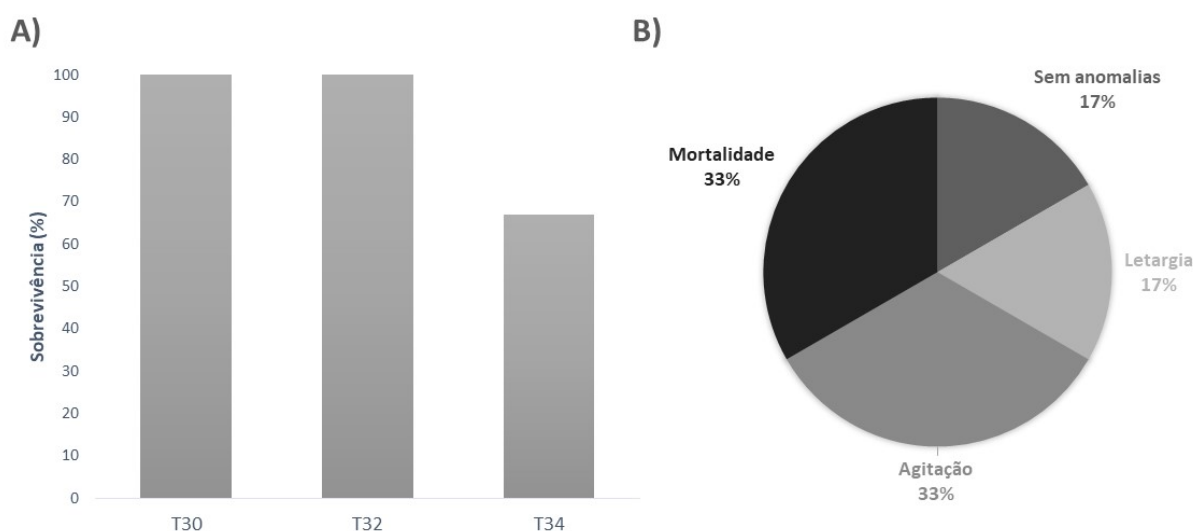
3 RESULTADOS

3.1 COMPORTAMENTO E MORTALIDADE DAS RAINHAS

Diferentemente dos indivíduos dos grupos experimentais submetidos a 30 e 32 °C, que não desenvolveram nenhuma anormalidade durante o tratamento térmico, as rainhas submetidas a uma temperatura de 34 °C desenvolveram comportamentos atípicos (Figura 3). Após 24 horas nas estufas incubadoras alguns indivíduos apresentaram agitação (comportamento frenético, andando por toda a estrutura da gaiola com rapidez sem entrar em

contato por trofolaxia com nenhum indivíduo de corte, $N = 2$ rainhas; 33%) ou letargia (Comportamento inerte com movimentos das pernas quase inexistentes, sem contato por trofolaxia com as operárias de corte, $N = 1$ rainhas; 17%). A taxa de mortalidade das rainhas expostas a 34 °C foi de 33 % ($N = 2$ rainhas). Apenas 17 % dos indivíduos desse grupo experimental ($N = 1$ rainha) não desenvolveram nenhuma anomalia em comparação com as rainhas dos outros tratamentos térmicos.

Figura 3 – Análise da sobrevivência e comportamento de rainhas de *Melipona subnitida* após submetidas a 24 horas em diferentes temperaturas. (A) Sobrevivência de rainhas de *M. subnitida* após tratamentos térmicos. (B) Anomalias encontradas em rainhas de *M. subnitida* expostas a 34°C durante 24 horas.



