

Diferentes fases reprodutivas da vida da rainha (*Apis mellifera* L.): O que a espermateca tem?

Different reproductive phases of the queen's life (*Apis mellifera* L.): What does the spermatheca have?

Nayane Rubio Pereira¹, Vitória Alves Pereira², Luciane Xavier Ferreira³, Victor Gabriel de Faria Pastre⁴, Fabiana Martins Costa Maia⁵

RESUMO

O descarte de abelhas rainhas é um manejo eficiente quando se há controle zootécnico do desempenho das colônias. Contudo, na maioria das vezes na produção nacional, as rainhas são descartadas de forma incorreta. Com o intuito de enfatizar a importância do controle de informações das colônias, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a concentração espermática de rainhas recém fecundadas e rainhas ao descarte. Primeiramente realizou-se a mensuração de externa das rainhas e posteriormente foram dissecadas. Foi retirada a espermateca e colocada em um microtubo contendo solução Ringer a 36°C. A concentração foi obtida através de protocolo utilizando a Câmara de Neubauer. Para a análise estatística foi utilizado o programa RStudio para calcular as médias, com valores de 2,61±0,8 e 2,88±1 milhões de espermatozoides para rainhas descartadas e recém fecundadas, respectivamente, utilizando concentração de $\times 10^6$. Em seguida foi realizado o teste T-Student para comparar os grupos. Com os resultados obtidos, determinou-se que não houve diferença significativa entre os grupos, o que levanta duas hipóteses. Primeira, as rainhas recém fecundas possuem baixa qualidade e segunda, as rainhas descartadas ainda poderiam continuar a campo e foram descartadas incorretamente.

PALAVRAS-CHAVE: colônias; concentração espermática; controle zootécnico..

ABSTRACT

The disposal of queen bees is an efficient management when there is zootechnical control of the performance of the colonies. However, most of the time in national production, queens are discarded incorrectly. With the aim of emphasizing the importance of controlling colony information, the objective of this work was to compare the sperm concentration of newly fertilized queens and culling queens. First, the external dimensions of the queens were measured and they were subsequently dissected. The spermatheca was removed and placed in a microtube containing Ringer's solution at 36°C. The concentration was obtained through a protocol using the Neubauer Chamber. For the statistical analysis, the RStudio program was used to calculate the averages, with values of 2,61±0,8 and 2,88±1 million spermatozoa for discarded and recently fertilized queens, respectively, using a concentration of $\times 10^6$. The T-Student test was then performed to compare the groups. With the results obtained, it was determined that there was no significant difference between the groups, which raises two hypotheses. First, the newly fertilized queens are of poor quality and second, the discarded queens could still continue to field and were incorrectly discarded.

¹ Bolsista da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: nayanerubio@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 7992252763818380.

² Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: vitoriaalvespereira@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 3279440371956718.

³ Mestre em Biociências e Biotecnologia, Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia na Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil. E-mail: fabianamcosta@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7593827370991752.

⁴ Doutorando no Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Médica na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.. E-mail: fabianamcosta@utfpr.edu.br. ID Lattes: 9808897914695722.

⁵ Docente na UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: fabianamcosta@utfpr.edu.br. ID Lattes: 6327885831127043.

KEYWORDS: colonies; sperm concentration; zootechnical control.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a produção e exportação apícola brasileira aumentou, entretanto, o país tem muito a crescer em produtividade. O mercado apícola mundial é diverso, e os países que têm as maiores produtividades investem na troca sistemática de rainhas. No Brasil, não existe estatística oficial sobre a produção das rainhas (IBGE, 2023), nem tampouco sobre a comercialização, substituição ou qualidade das mesmas.

