

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

VITÓRIA ALVES PEREIRA

POTENCIAL REPRODUTIVO DE RAINHAS

***Apis mellifera* L. AFRICANIZADAS (Hymenoptera: Apidae) AO DESCARTE**

DOIS VIZINHOS

2023

VITÓRIA ALVES PEREIRA

POTENCIAL REPRODUTIVO DE RAINHAS

Apis mellifera L. AFRICANIZADAS (Hymenoptera: Apidae) AO DESCARTE

Reproductive potential of queens *Apis mellifera* L. africanized (Hymenoptera: Apidae) at culling

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestra em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Dr. Fabiana Martins Costa Maia.

Coorientadora: Dr. Flavia Regina Oliveira de Barros.

DOIS VIZINHOS

2023



Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos**



VITORIA ALVES PEREIRA

**POTENCIAL REPRODUTIVO DE RAINHAS APIS MELLIFERA AFRICANIZADAS
(HYMENOPTERA:
APIDAE) AO DESCARTE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Produção Animal.

Data de aprovação: 08 de Maio de 2023

Dra. Fabiana Martins Costa Maia, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Edgar De Souza Vismara, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Elias Nunes Martins, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Dr. Miguelangelo Ziegler Arboitte, Doutorado - Instituto Federal Catarinense

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 09/05/2023.

A Deus,
À minha mãe, Sylvia Regina Selau Alves,
Ao meu pai, Vitor Anastácio Pereira,
Ao meu irmão, Matheus Alves Pereira,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas infinitas bênçãos, por ouvir minhas preces, guiar meus passos, pela vida, saúde, estrutura familiar e por cada pessoa maravilhosa que coloca no meu caminho.

Aos meus pais, Sylvia Regina Selau Alves e Vitor Anastácio Pereira, por apoiarem incondicionalmente cada passo de minha vida, não medindo esforços, dando amor, transmitindo valores, sabedoria, educação que são meus guias enquanto ser humano.

Ao meu irmão, Matheus Alves Pereira, pelo apoio singular, incentivo, companheirismo, amor e por ficar cuidando de tudo para que eu possa trilhar os caminhos do conhecimento.

Ao meu companheiro e colega de profissão Jonatan Nunes Pires, pelo amor, cuidado, parceria, compreensão, incentivo, por aceitar o desafio da distância sem nunca falar uma palavra que me desencorajasse a seguir minhas decisões.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV), que me permitiu buscar conhecimento através de toda sua estrutura, demonstrou estar comprometida com a qualidade e excelência do ensino, em busca de tecnologia e incentivo a pesquisa.

Ao programa de pós-graduação, antigo Programa de Pós Graduação em Zootecnia (PPGZO) (no qual entrei no mestrado), e o atual Programa de Pós Graduação em Zootecnia (PPZ), principalmente a Carine Giaretta, por seu trabalho excepcional e a professora Fabiana Martins Costa, por dar o seu melhor para coordenar o programa e leva-lo a evoluir.

Somado, aos professores, técnicos, servidores, e a todos os funcionários que com seu trabalho contribuem com a formação de cada aluno, em especial ao Técnico de laboratório Thiago Cacção Villa e aos motoristas Luiz Fernando Godois Batista e Claudimir Dias Batista, que fazem mais do que seu trabalho, se transformaram em verdadeiros parceiros do projeto.

A minha orientadora Fabiana Martins Costa, inigualável, que desde o primeiro contato me acolheu, me adotou, e lutou comigo por todas as causas, sendo muitas vezes mais do que profissional, sendo amiga, e levando ao pé da letra o ser mãe

científica, sou grata pela paciência, compreensão, ensinamentos, orientações, amparo, e pelo seu amor pelas abelhas.

A minha coorientadora Flavia Regina Oliveira de Barros, pelo ensinamento transmitido, pela dedicação, carinho, e por disponibilizar além de si mesma, o seu grupo de estudos LabBarros/ Laboratório de Reprodução Animal-UTFPR, DV.

Ao grupo de estudos ΔGBee/UNEPE Apicultura-UTFPR, DV, pois sem a ajuda de cada uma não seria possível a realização desta pesquisa, os esforços, dedicação, compreensão e parceria foram fundamentais, em especial à Jéssica Carolina Camargo López, Ana Beatriz Pellizzari, Nayane Rúbio Pereira, Fernanda Raulino-Domanki, Diéli Patrícia de Souza, Letícia Marchiori, Luciana dos Santos Aires, Marciani Balbinotti França e Rúbia Santana Andrade.

Ao pessoal do LabBarros/Laboratório de Reprodução Animal-UTFPR, DV, por toda a ajuda, parceria, por vestirem a camisa e entrarem por completo no desafio da coleta de dados, em especial à Luciane Xavier Ferreira, Letícia Pinto, Ana Paula Schneiders Dani, Kelli Cristina Bacchi, ao Victor Gabriel de Faria Pastre e Yuri Kauan Zulkowski.

Ao Laboratório de Controle Biológico, especialmente à professora Michele Potrich e sua equipe, que são parceiros incondicionais.

À Associação de Apicultores de Capanema (APIC), ao Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) e à Cooperativa de Crédito Rural com Interação Solidária (CRESOL) que são parceiros ímpares desse projeto, desde sua idealização, um agradecimento particular pela confiança de oportunizar adentrar aos apiários e coletar as rainhas aqui estudadas, principalmente a cada apicultor Cleiton Lagemann, Salete R. Manchini, Jonathan Vinícius dos Santos Cavalheiro, Valdirio Gauer, Carlos Alexandre Zanatta, Getúlio Casa Nova da Costa, Sidinei Martins da Costa, Paulo Bidin, Ederson Schlindwein, Everaldo Quanz, Írio Rodrigues, Cladir Inês Debald, Domingos Mantovani, Valdemar Bauermann, Marcos Henn, Mauro da Costa, Francisco Cembrani, Altevir Marquite Castiglioni, Ismar Pagel, Jair Sidnei Damin, Elite Terezinha Vettorello Bersch, Pedro Alceu Bersch, Gustavo Henrique Dotto, e ao assistente técnico representante do SEBRAE Wagner Gazziero que esteve junto guiando os passos das coletas.

Ao professor Edgar de Souza Vismara, pela elaboração da análise estatística, parceria, incentivo, por transmitir conhecimento, e especialmente por ter se tornado o estatístico das nossas abelhas.

Ao professor e amigo Miguelangelo Ziegler Arboitte, por todo conhecimento transmitido, sua forma de amar as abelhas e sempre cativar seus alunos na busca do conhecimento, seu incentivo foi fundamental para eu seguir meu processo de formação.

Ademais, ao Instituto Federal Catarinense *Campus* Santa Rosa do Sul pelas diversas oportunidades que me deu, fornecendo minha formação de técnica e bacharel.

A Família e Amigos, que em meio a toda correria do cotidiano, estão prontos para acolher, mesmo em minha ausência, estão sempre por perto, lembrando de tudo que a de bom em viver, apoiando e dando carinho de todas as formas, em especial a Francisca, Angela, Shayani, Mariele, Marina, Raiza, Camila, madrinha Teia, vó Célia, Andressa, ao Padrinho Miguel, Jhon, Jeff, e ao tio Yzaias.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo fomento através do Programa de Apoio à Pós-Graduação Código de Financiamento 001 e por possibilitar o acesso as bases de periódicos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida, com toda certeza sem cada um que fez parte do percurso, eu não teria obtido êxito em minhas atividades,

Muito obrigada!