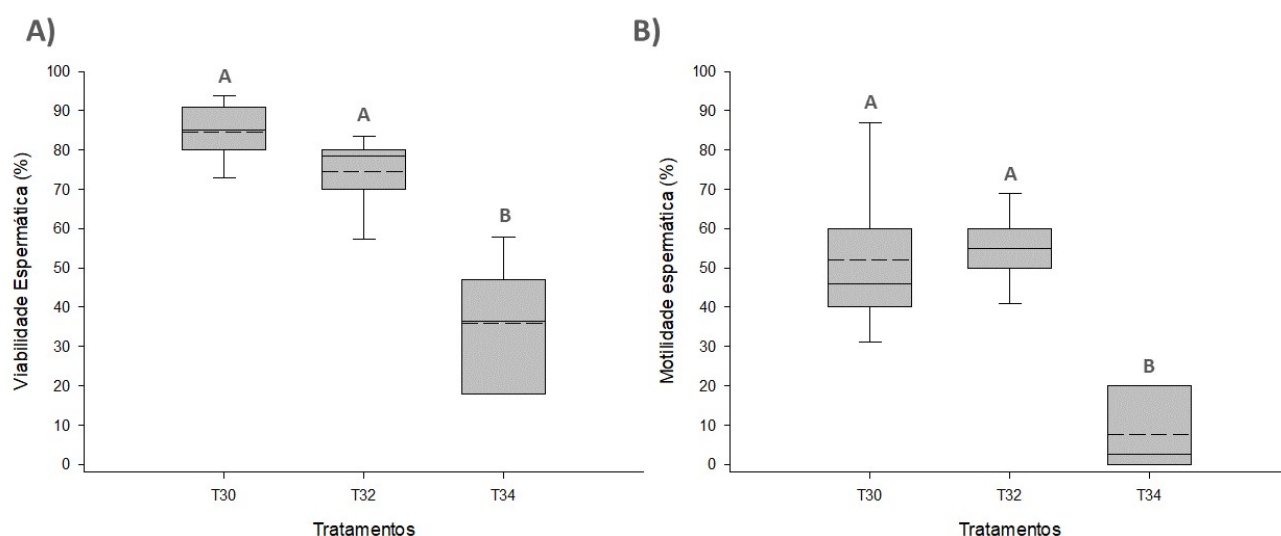
3.2 QUALIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN

A viabilidade espermática de *M. subnitida* diferiu significativamente entre os tratamentos térmicos (*one way* ANOVA, $F = 27,915$, $P < 0,001$). Os espermatozoides submetidos à temperatura de 30 °C (T30), temperatura encontrada no interior dos ninhos dessa espécie de abelha, apresentaram viabilidade média de $81,2 \pm 15,1$ %. O grupo submetido à temperatura de 32 °C (T32) apresentou viabilidade média de $74,5 \pm 10,2$ %. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos T30 e T32 (teste de comparações múltiplas Holm-Sidak, $P = 0,424$, Figura 4A). Foi observada uma redução elevada no número de espermatozoides viáveis presentes nas amostras submetidas à temperatura de 34 °C (T34,

viabilidade média = $35,8 \pm 16,1$ %). A viabilidade espermática nesse tratamento mostrou diferenças significativas em relação aos outros dois tratamentos térmicos (teste de Holm-Sidak, $P < 0,001$, Figura 4A).

Semelhante à viabilidade espermática, a motilidade espermática de *M. subnitida* diferiu significativamente entre os tratamentos térmicos (*one way* ANOVA, $F = 19,196$, $P < 0,001$). Quando submetidos a 30 e 32 °C, os espermatozoides apresentam motilidade média de $52 \pm 21,4$ % (T30) e $55 \pm 10,5$ % (T32), respectivamente. Não houve diferença significativa entre esses dois tratamentos térmicos (teste de Holm-Sidak, $P = 0,732$, Figura 4B). Porém, a motilidade espermática caiu para $7,5 \pm 9,8$ % quando as rainhas foram submetidas a 34 °C por 24 horas (Figura 4B). Essa diferença na motilidade entre o tratamento T34 em relação aos outros dois grupos experimentais foi estatisticamente significativa (teste de Holm-Sidak, $P < 0,001$, Figura 4B).