A rainha africanizada tem vida útil, pois, por fecundar apenas uma vez na vida terá um estoque de espermatozoides finito que é armazenado na espermateca (WINSTON, 1987). Trabalhos já demonstraram que a qualidade espermática é variável entre rainhas da mesma fase reprodutiva (ANDRADE, 2023; PEREIRA, 2023). A associação da qualidade do estoque de espermatozoides em rainhas, com a qualidade delas já foi estudada, entretanto, poucos estudos estão disponíveis quando em diferentes fases reprodutivas (HARBO, 1979; SZABO & HEIKEL, 1987; LODESANI, BALDUZZI & GALLI, 2004).

Logo após o processo de fecundação, em torno de 4 a 7 milhões de espermatozoides serão armazenados na espermateca (AL-LAWATI; KAMP; BIENEFELD, 2009; COBEY, 2007; DELANEY et al., 2011), e diminuem logaritmicamente com a idade da rainha (SZABO & HEIKEL, 1987). Nesse sentido, a concentração de espermatozoides estocados na espermateca de rainhas poderá indicar a qualidade das mesmas. Visto que no Brasil, com as abelhas africanizadas pouco se sabe sobre a qualidade de rainhas, o objetivo foi avaliar a concentração de espermatozoides em rainhas ao descarte, e compará-las com as recém fecundadas.

MATERIAL E MÉTODOS

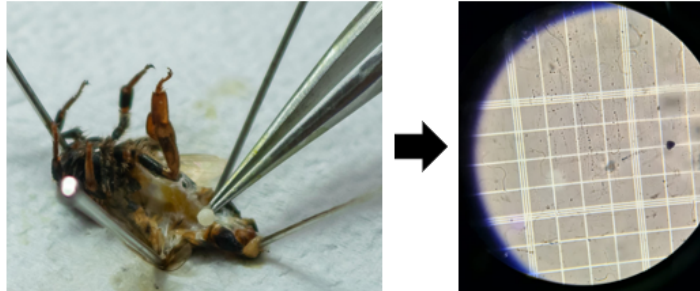
O estudo foi realizado na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão - UNEPE/Apicultura, Laboratório de Reprodução e Controle Biológico (LABCON), pertencentes a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Ao total foram avaliadas 47 rainhas recém-fecundadas, e 47 rainhas ao descarte, todas vindas de apiculturas comerciais.

As rainhas foram dissecadas sob Microscópio Estereoscópio Binocular Zoom (QUIMIS Q714Z-1, Piracicaba, São Paulo-Brasil), com auxílio de tesoura Cirúrgica Oftálmica Capsulotomia Curva (Vannas IM-283AA, Kazan, Rússia) e pinça tipo relojoeiro 12cm reta. O tórax e abdome foram fixados com alfinetes na placa de cera de abelha, em seguida foi realizada a incisão lateral para remoção da cutícula do exoesqueleto ventral (Figura 1). Para cada rainha, a espermateca foi retirada, conservada de forma individual e identificada em microtubo do tipo Eppendorf contendo 250 µl de solução de ringer (KAFTANOGLU; PENG, 1984) em uma temperatura de 36°C.

Em seguida, foi realizada a lavagem da espermateca utilizando a solução Ringer, com um ajuste de 1mL para a solução do sêmen que foi posteriormente homogeneizado através da pipeta. A concentração espermática foi obtida por meio do protocolo de Collins e Donoghue (1999), adaptado por Rousseau et al., (2015), utilizando a Câmara de Neubauer. Para a contagem foram utilizados cinco quadrados distintos ($0,1 \text{ mm}^3 = 0,1$

mL), sendo levados em consideração os quatros cantos e o centro do hemocitômetro (Figura 1). Ao total foram avaliadas duas vezes, e o cálculo total dos espermatozoides foi obtido através da seguinte Eq. (1).

Figura 1 – Retirada e análise dos espermatozóides



Fonte: Arquivo ΔGBee (2020).