“Tudo que fizerem,
façam de todo o coração,
como para o Senhor”.
(COLOSSENSES, 3:23)

RESUMO

Compreender a qualidade da rainha permite conhecer informações sobre seu potencial reprodutivo e determinar os fatores que influenciam o fenótipo da colônia. Produzir rainhas de qualidade é uma demanda eminente dos apicultores, gerando um grande mercado a ser explorado. Surpreendentemente, não existem estudos que avaliem as rainhas descarte quanto ao seu potencial reprodutivo, em especial em apiários comerciais de abelhas africanizadas, o que deixou uma lacuna no conhecimento, a ser explorada. Objetivou-se por meio do presente trabalho descrever morfofisiologicamente as rainhas de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. ao descarte de modo a traçar seu potencial reprodutivo. Cento e trinta e quatro rainhas foram coletadas em apiários comerciais da Associação de Apicultores de Capanema (APIC), com o apoio técnico do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), e foram encaminhadas para a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Foram realizadas nelas mensurações externas, seguida de dissecação, avaliação da qualidade espermática e análise histológica, com posterior validação por meio de estatística e comparação com literatura. As abelhas rainhas africanizadas de apiários comerciais da região de Capanema, foram caracterizadas com média e desvio padrão de peso total ($183,32 \pm 22,66$ mg), comprimento total ($18,17 \pm 1,03$ mm), comprimento ($10,39 \pm 0,93$ mm) e largura do abdômen ($4,81 \pm 0,31$ mm), comprimento ($4,30 \pm 0,33$ mm) e largura do tórax ($3,43 \pm 0,43$ mm), comprimento ($10,43 \pm 0,67$ mm) e largura da asa ($3,60 \pm 0,30$ mm), peso de ovário direito ($30,72 \pm 10,58$ mg) e esquerdo ($30,58 \pm 10,52$ mg), número de ovários de ovário direito ($165,21 \pm 43,57$) e esquerdo ($169,58 \pm 50,05$), peso da espermateca ($0,95 \pm 0,35$ mg). Além disso, nas espermatecas, foi encontrada concentração de aproximadamente 1,8 milhão de espermatozoides, a maior parte da motilidade entre 0 e 40% e viabilidade espermática de 56,17%. Desta forma, em comparação com a literatura de rainhas jovens verificou-se que as rainhas realmente sofrem desgaste ao longo do seu ciclo de vida, com redução da concentração, viabilidade e motilidade espermática, junto com o declínio do peso total e largura do tórax 20% menor do que as jovens. A variabilidade encontrada dentro das características mostra que há espaço para realizar seleção das abelhas rainhas africanizadas. As medidas externas apresentaram correlação entre si, porém foram poucas as correlações com as medidas morfofisiológicas, mas se destaca que número de ovários apresentou correlação com comprimento total (0,22) e largura de abdômen (0,24). Para mais, foi verificado a necessidade premente da implementação das tecnologias a campo, em especial o controle zootécnico das colônias. O banco de dados coletado pode incentivar futuras pesquisas em busca da rainha com melhor potencial reprodutivo e colônias sucessivamente mais produtivas.

Palavras-chave: qualidade de rainha; senescência; medidas morfofisiológicas; melhoramento genético.

ABSTRACT

Understanding the quality of the queen allows for knowing information about her reproductive potential and determining the factors that influence the phenotype of the colony. Producing quality queens is an eminent demand of beekeepers, generating a large market. Surprisingly, studies need to evaluate culling queens regarding their reproductive potential, especially in commercial apiaries of Africanized honeybees, which leaves a knowledge gap. This work aimed to describe morphophysiological the queens of Africanized honeybees (*Apis mellifera* L.) at culling to trace their reproductive potential. One hundred and thirty-four queens were collected in commercial apiaries of the Associação de Apicultores de Capanema (APIC), with the technical support of the Brazilian Support Service for Micro and Small Companies (SEBRAE). The queens were to the Federal Technological University of Paraná, Dois Vizinhos Campus (UTFPR-DV). External measurements were performed on them, followed by dissection, evaluation of sperm quality, and histological analysis, with subsequent validation through statistics and comparison with literature. Africanized queen bees, from commercial apiaries in the Capanema region, were characterized with mean and standard deviation of total weight ($183.32\text{mg} \pm 22.66$), full length ($18.17\text{mm} \pm 1.03$), length ($10.39 \text{ mm} \pm 0.93$), and abdomen width ($4.81\text{mm} \pm 0.31$), length ($4.30\text{mm} \pm 0.33$) and thorax width ($3.43 \text{ mm} \pm 0.43$), length ($10.43 \text{ mm} \pm 0.67$) and wing width ($3.60\text{mm} \pm 0.30$), weight of the right ($30.72 \text{ mg} \pm 10.58$) and ovary left ($30.58 \text{ mg} \pm 10.52$), the number of ovarioles in the right ovary (165.21 ± 43.57), and the left (169.58 ± 50.05), spermatheca weight ($0.95\text{mg} \pm 0.35$). Furthermore, in the spermathecae, was found concentration of approximately 1.8 million spermatozoa, most motility was grouped in values between 0 and 40%, and sperm viability was 56.17%. Thus, in comparison with the literature of young queens it was found that the queens actually suffer wear and tear throughout their life cycle, with reduced sperm concentration, viability and motility, along with declining total weight and thorax width 20% smaller than the young. The variability found within the characteristics shows that there is room to perform selection of the Africanized queen bees. The external measures showed correlation among themselves, but there were few correlations with the morphophysiological measures, but it is noteworthy that number of ovaries showed correlation with total length (0.22) and abdomen width (0.24). Furthermore, it was verified the pressing need for the implementation of technologies in the field, especially the zootechnical control of the colonies. The database collected may encourage future research in search of the queen with better reproductive potential and successively more productive colonies.