Figura 4 – Qualidade espermática de 18 rainhas de *Melipona subnitida* ($N = 6$ indivíduos por tratamento) expostas a 30, 32 ou 34 °C por 24 horas. (A) Viabilidade espermática. (B) Motilidade espermática. Box plot: caixa indica distribuição de 50% dos valores (entre os percentis 25% e 75%), linha horizontal contínua indica a mediana, linha horizontal tracejada indica a média, as hastes delimitam a distribuição entre os percentis 10% a 90 % dos valores. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas (*one way* ANOVA, teste de comparações múltiplas Holm-Sidak, $P \leq 0,05$).



4 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi demonstrada uma redução significativa da qualidade dos espermatozoides estocados nas espermatecas de rainhas de *M. subnitida* quando essas foram expostas a uma temperatura de 34 °C por 24 horas. Visto que essa temperatura experimental foi apenas 2 °C acima das temperaturas médias encontradas naturalmente dentro dos ninhos dessa espécie de abelha sem ferrão (FERREIRA, 2014; FERREIRA et al., 2017), a redução da qualidade espermática junto com o aumento da mortalidade das rainhas encontrado nos experimentos indica que um pequeno aquecimento ambiental pode causar efeitos dramáticos sobre a sobrevivência das colônias dessas abelhas. Portanto, dado um aumento da temperatura por 4 °C na Catinga previsto até o fim desse século (MARENGO et al., 2007; ACOSTA et al., 2017), o futuro de *M. subnitida* nesse bioma é ameaçado.

4.1 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A QUALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES

Naturalmente, a temperatura média dentro dos ninhos de *M. subnitida* varia entre 28 °C a 32 °C (FERREIRA, 2014; FERREIRA et al., 2017). Devido à reduzida eficiência de mecanismos ativos de termorregulação, a temperatura do ninho varia de acordo com a temperatura do ambiente externo (FERREIRA, 2014; FERREIRA et al., 2017; SILVA et al., 2017). Assim, qualquer aumento da temperatura externa causa um aumento da temperatura interna, o que, a partir de certo ponto crítico, pode provocar problemas fisiológicas para as abelhas (JONES; OLDROYD, 2007; AYTON et al., 2016). Em um experimento, em qual colônias de jandaíra foram expostas a temperaturas ambientais perto de 50 °C, Silva e coautores (2017) observaram uma redução da produção de cria logo após o aumento da temperatura. Os resultados do presente estudo agora indicam que essa parada abrupta de postura da rainha pode estar diretamente relacionada com uma interferência na fisiologia do indivíduo e consequente comprometimento da viabilidade dos espermatozoides armazenados na espermateca.

No presente estudo, os espermatozoides estocadas nas espermatecas das rainhas expostas temperaturas naturalmente encontradas nos ninhos de *M. subnitida* (30 e 32 °C) apresentaram viabilidade média de aproximadamente 80 %. Esses valores indicam que em condições naturais essas fêmeas conseguem manter a homeostase do material seminal proveniente dos machos com que copularam. Nessas condições térmicas controladas, a

viabilidade espermática variou entre 72 a 94 %. Essa variabilidade pode estar associada à variação individual entre as fêmeas em manter espermatozoides viáveis (BAER et al., 2012) ou a qualidade do semen dos machos com quem copularam (ROUSSEAU et al. 2015). A ausência de diferença significativa entre a viabilidade encontrada entre os tratamentos de 30 °C e 32 °C é um indicativo de que é possível manter a integridade dos espermatozoides armazenados na espermateca após exposição à uma temperatura supostamente limítrofe para as rainhas (FERREIRA, 2014). Os indivíduos submetidos à temperatura mais elevada (34 °C) apresentaram taxas de viabilidade significativamente inferiores em relação aos grupos submetidos às temperaturas de 30 e 32 °C. Essa queda na viabilidade podem estar relacionada à saúde da rainha submetida a uma temperatura não favorável e ao potencial de desestabilização da membrana plasmática dos espermatozoides promovido pela elevação da temperatura (PETTIS et al., 2016; BUNDGAARD, 2017).