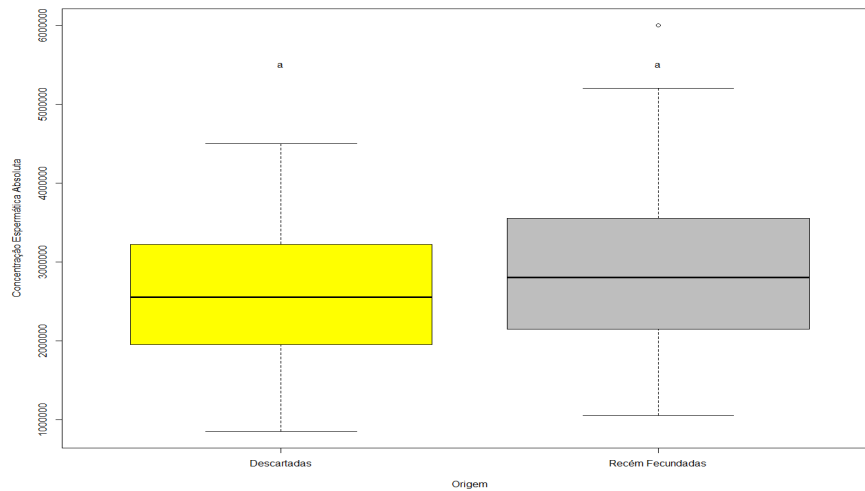
$$\text{Total de células} = \frac{[(\text{Contagem 1} * 5 * 10 * 2 * 1000) + (\text{Contagem 2} * 5 * 10 * 2 * 1000)]}{2} \quad (1)$$

Foi realizada a tabulação dos dados, e posteriormente submetidos a análise estatística no programa R studio 4.3.1 (2023). Primeiramente foram realizadas as médias para os dois tratamentos (rainhas recém fecundadas e rainhas ao descarte), e em seguida realizado o Teste T-Student.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações médias e desvios padrão de espermatozóides encontradas para rainhas recém-fecundadas e ao descarte, foram de $2,88 \pm 1,00$ e $2,61 \pm 0,80$ milhões, respectivamente (Figura 2). Os grupos avaliados não foram diferentes ($p > 0,05$), o que de certa forma parece não fazer sentido, visto que se espera que rainhas recém fecundadas tenham uma concentração espermática maior por ainda não terem iniciado a utilização do estoque de espermatozoides (HARBO, 1979; LODESANI, BALDUZZI & GALLI, 2004).

Figura 2 – Concentração espermática dos grupos de rainhas



Fonte: Autoria própria (2023).

Os valores médios encontrados neste trabalho são inferiores (50%) aos já descritos na literatura para rainhas europeias: $4,37 \pm 1,45$ milhões (TARPY et al., 2012); e $3,99 \pm 1,50$ milhões de espermatozoides (DELANEY et al., 2011). Visto que a fecundação se trata de um processo sob influência ambiental, comparações entre rainhas europeias e africanizadas devem ser tomadas com cautela.

O ambiente tem grande influência na criação das rainhas, na fecundação e até mesmo no próprio desempenho (WITHROW, PETTIS, TARPY, 2019). Isso fica claro para ambas as fases reprodutivas avaliadas, por apresentarem coeficientes de variação muito parecidos (36,77% - recém-fecundadas; 34,30% - ao descarte), além das médias e desvios já descritos, indicando que existe uma grande variação dentro dos grupos.

Na prática podemos inferir que, para o grupo de rainhas recém-fecundadas provavelmente não houve um padrão na fecundação natural, e boa parte das rainhas foram mal fecundadas, uma vez que os valores mínimo e máximo foram de 1,05 e 6,00 milhões de espermatozoides, respectivamente. Para as rainhas ao descarte, a amplitude da variação se repete (0,85 e 4,50 milhões), porém o fator que a causa pode estar ligado ao descarte indevido de rainhas ainda viáveis, em função da ausência de controle zootécnico. Pereira et al. (2023) verificaram que a falta de controle zootécnico no momento do descarte, elimina 25% de rainhas com boa concentração e viabilidade espermática.