Keywords: queen quality; senescence; morpho-physiological measurements; genetic improvement.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema gráfico das quatro etapas do projeto.....	26
Figura 2. Qualidade espermática dada por avaliação da motilidade e viabilidade dos espermatozoides presentes nas espermatecas de 111 rainhas de população coletada no sudoeste do Paraná/BR.	34
Figura 3. Histograma (%) com a distribuição de 114 rainhas de população coletada no Sudoeste do Paraná/BR de acordo com a concentração absoluta de espermatozoides nas espermatecas.....	35
Figura 4. Gráfico “ <i>Scree plot</i> ” utilizado como critério de escolha dos Componentes Principais (CP) da Análise de Componentes Principais (ACP) realizadas nas variáveis avaliadas para as rainhas da população coletada no sudoeste do Paraná/BR.	36
Figura 5. Gráfico circular da correlação entre as variáveis das dimensões 1 e 2, com formação de 3 agrupamentos/clusters: 1 variáveis em azul, 2 em amarelo e 3 em cinza.	37
Figura 6. Gráfico de qualidade de representação de cada variável em cada Componente Principal (CP) da Análise de Componentes Principais (ACP) realizadas nas variáveis avaliadas para as rainhas da população coletada no sudoeste do Paraná/BR.	38
Figura 7. Contribuição de cada variável dentro do Componente Principal 1. ...	39
Figura 8. Contribuição de cada variável na soma dos Componentes Principais 1 e 2.	40
Figura 9. Contribuição de cada variável na soma dos Componentes Principais de 1 até 6.....	41
Figura 10. Matriz de Correlação de Spearman realizada nas variáveis avaliadas para as rainhas da população coletada no sudoeste do Paraná/BR.	42
Figura 11. Análise de regressão correlacionando os pesos dos ovários direito e esquerdo (OE E OD).	43
Figura 12. Análise de regressão correlacionando os números de ovários presentes nos ovários direito e esquerdo.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados descritivos da população de rainhas coletadas no sudoeste do Paraná/BR.	32
Tabela 2. Critérios de escolha dos Componentes Principais (CP) da Análise de Componentes Principais (ACP) realizadas nas variáveis analisadas para as rainhas da população coletada no sudoeste do Paraná/BR.....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Cenário Atual da apicultura Brasileira.....	16
3.2	Demandas da Indústria	17
3.3	Estudos sobre rainhas jovens vs Rainhas ao descarte.....	19
3.4	Como é caracterizada a qualidade reprodutiva da rainha?	20
3.5	Por que estudar rainhas ao descarte?	23
3.6	Qual a relação das Rainhas ao descarte com o melhoramento genético de abelhas?.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Coleta das Rainhas	26
4.2	Preparo para receber as Rainhas.....	27
4.3	Mensuração, pesagem e dissecação das rainhas	27
4.4	Qualidade reprodutiva das rainhas.....	28
4.4.1	Ovários e Ovaríolos.....	28
4.4.2	Espermoteca	29
4.5	Análise estatística	31
5	RESULTADOS.....	32
6	DISCUSSÃO	45
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O cenário mundial da apicultura está diante de altas quedas populacionais das abelhas, inclusive do poli-híbrido africanizada *Apis mellifera* L. (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019). Apesar disso, alguns locais ainda consideram a abelha africanizada como praga (MUTINELLI, 2021), tornando a realização de estudos sobre a biodiversidade fundamental.

A produção e exportação apícola brasileira têm aumentado ao longo dos últimos anos (IBGE, 2017, 2021; ABEMEL, 2022). Mesmo assim, o Brasil ainda oferece vasto campo a ser explorado. Todavia, um dos entraves é a apicultura até então ser realizada como atividade secundária nas propriedades rurais o que resulta em baixo investimento (NUNES; HEINDRICKSON, 2019).

Com isto, apesar de diversas tecnologias terem sido desenvolvidas para o manejo da *Apis mellifera* L. africanizada, muitas ainda não são utilizadas no cotidiano, o que dificulta a aplicação de novas tecnologias. Em vista disso, há longo caminho a ser percorrido, que inclui treinamento de pessoas em todas as camadas, e engloba atividades essenciais como o controle zootécnico (BIXBY et al., 2020).

Neste contexto, insere-se a produção, comercialização e posterior seleção e melhoramento genético das rainhas e zangões. O cenário atual traz a oportunidade de desenvolver o setor apícola brasileiro, dentre as oportunidades a serem exploradas pode-se destacar a produção de rainhas de qualidade, demanda premente dos apicultores.

São frequentes os estudos voltados para a qualidade de rainhas jovens, no entanto, ficam escassas as informações quando se trata de rainhas africanizadas, especialmente em apiários comerciais. Nesse sentido, o estudo sobre o ciclo reprodutivo de rainhas africanizadas torna-se imprescindível, visto que, a produção e produtividade podem ser incrementadas via melhoria da qualidade da rainha.

A rainha possui características únicas, e seu status sanitário e reprodutivo impactam na sobrevivência, crescimento e produtividade da colônia (DODOLOGLU; GENE, 2003). A qualidade é estabelecida por diversas métricas, geralmente estimadas em rainhas jovens, tais como peso, tamanho do seu corpo, tórax, abdômen, asa, associados a órgãos internos, como os ovários, ovariolos e a espermateca (DELANEY et al., 2011), sendo estes, os principais indicadores da capacidade reprodutiva e de tempo de vida útil (AL-LAWATI; KAMP; BIENEFELD, 2009).

O tempo de vida útil de uma rainha africanizada é em média 1,5 anos (RANGEL; KELLER; TARPY, 2013), porém estudos fenotípicos e genéticos sobre essa característica são escassos. Sabe-se que o ambiente exerce impacto nesse sentido, e a busca por critérios de seleção de fácil mensuração são essenciais para a identificação de superioridade reprodutiva e adaptativa, e até mesmo se as características avaliadas são bons estimadores de tal potencial.

Melhorar a genética é tarefa árdua, exige a seleção dos melhores indivíduos, seguida da propagação, de modo a gerar ganho na população e incrementar a produtividade (KINGHORN et al., 2009). Não aprofundar o conhecimento nas populações locais pode ser prejudicial e gerar falha na reprodução das rainhas (BIXBY et al., 2020).

Portanto, avaliar rainhas de apiários comerciais ao final do ciclo produtivo contribui para o desenvolvimento do melhoramento genético das abelhas no Brasil. Em vista disso, objetivou-se caracterizar morfofisiologicamente as rainhas de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. ao descarte de modo a traçar seu potencial reprodutivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever morfofisiologicamente rainhas *Apis mellifera* L. africanizadas ao descarte de modo a traçar seu potencial reprodutivo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se as rainhas ao descarte apresentam número reduzido de ovariolos;
- Verificar a qualidade espermática das rainhas ao descarte;
- Relacionar as características morfofisiológicas às medidas morfométricas lineares externas e sua relação com a qualidade reprodutiva de rainhas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Ao longo dos últimos anos houve uma queda alarmante da população de abelhas, levando inclusive muitas culturas ao redor do mundo a serem polinizadas manualmente (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019; THEMUDO et al., 2020). É premente a realização de estudos sobre a biodiversidade, sendo evidente a necessidade de aprimorar estratégias de reprodução e ambiência, para aumentar do valor adaptativo das espécies, e conseqüentemente da produtividade.

Existem diversos estudos sobre as abelhas (*Apis mellifera* L.) das subespécies europeias, como *Apis mellifera mellifera* (abelha real, alemã, comum ou negra), *Apis mellifera ligustica* (abelha italiana) em diferentes contextos como ambiência e produção comercial (BIGIO; GRÜTER; RATNIEKS, 2012; MCAFEE et al., 2020a, 2020b). Entretanto, quando o assunto em questão são as abelhas africanizadas, poli-híbrido que é amplamente distribuído no Brasil, há carência de estudos. A redução mundial da população de abelhas e a necessidade de conhecer melhor a espécie presente no território nacional, dão base para o desenvolvimento desta pesquisa.

3.1 Cenário Atual da apicultura Brasileira

No contexto mundial, o Brasil está inserido, entre os 10 maiores exportadores de mel (ABEMEL, 2022). A produção é crescente ao longo dos últimos anos, atingindo 55.828 toneladas de mel em 2021, com valor da produção calculado em 854.416 mil reais (IBGE, 2021).