Em 30 e 32 °C, aproximadamente a metade dos espermatozoides mostrou motilidade (52 e 55 %). Esses valores médios de motilidade espermática podem estar relacionados ao sistema de acasalamento de *M. subnitida* e ao comportamento encontrado em abelhas sociais de usarem apenas pequenas quantidades de semen para fertilizarem seus ovos (BAER et al., 2016). Devido ao fato que as rainhas do gênero *Melipona* acasalarem com apenas um único macho (ENGELS; IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; JAFFÉ et al., 2014; KOFFLER et al., 2016) não há competição entre os espermatozoides sobre a fertilização dos ovos e, consequentemente, altas taxas de motilidade não são imperativas para o sucesso reprodutivo (WERNER; SIMONS, 2008). Além disso, a motilidade de espermatozoides pode atuar como uma sinalização para as rainhas indicando o início do processo de fisogastria e postura, como mostrado em mariposas, onde a presença de motilidade na espermateca fornece o sinal para as fêmeas cessarem a atividade de acasalamento e iniciarem a atividade de postura (LACHANCE et al., 1978).

Quando expostas a 34 °C, a motilidade dos espermatozoides estocadas nas espermatecas das rainhas de *M. subnitida* caiu para menos que 10 %. Esse resultado é um indicativo que qualquer alteração na homeostase do semen armazenado pode ocasionar prejuízos ao seu sucesso reprodutivo (BAER et al., 2009). Outra hipótese provável é que o aumento da temperatura interfira diretamente no funcionamento da maquinaria enzimática necessária para manter o metabolismo energético dos espermatozoides dentro da espermateca (AL-LAWATI et al., 2009), como consequência da capacidade metabólica reduzida os espermatozoides reduzem sua motilidade.

4.2 PREVISÕES FUTURAS

Por ser adaptada a um ambiente com baixa variação térmica durante todo ano, a abelha jandaíra desenvolveu mecanismos de regulação interna do ninho primitivos quando comparados aos mecanismos desenvolvidos pela espécie *Apis mellifera*, proveniente de ambientes com alta amplitude térmica anual (JONES; OLDROYD, 2007; STABENTHEINER et al., 2010; FERREIRA et al., 2017). Devido ao seu potencial de termorregulação ativa, *A. mellifera* apresenta maior resistência a possíveis alterações climáticas ambientais do que *M. subnitida* e outras abelhas sem ferrão, que têm como principal estratégia de termorregulação a escolha de um local termicamente estável para nidificar (JONES; OLDROYD, 2007; FERREIRA et al., 2017).

As previsões das mudanças climáticas para a Caatinga até 2080 indicam um aumento médio da temperatura na região entre 3,1 e 4,6 °C (MARENGO et al., 2007; ACOSTA et al., 2017; TORRES et al., 2017). Devido à reduzida eficiência de termorregulação ativa, a temperatura média dentro dos ninhos das abelhas sem ferrão nesse bioma aumentará de acordo com o aumento da temperatura externa. Assim, mesmo o cenário menos negativo, com um aumento de 3,1 °C, resultará em temperaturas na área de cria que, segundo os resultados do presente estudo, podem ser consideradas críticas para a qualidade dos espermatozoides estocados nas espermatécas das rainhas de *M. subnitida*. Com isso, a reprodução e dispersão natural da espécie pode estar criticamente ameaçada devido à queda no número de indivíduos produzidos por rainhas que passaram pelo estresse fisiológico de um pico elevado de temperatura (PETTIS et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Aliado à elevação da temperatura ambiental, outra ameaça para *M. subnitida* é o desmatamento indiscriminado da vegetação silvestre utilizada pela espécie para a nidificação (MARTINS et al., 2004; FREITAS et al., 2009). A abelha jandaíra costuma nidificar em ocos de árvores antigas, espessas e lenhosas, isolantes térmicos que as protegem das variações de temperatura (DERBY; GATES, 1966; ROUBIK; 1989; SEDGELEY, 2001; CARVALHO et al., 2014). Com o desmatamento, é crescente a dificuldade enfrentada pela espécie para encontrar locais ideais à nidificação, dessa forma a jandaíra é obrigada a nidificar em ocos de árvores mais jovens, menos espessas e com menor proteção térmica, ou seja, estão mais sujeitas às variações de temperatura do ambiente (JONES; OLDROYD, 2007; FERREIRA et