Cabe ressaltar que não apenas a fecundação poderá influenciar a concentração de espermatozoides na espermateca das rainhas. Trabalhos recentes vêm demonstrando que oscilações de temperaturas durante o transporte (WITHROW, PETTIS, TARPY, 2019), exposição a pesticidas (PETTIS et al., 2016) e infecções por patógenos (GAUTHIER et al., 2011) também influenciam de maneira negativa o estoque de espermatozoides.

CONCLUSÃO

Rainhas jovens e rainhas velhas mostraram concentrações espermáticas semelhantes. Resultado que não era esperado, que mesmo após um período de

oviposição da rainha ela ainda apresentasse concentrações médias similares a recém-fecundadas. A amplitude alta pode ser explicada por dois principais fatores: rainhas jovens com fecundação inadequada e rainhas descartadas precocemente, devido a falta de controle zootécnico a campo.

Agradecimentos

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA) pelo apoio financeiro disponibilizado e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento do projeto.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

AL-LAWATI, H; KAMP, G; BIENEFELD, K. Características do conteúdo da espermateca de rainhas de abelhas velhas e jovens. **Revista de fisiologia de insetos**, v. 55, n. 2, p. 117-122, 2009.

ANDRADE, R. S. **Qualidade de rainhas *Apis mellifera* africanizadas (Hymenoptera: Apidae): delineamento do perfil comercial**. 2023. 68 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2023. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/31356>. Acesso em: 01 ago. 2023.

BRUTSCHER, L. M; BAER, B; NIÑO, E. L. Putative drone copulation factors regulating honey bee (*Apis mellifera*) queen reproduction and health: A review. **Insects**, v. 10, n. 1, p. 8, 2019.

COBEY, S. W. Estudos comparativos de rainhas de abelhas melíferas inseminadas instrumentalmente e acasaladas naturalmente e fatores que afetam seu desempenho. **Apidologie**, v. 4, p. 390-410, 2007.

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

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

GAUTHIER, L; RAVALLEC, M; TOURNAIRE, M; COUSSERANS, F; BERGOIN, M; DAINAT, B; MIRANDA, J. R. Viruses Associated with Ovarian Degeneration in *Apis mellifera* L. Queens. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e 16217, 2011.

HARBO, J. R. Storage of honeybee spermatozoa at- 196°. **Journal of Apicultural Research** , v. 1, pág. 57-63, 1979.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo Agropecuário 2023**. Disponível em:
https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuaria.html?utm_source=landing&utm_medium=explica&utm_campaign=producao_agropecuaria. Acesso em: 24 set. 2023.

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

KNELL, R. J; WEBBERLEY, K. M. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. **Biological Reviews**, v. 79, n. 3, p. 557-581, 2004.

LODESANI, M; BALDUZZI, D; GALLI, A. Um estudo sobre a viabilidade dos espermatozoides ao longo do tempo em espermatecas rainhas de abelhas melíferas (*Apis mellifera ligustica*). **Revista de pesquisa apícola** , v. 43, n. 1, p. 27-28, 2004.

PEREIRA, V. A. **Potencial reprodutivo de rainhas *Apis mellifera* africanizadas (Hymenoptera: Apidae) ao descarte**. 2023. 67 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2023. Disponível em:
<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/31510> Acesso em: 01 ago. 2023.

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

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

SZABO, T. I; HEINKEL, D. T. Numbers of spermatozoa in spermatheca of queens aged 0 to 3 years reared in Beaverlodge, Alberta. **Journal of Apicultural Research**, v. 26, n. 2, p. 79-82, 1987.

TARPY, D. R; KELLER, J. J; CAREN, J. R; DELANEY, D. A. Assessing the mating 'health' of commercial honey bee queens. **Journal of economic entomology**, v. 105, n. 1, p. 20-25, 2012.

WINSTON, M. L. **The biology of the honey bee**. Harvard University Press, p. 276, 1987.

WITHROW, J. M; PETTIS, J. S; TARPY, D. R. Effects of Temperature during Package Transportation on Queen Establishment and Survival in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 3, p. 1043– 1049, 2019. .