Mesmo com cenário positivo, com tendência de crescimento, o país ainda oferece muito a ser explorado, pois possui grandes extensões de matas, parques, reservas legais, floras, cultivos de interesse apícola e também em relação ao clima favorável às abelhas (IBGE, 2017, 2021; ABEMEL, 2022). Portanto, há um amplo mercado a ser trabalhado, tanto em busca de aumentar a produtividade de mel, quanto a trabalhar com mais produtos apícolas.

Contudo, um dos entraves é a apicultura ainda ser realizada como atividade secundária nas propriedades rurais, apenas para complementar a renda, resultando em baixo investimento (NUNES; HEINDRICKSON, 2019). Em vista disso, o olhar para as abelhas está se tornando mais eficiente e profissional, programas de assistência técnica aos produtores têm sido implementados. A exemplo destacam-se os projetos

de assistência técnica do SEBRAE, a Assistência Técnica e Gerencial do Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (ATeG do SENAR), e até mesmo a contratação de especialistas técnicos por apicultores profissionais.

Somado, a discussões conjuntas em eventos técnico científicos (APIMONDIA, CONBRAPI, ECAM, COSBRAPIM). Entretanto, ainda há espaço para aplicação de planos de desenvolvimento da apicultura locais e nacionais, assim como o plano de desenvolvimento da apicultura e meliponicultura catarinense (CASAMEL; CELLA; MALLMAN, 2018; NASCIMENTO et al., 2022).

Todavia, ainda há uma grande exploração extrativista da atividade apícola, ademais alguns apicultores mesmo com a disponibilidade de conhecimento técnico não aplicam as recomendações recebidas de seu instrutor (NUNES; HEINDRICKSON, 2019). O cenário encontrado na produção comercial atual, prova que o setor apícola brasileiro deve ser trabalhado de modo a engajar os envolvidos, tanto produtores quanto os instrutores, a desenvolver a atividade aplicando as tecnologias existentes para que seja possível o desenvolvimento de novas tecnologias.

No cotidiano ainda ocorrem substituições de rainhas mal sucedidas e algumas precoces, levando a perda de produtividade nas colônias, ou até mesmo condenando-a à morte. São várias as dúvidas a serem sanadas, como quem são as rainhas consideradas pobres e quais causas as levam a esta classificação. Somada a necessidade de estabelecer novas métricas de qualidade da rainha que incluam resistência à doenças e medidas imunológicas, capazes de orientar os caminhos ideais para reprodução e melhoramento (AMIRI et al., 2017).

Neste contexto insere-se a produção, comercialização e posterior seleção e melhoramento genético das rainhas e zangões. Há um longo caminho a ser percorrido que inclui treinamento de pessoas em todas as camadas, e engloba atividades como a implementação do controle zootécnico (BIXBY et al., 2020). Estudos como o aqui presente devem ser usados para embasar a implementação desta tecnologia, que tem se tornado cada dia mais iminente.

3.2 Demandas da Indústria

Uma das demandas do mercado nacional é a produção de rainhas, setor ainda considerado pequeno. A exemplo, entre os anos de 2018 e 2020 foram

comercializadas em torno de 20.000 rainhas (informação verbal)¹. Em um país com mais de 2 milhões de colônias (IBGE, 2017), estima-se que apenas 2% de rainhas sejam trocadas anualmente pelos apicultores. Dois fatores importantes devem ser considerados neste contexto: o nível tecnológico que tem muito a crescer e a baixa oferta de rainhas, especialmente das adaptadas a seus respectivos ambientes. Prova disso são as demandas dos apicultores por rainhas de qualidade reprodutiva, que possam imprimir melhorias na produtividade das colônias.

A prática de produzir rainhas de qualidade e disponibilizar aos produtores tem se mostrado de grande importância, pois atende dois dos nichos de mercado mais utilizados, a substituição das rainhas e a criação de uma nova colônia, ao inserir a rainha em uma divisão das abelhas. As rainhas são entregues de duas maneiras, virgens ou fecundadas, sendo que ambas otimizam o processo produtivo pois reduzem o intervalo entre os ovos não postos e a emergência de novas operárias (KHAN et al., 2022).

Produzir novas rainhas é muito importante para manter as colônias saudáveis, pois falhas da rainha podem levar à perda direta da colônia e podem acontecer a qualquer momento (CONTRERAS-MARTINEZ et al., 2017; KHAN et al., 2021). Portanto, este processo tem revolucionado a indústria apícola.

A exemplo das grandes indústrias de produção de rainhas no mundo como na Alemanha, Estados Unidos, Nova Zelândia (CAPA, 2019) os desafios se concentram na manutenção da diversidade genética, adaptação ambiental e qualidade das rainhas, principalmente das que passam pelo transporte terrestre e aéreo para chegar até o apicultor (BIGIO; GRÜTER; RATNIEKS, 2012; MCAFEE et al., 2020a, 2020b). A organização por parte dos apicultores para a coleta de informações fenotípicas sobre o desempenho dessas rainhas favorece a identificação nas falhas que são relacionadas à reprodução, adaptação local e status sanitário (BIXBY et al., 2020).

O poli-híbrido africanizado presente em nosso país foi pouco estudado, o que limita a comercialização de rainhas com comprovação de qualidade reprodutiva. Sendo assim, esforços para o desenvolvimento de tecnologias, meios de implementação desse material a campo e registros zootécnicos devem ser concentrados para o aumento da demanda indústria brasileira de rainhas.

1 Informação cedida por Ramon Haad, sócio proprietário da Apícola Haad Genética de rainhas e materiais apícola LTDA, em 23 de nov. de 2020.

3.3 Estudos sobre rainhas jovens vs Rainhas ao descarte

Os estudos voltados a conhecer morfofisiologicamente as rainhas jovens foram iniciados por Eckert (1934). A busca por essas avaliações é importante pois simplifica a investigação da fecundidade das rainhas e traz praticidade para as mensurações a campo. Esse autor, avaliou rainhas baseando-se na observação do desenvolvimento das colônias, porém sabe-se que mais parâmetros podem indicar o potencial reprodutivo (BOCH; JAMIESON, 1960; AL-LAWATI; KAMP; BIENEFELD, 2009; DELANEY et al., 2011; AMIRI et al., 2017).

Eckert (1934, 1937) previu características importantes para a mensuração da qualidade de rainhas e a correlação entre elas, que até hoje são utilizadas como: número de ovariolos, idade da larva à transferência, área de cria, morfologia externa, e a relação negativa entre fecundidade e características morfométricas. Hoopingarner e Farrar (1959) seguiram os estudos nessa linha e encontraram relação entre peso da rainha e número de ovariolos. Boch, Jamieson (1960) verificando as pesquisas até então, complementaram que o peso da rainha tem relação com a área de crias no favo.

Questões reprodutivas também remetem ao estudo da regulação hormonal e em função disso, Seehuus et al. (2006) e Kocher et al. (2008) caracterizaram que a produção da glicolipoproteína vitelogenina (Vg), a gema precursora da produção de ovos, é estimulada pelo acasalamento, tornando-se indicadora de fecundidade; somado ao fato de estar ligada à longevidade da rainha por ser um antioxidante. Além disso, Delaney et al. (2011) observaram que o peso da rainha se correlaciona positivamente com a expressão de Vg e, conseqüentemente as rainhas poedeiras tiveram maior expressão de Vg. Conforme os mesmos autores, ocorre relação positiva entre largura de tórax e quantidade de espermatozoides armazenados na espermateca.