al., 2017). Sem o isolamento térmico ideal e com o aumento previsto da temperatura na Caatinga, são altas as chances da espécie não conseguir manter seu padrão de reprodução e dispersão, estando dessa forma criticamente ameaçada. É de extrema importância a conservação da vegetação nativa da caatinga para permitir a amortização do impacto do aumento da temperatura do ambiente sobre a reprodução de *M. subnitida*.

5 REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. L.; GIANNINI, T. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M. Mudanças climáticas na Caatinga com ênfase no Rio Grande do Norte: Breve Análise e síntese. **A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro**. Editora Universitária da UFERSA, Mossoró, Brasil, p. 185-199, 2017.

AGUIAR, J. et al. **The Caatinga**. In: GIL, P. R. (Ed.). *Wilderness: Earth's last wild places*. Ciudad de Mexico: CEMEX, p. 174-181, 2002.

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

AYTON, S.; TOMLINSON, S.; PHILLIPS, R. D.; DIXON, K. W.; WITHERS, P. C. Phenophysiological variation of a bee that regulates hive humidity, but not hive temperature. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 1552–1562, 2016.

BACCETTI, B.; BURRINI, A. G.; DALLAI, R.; GIUSTI, F.; MAZZINI, M.; RENIERI, T.; ROSATI, F.; SELMI, G. Structure and function in the spermatozoon of *Tenebrio molitor*. **Journal of Mechanochemistry and Cell Motility**, v. 2, p. 149–161, 1973a.

BAER, B.; COLLINS, J.; MAALAPS, K.; DEN BOER, S. P. A. Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 2877–2885, 2016.

BAER, B.; EUBEL, H.; TAYLOR, N. L.; O'TOOLE, N.; MILLAR, A. H. *Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee Apis mellifera*. **Genome Biology**, v. 10, v. 6, p. 1-16, 2009.

BOER, S. P. A. D.; BOOMSMA, J. J.; BAER, B. Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 538-543, 2009.

BUNDGAARD, J.; BARKER, J. S. F. Genetic variation for resistance to high temperature stress of mature sperm – a study in *Drosophila*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, 2017.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Acessado em < <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em Agosto de 2018.

CARVALHO, A. T.; KOEDAM, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Register of a new nidification substrate for *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): The arboreal nest of the termite *Constrictotermes cyphergaster* Silvestri (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 428–434, 2014.

CARVALHO, A. T.; ZANELLA, F. C. V. Espécies de abelhas sem ferrão criadas no estado do Rio Grande do Norte. **A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro**. Editora Universitária da UFERSA, Mossoró, Brasil, p. 41-72, 2017.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

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

COLLINS, A. M.; DONOGHUE, A. M. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. **Theriogenology**, v. 51, p. 513-1523, 1999.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo, SP: Editora UNESP, v. 1, 1 ed., 408p., 2009.

DADE, H. A. **Anatomy and dissection of the honeybee**. The Alden Press, Oxford, 2 ed., p. 158, 1994.

DERBY, R. W.; GATES, D. M. The temperature of tree trunks – calculated and observed. **American Journal of Botany**, v. 53, p. 580-587, 1966.

ENGELS, W.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. **Social insects**, p. 167–230, 1990.

FERRAZ, R. E.; LIMA, P. M.; PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. C.O.; FEIJÓ, F. M.C. Microbiota fungica de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 3, p. 345-346, 2008.