As medidas morfométricas têm importância evidente no desenvolvimento desses estudos, pois evita a morte das rainhas a serem avaliadas, o que permite o monitoramento a campo do desempenho reprodutivo. Os estudos até então citados ainda são base para os atuais e definiram o que se sabe sobre avaliação reprodutiva de rainhas jovens (DELANEY et al., 2011; AMIRI et al., 2017).

Dessa forma, é consenso que rainhas jovens possuem alto potencial reprodutivo, gerando colônias com grande crescimento, boa área de cria, que evolui

para operárias e zangões saudáveis que facilitam o cuidado da colônia, prevenindo enfermidades, além disso também são capazes de armazenar maior quantidade de mel e pólen, e mitigar efeitos de doenças (AMIRI et al., 2017).

Há grande gama de estudos sobre rainhas jovens (ECKERT, 1934, 1937; BOCH; JAMIESON, 1960; DELANEY et al., 2011; AMIRI et al., 2017), ou seja, rainhas virgens e recém-fecundadas, em contrapartida há poucos estudos sobre as rainhas consideradas velhas (HARBO, 1979; SZABO; HEIKEL, 1987; LODESANI; BALDUZZI; GALLI, 2004) mas nenhum em uma população comercial ao descarte. Isso deve-se ao fato da crença que o sucesso reprodutivo está ligado à jovialidade da rainha.

3.4 Como é caracterizada a qualidade reprodutiva da rainha?

Rainhas de alta qualidade apresentam algumas características em comum, como a alta produção de cria, manutenção da coesão da colônia, bom comportamento higiênico, baixa tendência à enxameação, resistência às doenças e alta produção. Estes fatores dependem da origem genética da rainha e dos zangões com que ela acasala.

O potencial da rainha em manter sua colônia, desenvolvê-la e gerar produtividade, atrelado à sua capacidade de reproduzir em quantidade, determina a sua qualidade (DODOLOGLU; GENE, 2003). São diversos os critérios e métricas que estabelecem uma rainha de qualidade, dentre eles a morfometria externa, a avaliação de seus órgãos reprodutores como os ovários e a espermateca, junto com a qualidade espermática.

As medidas morfométricas externas tem sido mensuradas nas rainhas ao longo dos anos, em busca de definir quais são as métricas de rainhas de qualidade, de forma a permitir definir os parâmetros ideais das rainhas. Em especial, relacionar essas medidas a fisiologia de modo a não precisar sacrificar as rainhas para realizar mensurações, as mais instintivas são as medidas morfológicas padrão de insetos adultos, como peso, comprimento total, comprimento e largura do abdômen, tórax e asa (TARPY et al., 2012; RANGEL; TARPY, 2013; SOUZA et al., 2013; METORIMA et al., 2015).

Ovários e espermateca bem desenvolvidos não garantem sucesso reprodutivo, pois ainda assim a quantidade de espermatozoides armazenados pode ser baixa (SOUZA et al., 2013), resultando em troca precoce da rainha. O sistema de

acasalamento das abelhas é ímpar na natureza (ROUSSEAU; FOURNIER; GIOVENAZZO, 2015) e as *Apis mellifera* L. são altamente poliândricas (GENÇER; KAHYA; WOYKE, 2014; ROUSSEAU; FOURNIER; GIOVENAZZO, 2015).

Com o avançar da tecnologia genética de detecção dos genitores das operárias, as estimativas de acasalamento por rainha tem crescido constantemente (WITHROW; TARPY, 2018). As estimativas vão de 6 até 77 zangões (GENÇER; KAHYA, 2011; COBEY; TARPY; WOYKE, 2013; COBEY, 2016; WITHROW; TARPY, 2018; GILLARD, 2020; KHAN et al., 2022).

Após o acasalamento, que pode ser feito com 1 a 3 voos nupciais (SCHLÜNS et al., 2005), os espermatozoides migram ao longo das próximas 24-48h, do oviduto, onde foi depositado, para a espermateca (WINSTON, 1987). A rainha retorna a colônia em média com 10-20 μ L de sêmen (em torno de 100 milhões de espermatozoides), alojados em seus ovidutos, porém a grande maioria do sêmen é descartado, ficando apenas de 3 a 5% de cada zangão, sendo estimado que uma rainha deve armazenar no mínimo 3 milhões de espermatozoides para ter qualidade reprodutiva (WOYKE, 1962).

Embora as rainhas expulsem 85% a 95% do sêmen depositado no oviduto (MACKENSEN, 1964), elas conseguem ficar com uma parte de cada zangão com qual acasalou. Os espermatozoides misturam-se durante a migração para a espermateca (HABERL; TAUTZ, 1998). Em média as rainhas jovens contêm de 4 a 7 milhões de espermatozoides (KOENIGER; KOENIGER, 2000; BOER; BOOMSMA; BAER, 2009; ROUSSEAU; FOURNIER; GIOVENAZZO, 2015).

Os espermatozoides são alojados na espermateca, por todo período de vida da rainha, não havendo reposição espermática (WINSTON, 1987). Após a rainha realizar a primeira cópula, ela tem pouco tempo até iniciar a oviposição, devido aos agentes químicos presentes no fluido seminal e glândulas acessórias dos zangões que ativam o sistema reprodutivo da rainha, levando-a a ter que concluir seu processo de acasalamento rapidamente, o que pode levar a mesma a possuir baixa concentração de espermatozoides (RHODES, 2008).

Após todo o processo de acasalamento, os ovários ficam ativos, a rainha passa a ovipositar cerca de 1.500 ovos por dia (SNODGRASS, 1956; CRUZ-LANDIM, 2009; KOCHER; TARPY; GROZINGER, 2010). Cada ovo recebe aproximadamente 2 a 20 espermatozoides (HARBO, 1979; BAER et al., 2016; GILLARD; OLDROYD,

2020). A rainha é considerada reprodutivamente exausta quando seu estoque de espermatozoides viáveis se esgota.

A rainha produz e fornece secreções que mantem os espermatozoides viáveis ao longo do tempo (BOER; BOOMSMA; BAER, 2009). Com o envelhecimento da rainha se observa maior mortalidade espermática, inclusive com células apresentando movimentos com padrões mais lentos (LODESANI; BALDUZZI; GALLI, 2004; ALLAWATI; KAMP; BIENEFELD, 2009).

Apesar da qualidade espermática ser de suma importância para a qualidade da rainha, outras medidas também se destacam. O peso é uma medida comumente utilizada, relacionado a outras, como o peso dos ovários, a quantidade de ovaríolos, o peso da espermoteca, devido à lógica de quanto mais pesada, maior será o espaço para desenvolvimento dos órgãos reprodutores, conseqüentemente apresentando melhor desempenho (BOCH; JAMIESON, 1960; DELANEY et al., 2011; SOUZA et al., 2013; AMIRI et al., 2017). Por sua vez, rainhas mais pesadas possuem espermoteca maior (SOUZA et al., 2013), o que lhes garante alta capacidade de armazenamento de sêmen. Isso reflete no favorecimento da diversidade genética, incrementando a robustez da colônia (OLDROYD; FEWELL, 2007; MATTILA; BURKE; SEELEY, 2008).