FERREIRA, N. S. **Temperatura colonial e tolerância térmica de *Melipona subnitida*, uma espécie de abelha sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), da Caatinga**. 2014. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró. 2014.

FERREIRA, N. S.; TEIXEIRA-SOUZA, V. H. S.; FILHO, G. F. S.; MAIA-SILVA C.; HRNCIR, M. Como a abelha jandaíra consegue sobreviver no calor da caatinga? **A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro**. Editora Universitária da UFERSA, Mossoró, Brasil, p. 201-209, 2017.

FREITAS, B. M.; FONSECA, V. L. I.; MEDINA, L. M.; KLEINERT, A. M. P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 332-346, 2009.

HUNTER, F. M.; BIRKHEAD, T. R. **Sperm viability and sperm competition in insects**.

Current Biology, v. 12, p. 121–3, 2002.

JAFFÉ, R.; PIOKER-HARA, F.C.; SANTOS, C.F.; SANTIAGO, L.R.; ALVES, D.A.; KLEINERT, A. M. P.; FRANCOY, T. M.; ARIAS, M. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Monogamy in large bee societies: a stingless paradox. **Naturwissenschaften**, v. 101, p. 261–4, 2014.

JENKINS, J. A.; GUZMAN, L. I. Advances in honeybee drone sperm quality assays. **Animal Reproduction Science**, v. 194, p. 22, 2018

JONES, J. C.; OLDROYD, B. P. Nest thermoregulation in social insects. **Advances in Insect Physiology**, v. 33, p. 154–185, 2007.

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

KOFFLER, S.; MENESES, H. M.; KLEINERT, A. M. P.; JAFFÉ, R. Competitive males have higher quality sperm in a monogamous social bee. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 195, 2016.

LACHANCE, L. E.; PROSHOLD, F. I.; RUUD, R. L. (1978). Pink bollworm: effects of male irradiation and ejaculate sequence on female ovipositional response and sperm radiosensitivity. **Journal of Economic Entomology**, v. 71, n. 2, p. 361–365, 1978.

LECEWICZ, M.; KORDAN, W.; MAJEWSKA, A.; KAMIŃSKI, S.; DZIEKOŃSKA, A.; MIETELSKA, K. Effects of the platelet-activating factor (PAF) on selected quality parameters of cryopreserved bull semen (AI) with reduced sperm motility. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 1, p. 147-158, 2016.

MACKENSEN, O. Effect of Carbon Dioxide on Initial Oviposition of Artificially Inseminated and Virgin Queen Bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 40, n. 3, p. 344–349, 1947.

MAIA-SILVA, C.; HRNCIR, M.; KOEDAM, D.; MACHADO, R. J. P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Out with the garbage: the parasitic strategy of the mantisfly *Plega hagenella* mass-infesting colonies of the eusocial bee *Melipona subnitida* in northeastern Brazil. **Naturwissenschaften**, v. 100, n. 1, p. 101-105, 2013.

MAIA-SILVA, C.; HRNCIR, M.; SILVA, C. I.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Survival strategies of stingless bees (*Melipona subnitida*) in an unpredictable environment, the Brazilian tropical dry forest. **Apidologie**, v. 46, n. 5, p. 631–643, 2015.

MARENGO, J. A. **Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade: caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 212 p., 2007.

MARTINS, C. F.; LAURINO, M. C.; KOEDAM, D.; FONSECA, V. L. I. Espécies arbóreas utilizadas para nidificação por abelhas sem ferrão na caatinga (Seridó, PB; João Câmara, RN). **Biota Neotrop**, v.4, n. 2, p.1-8, 2004.

- MENESES, H. M.; KOFFLER, S.; FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; JAFFÉ, R. Assessing sperm quality in Stingless Bees. **Sociobiology**, v. 61, p. 517–522, 2014.
- MICHENER, C. D. 1974. *The Social Behavior of the Bees. A Comparative Study*. Cambridge, Harvard University.
- MOORE, H. D. M.; TAGGART, D. A. Sperm pairing in the opossum increases the efficiency of sperm movement in a viscous environment. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 947–953, 1995.
- PAYNTER, E.; MILLAR, A. H.; WELCH, M.; BAER-IMHOOF, B.; CAO, D.; BAER, B. Insights into the molecular basis of long-term storage and survival of sperm in the honeybee (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, p.1–9, 2017.
- PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. E.; PENDRY, C. A. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography**, v. 27, p. 261-273, 2000.
- PETTIS, J. S.; RICE, N.; JOSELOW, K.; VANENGELSDORP, D.; CHAIMANEE, V. Correction: 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. 5, 2016.
- PIELOW, J. T.; BRAUBE, J.; VAN PRAAGH, J. P.; MORITZ, R. F. A.; ERLER, S. A scientific note on using large mixed sperm samples in instrumental insemination of honeybee queens. **Apidologie**, v. 48, p. 716, 2017.
- PITNICK, S.; MARKOW, T.; SPICER, G. S. Evolution of multiple kinds of female sperm-storage organs in Drosophila. **Evolution**, v. 53, p. 1804–22, 1999.
- QIU, J.-H.; LI, Y.-W.; XIE, H.-L.; LI, Q.; DONG, H.-B.; SUN, M.-J.; GAO, W.-Q.; TAN, J.-H. Effects of glucose metabolism pathways on sperm motility and oxidative status during long-term liquid storage of goat semen. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 839-849, 2016.
- ROTA, A.; SABATINI, C.; PRZYBYŁ, A.; CIARAMELLI, A.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Post-thaw Addition of Caffeine and/or Pentoxifylline Affect Differently Motility Characteristics of Horse and Donkey Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 85-86, 2018.
- ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. New York, Cambridge University Press, v. 248, 514p., 1989.
- SAKAGAMI, S. F. 1982. *Stingless bees*, p. 361-423. In : H. R. HERMANN (ed.). *Social Insects III*. New York, Academic Press. 459 p.
- SEDGELEY, J. A. Quality of cavity microclimate as a factor influencing selection of maternity roosts by a tree-dwelling bat, *Chalinolobus tuberculatus*, in New Zealand. **Journal of Applied Ecology**, v. 38, n. 2, p. 425-438, 2001.
- SILVA, M. A.; FERREIRA, N. S.; TEIXEIRA-SOUZA, V. H. S.; MAIA-SILVA, C.; HRNCIR, M. On the thermal limits for the use of stingless bees as pollinators in commercial greenhouses. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 81–90, 2017.

SOMMEIJER, M. J. The Social Behavior of *Melipona favosa*: Some Aspects of the Activity of the Queen in the Nest. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 58, n. 3, p. 386–396, 1985.

STABENTHEINER, A.; KOVAC, H.; BRODSCHNEIDER, R. Honeybee Colony Thermoregulation – Regulatory Mechanisms and Contribution of Individuals in Dependence on Age, Location and Thermal Stress. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

TORRES, R. R.; LAPOLA, D. M.; GAMARRA, N. L. R.; Future climate change in the Caatinga. **Caatinga the largest tropical dry forest region in south america**. Springer, Cham, Suíça, p. 383-410, 2017.

VENTURIERI, G. C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2 ed., 60p., 2009.

VENTURIERI, G. C.; BAQUERO, P. L.; COSTA, L. Formação de Minicolônias de Uruçu-Cinzenta [*Melipona fasciculata* Smith 1858 (Apidae, Meliponini)]. Belém - PA: Documentos/Embrapa Amazônia Oriental, 1 ed., p. 28, 2015.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão**. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPAN), Brasília – DF, Brasil, 2012.

WERNER, M.; SIMMONS, L. W. Insect sperm motility. **Biological Reviews**, v. 83, n. 2, p. 191–208, 2008.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. Abelhas da caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. **Ecologia e Conservação da caatinga**, Editora Universitária da UFPE, Recife, Brasil, p. 75-134, 2003.