Peso e tamanho da rainha estão ligados à quantidade de ovaríolos e as fases de desenvolvimento dos ovos (SHEHATA; TOWNSEND; SHUEL, 1981). Os ovários são compostos por ovaríolos, podem também ser chamados de túbulos de ovos, os quais são responsáveis por maturarem os ovócitos até eles completarem o ciclo e serem ovipositados (CRUZ-LANDIM, 2009; KOZII et al., 2021).

Doenças também influenciam a qualidade reprodutiva das rainhas, como por exemplo *Nosema* spp. (DELANEY et al., 2011; AMIRI et al., 2017). Uma associação de fatores como a sanidade, questões nutricionais, manejo equivocado de agrotóxicos, e outros, são importantes no desempenho ao longo da vida das rainhas. De maneira geral, o ambiente tem influência na qualidade reprodutiva da rainha, o que nos leva a buscar padrões que possam ser quantificados e estudados para que critérios de seleção possam ser estabelecidos de maneira a identificar de fato superioridade reprodutiva.

3.5 Por que estudar rainhas ao descarte?

O cenário mundial da apicultura atual está diante de altas quedas populacionais das abelhas. Muitas suspeitas foram levantadas sobre os motivos das perdas anuais de colônias. No estudo de vanEngelsdorp et al. (2008) é retratado 13,3% das colônias de abelhas manejadas nos EUA, eles constataram que embora as principais suspeitas fossem de fome, do ácaro varroa e distúrbio do colapso das colônias (CCD) (28%, 24% e 9%, respectivamente), o principal problema relatado pelos apicultores foram as “rainhas pobres” (31%). “Rainhas pobres” podem ser uma das principais razões para o fracasso da colônia, e uma das principais causas podem ser os “zangões pobres” (METZ; TARPY, 2019).

Diante disto, estudar a saúde e fecundidade das rainhas, deve ser o foco das pesquisas e da indústria, em particular para a realidade nacional. Designar os motivos que geram rainhas de baixa qualidade é fundamental para melhorar a produtividade das colônias. De qualquer forma, uma reprodução eficiente também é fundamental para repor as colônias mortas. Assim sendo, analisar as rainhas ao descarte contribuirá de forma importante nesse cenário.

O descarte de rainhas se deve ao fato de a mesma não responder mais aos requisitos de reprodução e produtividade da colônia. Ocorre conforme os critérios estabelecidos pelo apicultor, como por exemplo, quando o mesmo realiza resgate de colônias, não sabendo o histórico da rainha, optando pela substituição da mesma.

A idade pode refletir no baixo desempenho da rainha, uma vez que sua vida reprodutiva está em grande parte limitada pelo estoque de espermatozoides em sua espermateca. As rainhas são substituídas pelas operárias quando começam a ovipositar ovos não fecundados, gerando crias de zangão (SOUZA et al., 2013). A rainha africanizada vive em média 1,5 anos em plena oviposição, e depois disso o desempenho reprodutivo geralmente diminui (RANGEL; KELLER; TARPY, 2013).

Como abordado no item 4.2, são inúmeros os estudos sobre rainhas virgens e recém-fecundadas, pois acredita-se que o sucesso reprodutivo esteja ligado a rainhas jovens. Mas mesmo com tantos estudos, existem lacunas no conhecimento que não afirmam qual é o padrão exato de rainhas de alto potencial reprodutivo, faltando o estudo de rainhas ao descarte para completar o ciclo.

Rainhas de descarte, até então não foram estudadas em estoques comerciais no Brasil. Os estudos na fase de descarte de rainhas fecundadas poderão esclarecer

as relações entre características físicas, morfológicas de órgãos reprodutivos e de qualidade espermática a fim de conhecer o potencial das rainhas.

Estudos sobre o ciclo reprodutivo completo de rainhas, inclusive à senescência, trarão um melhor entendimento sobre a redução do potencial reprodutivo, e se as próprias características avaliadas são bons estimadores de tal potencial. A correlação dos dados deve trazer respostas diretas ao mercado em busca de rainhas com maior potencial reprodutivo, sucessivamente colônias mais produtivas.

3.6 Qual a relação das Rainhas ao descarte com o melhoramento genético de abelhas?

Como visto anteriormente, um dos principais problemas enfrentado na apicultura atualmente é o declínio das populações de abelhas, inclusive do poli-híbrido africanizada *Apis mellifera* L. (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019). Mesmo assim, alguns locais ainda consideram o poli-híbrido como praga, tornando a realização de estudos sobre a biodiversidade crucial, a fim de ampliar os valores adaptativos da espécie (MUTINELLI, 2021). Ainda são escassos os estudos sobre o potencial reprodutivo de rainhas africanizadas, que tem distribuição ampla por todo o Brasil. Tendo isso em vista, produzir rainhas é uma das ferramentas para desenvolver o melhoramento genético.

O melhoramento genético não é tarefa simples, exige a seleção dos melhores indivíduos, seguindo com a propagação genética deles, de modo a gerar ganho na população e incremento da produtividade (KINGHORN et al., 2009). Colônias com alta diversidade genética se destacam em relação as com baixa variabilidade, pois são capazes de apanharem maiores áreas de fonte de recursos, o que gera forrageamento mais desenvolvido, e aumenta a adaptação ao ambiente (MATTILA; BURKE; SEELEY, 2008).

No exterior, países como Canadá detêm alto conhecimento sobre o comércio de rainhas, principalmente por comprar muitas rainhas de outros países, verificando quão prejudicial pode ser não aprofundar conhecimentos sobre as genéticas locais, verificando falhas na reprodução das rainhas, causada por diversos fatores (BIXBY et al., 2020). As experiências vividas em diversos locais no mundo, nas regiões brasileiras e suas subdivisões, vêm gerando vasto conhecimento a ser utilizado para promover a apicultura mundialmente. No mercado nacional somos limitados a poucos

estudos sobre o aspecto genético da abelha *Apis mellifera* L. africanizada, represando o desenvolvimento comercial e tecnológico, mas por outro lado é uma oportunidade de desenvolver o mercado interno.

Perfaz-se uma grande dificuldade em realizar melhoramento genético em abelhas *Apis mellifera* L., pois é complexo isolar populações de abelhas para realizar estudos. Assim como produzir e isolar populações de indivíduos machos nas colônias, por isso comumente as rainhas são o foco das pesquisas, sendo elas as responsáveis por reproduzirem, gerando novos indivíduos, e impactando diretamente a sobrevivência, crescimento e conseqüentemente a produção (SOUZA et al., 2013).