APÊNDICE – CARACTERIZAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE *Melipona subnitida*

A nível de complementação dos dados obtidos através da motilidade e viabilidade, foram também analisados a concentração e a morfologia dos espermatozoides de todas as amostras analisadas.

O método tradicional e mais empregado de quantificação de espermatozoides faz uso de diluições da amostra com posterior análise em câmara de contagem de células (COBEY et al., 2013). É um método empregado para quantificar o germoplasma utilizado em biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial e a criopreservação (HOPKINS et al., 2016; PIEPLOW et al., 2017). Para avaliar a concentração de espermatozoides seguiu-se o protocolo de Menezes et al., (2014) com adaptações. Uma alíquota de 5 µl do material biológico proveniente do macerado da espermateca foi diluída em 1000 µl e analisada em câmara de Neubauer. Foi encontrado uma média de $1.733.300 \pm 798.808$ espermatozoides por espermateca de rainhas de *M. subnitida*. Vale ressaltar que todas as rainhas utilizadas no experimento tinham em média 30 dias de vida desde a sua eclosão, ou seja, eram rainhas recém-fecundadas e portadoras de toda a carga de espermatozoides de apenas um macho (KOFFLER et al., 2016). Outra razão para o experimento ser conduzido com rainhas jovens na faixa etária de um mês de vida se deu devido à alta disparidade encontrada entre a concentração de espermatozoides nas espermatecas de rainhas jovens e rainhas velhas (PETTITS et al., 2016), o que poderia interferir diretamente no estudo proposto.

Para a caracterização morfológica e morfométricas dos espermatozoides foram feitas lâminas contendo 5 µl do macerado da espermateca mais 5 µl do corante fixador rosa de bengala na concentração 15 µg/mL analisadas em microscópio óptico com câmera acoplada (LEICA DM 2500). Foram mensurados 100 espermatozoides por lâmina, seu comprimento aferido através do software LAS V4.0 (figura 5). O espermatozoide de *M. subnitida* apresenta formato, dimensões e estruturas similares aos de outros Hymenoptera sendo caracterizados como uma célula filamentosa (filiforme), na qual se distingue uma cabeça e uma cauda com o mesmo diâmetro. Os espermatozoides mensurados apresentaram comprimento total de $95,2 \pm 4,3$ µm. Sua cabeça é formada pelo acrossoma e núcleo, e a cauda por um flagelo e dois derivados mitocondriais (CRUZ-LANDIM, 2009).

Figura 5 – Espermatozoide de *Melipona subnitida* corado com rosa de bengala, aumento de 400 vezes.



Fonte: Kewen Santiago (2016).

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO:

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.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo, SP: Editora UNESP, v. 1, 1 ed., 408p., 2009.

HOPKINS, B. K.; COBEY, S. W.; HERR, C.; SHEPPARD, W. S. Gel-coated tubes extend above-freezing storage of honey bee (*Apis mellifera*) semen to 439 days with production of fertilised offspring. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 1944-194, 2016.

KOFFLER, S.; MENESES, H. M.; KLEINERT, A. M. P.; JAFFÉ, R. Competitive males have higher quality sperm in a monogamous social bee. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, p. 195, 2016.

MENESES, H. M.; KOFFLER, S.; FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; JAFFÉ, R. Assessing sperm quality in Stingless Bees. **Sociobiology**, v. 61, p. 517–522, 2014.

PETTIS, J. S.; RICE, N.; JOSELOW, K.; VANENGELSDORP, D.; CHAIMANEE, V. Correction: 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. 5, 2016.

PIEPLOW, J. T.; BRAUBE, J.; VAN PRAAGH, J. P.; MORITZ, R. F. A.; ERLER, S. A scientific note on using large mixed sperm samples in instrumental insemination of honeybee queens. **Apidologie**, v. 48, p. 716, 2017.