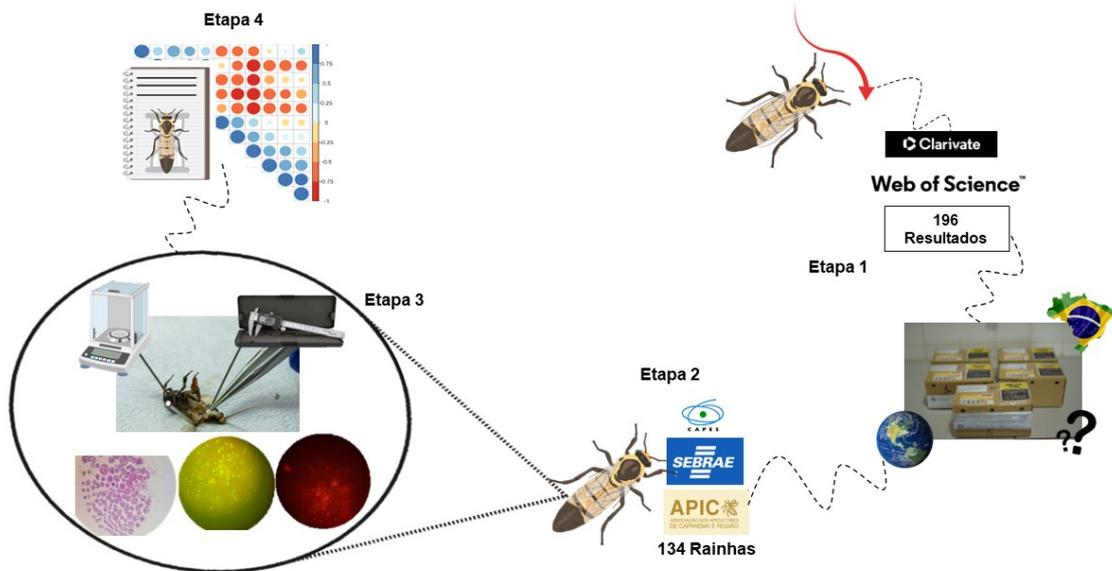
As rainhas de descarte podem ser fonte de material genético adaptado a diversas características produtivas, como foco em produção de própolis, pólen e apitoxina. Grande parte das colônias brasileiras são destinadas a produção de mel, poucas colônias são destinadas especificamente para outro objetivo, o que leva muitas rainhas a serem substituídas como improdutivas. Ao se descartar uma rainha, está sendo descartado todo seu material genético, sem ao menos verificar seu potencial.

Avaliar rainhas de apiários comerciais ao final do ciclo produtivo, caracteriza este status reprodutivo até então não descrito. As análises realizadas são capazes de contribuir com o estabelecimento de métricas de qualidade para estudos futuros, que podem incluir preocupações com resistência a doenças, medidas imunológicas, entre outras. Por estes motivos, a descrição da população de rainhas ao descarte contribui com o desenvolvimento do melhoramento genético das abelhas brasileiras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em quatro etapas (Figura 1). A primeira, a realização de uma revisão sistemática e planejamento do projeto; segunda, execução a campo; terceira, execução laboratorial; e quarta, análise estatística.

Figura 1. Esquema gráfico das quatro etapas do projeto



Fonte: Autoria própria (2023)

O projeto foi conduzido do campo, apiários dos produtores da Associação de Apicultores de Capanema (APIC), para o laboratório da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão Apicultura (UNEPE), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Dois Vizinhos (UTFPR-DV), Paraná, Brasil (Figura 1). Após a coleta inicial, realizada entre agosto e setembro de 2022, as demais análises foram executadas nos laboratórios de Controle Biológico (LABCON), multiusuários II e o Laboratório de Reprodução Animal, Microscopia e Materiais (LAMMAN) de setembro a dezembro de 2022.

4.1 Coleta das Rainhas

Rainhas de apiários comerciais, da região Sudoeste do estado do Paraná, Brasil, consideradas em final de ciclo de vida, ou seja, aptas a serem substituídas nas suas colônias de origem, foram avaliadas. Junto à assistência técnica prestada por meio do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), do Paraná, foram definidas e coletadas 134 rainhas fecundadas ao descarte. As rainhas

foram alojadas em gaiolas tipo JZsBZs[®], contendo alimento candy (açúcar+mel) na sua extremidade e identificadas de um a 134. Todos os cuidados necessários para manter o bem estar das rainhas durante o transporte do campo ao laboratório foram prestados, incluindo sete operárias acompanhantes na gaiola, fornecimento de água limpa e fresca a cada quatro horas, além de cuidados como evitar movimentos bruscos, contato com outros insetos, e variações consideráveis de temperatura. Mesmo sob todos os cuidados, 17 das 134 rainhas morreram, portanto não foram consideradas para esse estudo.

4.2 Preparo para receber as Rainhas

Para a realização dos procedimentos, antes da chegada das rainhas foram tomados diversos cuidados no preparo dos ambientes e materiais de trabalho. Placas de Petri de poliestireno foram utilizadas como molde para fabricar placas de cera de abelha (DADE, 1994), usadas para fixar a rainha na dissecação.

Além disso todos os ambientes utilizados na coleta de dados foram limpos e desinfetados com soluções à base de cloro e álcool 70%, sendo o álcool reaplicado imediatamente antes de iniciar a coleta de dados. Tapetes sanitizantes de vinil preto 0,70x1,00m foram embebidos em cloro e alocados na entrada de cada setor do laboratório. Os materiais que entraram em contato com a rainha foram autoclavados, exceto os objetos cortantes como a tesoura, os quais foram flambados após cada rainha dissecada, assim como a cada rainha eram trocadas as luvas. Todos esses procedimentos foram adotados como meio de evitar ao máximo qualquer tipo de contaminação das amostras.

4.3 Mensuração, pesagem e dissecação das rainhas

À chegada, as rainhas foram avaliadas quanto ao comprimento corporal total, de tórax, abdome e asa, e suas respectivas larguras (mm), e em seguida foram pesadas (mg). Para recolher as mensurações foi utilizado paquímetro digital Resolução pol./mm: 0,0005/0,01 (MTX, Moscou, Rússia). Em seguida, as rainhas, ainda vivas, foram colocadas em frascos de vidro de 20 mL previamente tarados, para a pesagem na balança de precisão (SHIMADZU/ ATX224, Filipinas) de 0,001g.

Logo após às mensurações externas, foi realizado o processo de dissecação, no qual não foi utilizado nenhum processo de narcotização, para não afetar o resultado

da qualidade espermática. A primeira parte removida foi a cabeça, que foi alocada em microtubo de 1,5 mL contendo TRizol (Invitrogen, Massachussets, EUA) para realização futura de análises moleculares. O próximo passo foi a fixação do tórax e abdômen com alfinetes na placa de cera de abelha, em seguida foi realizada a incisão lateral para remoção da cutícula do exoesqueleto ventral, com o auxílio de uma pinça (tipo relojoeiro 12 cm reta), tesoura Cirúrgica Oftálmica Capsulotomia Curva (Vannas IM-283AA, Kazan, Rússia) e do Microscópio Estereoscópio Binocular Zoom (QUIMIS Q714Z-1, Piracicaba, São Paulo-Brasil). Após a remoção da cutícula foram pingadas duas gotas de *diethyl pyrocarbonate* (DEPC), para inativar enzimas de RNase. A remoção da cutícula do exoesqueleto possibilitou o acesso às partes internas da rainha, com isso foram removidos os ovários, a espermateca, intestino, corpo gorduroso e tórax, dos quais os três últimos itens foram conservados para futuras pesquisas.

4.4 Qualidade reprodutiva das rainhas

Após a dissecação, foram realizadas as análises para mensurar a qualidade reprodutiva das rainhas, abrangendo peso de ovários, avaliação do número de ovariolos e da qualidade espermática. As rainhas que morreram (17) antes da chegada ao laboratório e aquelas que tiveram algum órgão danificado durante o processo foram removidas das avaliações (Vide Tabela 1).

4.4.1 Ovários e Ovariolos

O número de ovariolos foi obtido por meio da metodologia de Raulino-Domanski et al. (2019) que consiste na remoção dos ovários direito e esquerdo, pesagem (mg) dos mesmos e preparação histológica para contagem dos ovariolos. Os ovários foram imersos imediatamente em fixador Bouin (150 mL de etanol a 80%, pureza $\geq 99,3\%$; 60 mL de formaldeído 40%, pureza $\geq 40\%$; 15 mL de ácido acético glacial, pureza $\geq 99,7\%$; e 1 g de solução saturada de ácido pícrico; pureza $\geq 98\%$), em temperatura ambiente por 1 hora. Logo após, foram imersos em etanol 70% por 15 min, e o processo repetido três vezes. A próxima etapa foi a desidratação, após a infiltração, os ovários foram colocados em moldes de base (diâmetro e altura de 1,5 cm) e incluídos em Paraplast. Para facilitar o corte do tecido, os ovários foram cuidadosamente orientados nos moldes de base usando uma pinça aquecida

(JACKSON; TARPY; FAHRBACH, 2011). Em seguida, os cortes histológicos foram realizados na zona média usando um micrótomo semiautomático (SLEE medical GmbH CUT6062) em 7 μm de espessura e distendidos em lâmina histológica gelatinizada (KIERNAN, 1999) onde secaram à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) por no mínimo 1 hora. Secas, as lâminas foram coloridas com hematoxilina e eosina e novamente deixadas secar. A próxima etapa foi montar as lâminas com lamínula e Bálsamo do Canadá (sintético), mais uma vez secas a temperatura ambiente.

Com isso, foi possível realizar a fotografia que permitiu a contagem dos ovários. Os cortes foram fotografados em câmera digital acoplada a microscópio de luz binocular (Carl Zeiss Microscopy PrimoStar com câmera Axiocam 105 color / Jena, Alemanha) e os ovários contados por meio das fotos visualizadas no software Zen Lite 3.4 Blue Edition (2021).

4.4.2 Espermateca

A avaliação da espermateca foi iniciada pelo seu peso, em seguida a mesma foi transferida para microtubos contendo 250 μL de solução de Ringer (KAFTANOGLU; PENG, 1984) a 36°C . Após ruptura da parede epitelial da espermateca utilizando uma tesoura Castroviejo curva em estereomicroscópio, a espermateca foi lavada em solução de Ringer a 36°C para coleta dos espermatozoides e o volume final da solução de sêmen ajustado para 1 mL na mesma solução, em seguida, gentilmente misturado por inversão do microtubos.

Para aferir a concentração espermática foi utilizado o protocolo adaptado baseado do descrito (ROUSSEAU; FOURNIER; GIOVENAZZO, 2015). Brevemente, a concentração de espermatozoides foi verificada em câmara hematimétrica de Neubauer. As células espermáticas foram contadas em 5 quadrados ($0.1\text{ mm}^3 = 0.1\ \mu\text{L}$, cada), presentes nos quatro cantos e no centro do hemocitômetro, sendo a contagem repetida duas vezes em microscópio óptico de luz, utilizando aumento de 400x. Para o cálculo do total de espermatozoides foi utilizada a fórmula abaixo, a qual leva em consideração a média das duas contagens de espermatozoides por mL, multiplicada por 5 para representar uma área de 1 mm^2 , por 2 que representa o fator de diluição, por 10 para ajustar a altura para 1mm e finalmente por 1.000 para transformar mm^3 em mL:

$$\text{Espematozoides/mL} = \frac{[(\text{Contagem } 1 * 5 * 2 * 10 * 1000) + (\text{Contagem } 2 * 5 * 2 * 10 * 1000)]}{2}$$

A seguir, foi realizada a análise de motilidade espermática, conforme o método de Kaftanoglu e Peng (1984). Para observar o vigor dos espermatozoides, 30µL da solução foram adicionados a uma lâmina pré-aquecida e cobertos com lamínula também pré-aquecida, estes foram observados em microscópio óptico no aumento de 400x e classificados entre os escores 0 (zero) até 5. A classificação abrange motilidade de 0 (zero) a 95%, dentro dos níveis: 5 - quando 80 a 95% dos espermatozoides são móveis, com padrão de natação progressivo e ondulação vigorosa; 4 - motilidade entre 60 e 80%, com espermatozoides nadantes, com pouco redemoinho e menos vigorosos do que na pontuação 5; 3 – entre 40 e 60% dos espermatozoides móveis, entretanto com perda de movimento progressivo; 2 – entre 20 e 40% dos espermatozoides móveis, sem movimento progressivo; 1 – entre 0 (zero) e 20% dos espermatozoides móveis, e 0 (zero) não se observou qualquer motilidade.

Como a motilidade é a única característica não quantitativa (KAFTANOGLU; PENG, 1984), com o objetivo de melhorar a compreensão dos intervalos acima apresentados, as classes de 0 (zero) até 5 foram transformadas em valores percentuais de 0 (zero) até 95%, mantendo a escala original dos valores (0= 0%; 1= 20%, 2= 40%, 3= 60%; 4= 80%; 5= 95%).

Para a análise de viabilidade espermática as amostras foram transportadas ao Laboratório de Reprodução Animal da UTFPR-DV, e o método de coloração fluorescente dupla segundo o protocolo descrito por Wegener et al (2012) foi utilizado: 4µL de 1mg/mL de iodeto de propídeo (Invitrogen) em Ringer e 2µL de 0,5mg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen H1399) em Ringer foram adicionados a 100µL da suspensão de espermatozoides em solução Ringer a 36 °C e levemente misturadas. Após incubação a 36°C no escuro por 20 minutos, uma amostra homogênea de 10µL foi colocada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de fluorescência em um aumento de 400x.

Para visualização do total de células, a marcação com Hoechst 33342 foi visualizada com excitação de 350nm e emissão de 461nm, que resulta em coloração verde e marca todos os espermatozoides da amostra, enquanto células mortas foram marcadas com iodeto de propídeo e verificadas com uma excitação 488 nm de emissão de 617nm, que gera coloração vermelha, marcando apenas os mortos. Para

o cálculo da porcentagem de células mortas foram contadas 150 células por amostra, subtraindo as mortas do total para obter o valor de cada uma.

4.5 Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilha Excel® e rodados estatisticamente com o auxílio do programa R studio 4.2.1 (2022), a fim de gerar análise descritiva dos dados, que inclui média, desvio padrão, erro padrão, mediana, valor mínimo e máximo, e a variação entre mínimo e máximo.

A descrição e comparação morfofisiológica sobre o número de ovários e qualidade espermática foram baseadas em fontes de literatura publicadas anteriormente. Neste trabalho não há grupos para comparação entre eles, por isso a estatística é descritiva e inferencial.

De maneira a complementar e buscar as melhores características a serem avaliadas em populações de abelhas rainhas africanizadas *Apis mellifera* L. foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP) ou Principal Component Analysis (PCA). Para determinar os autovalores e a proporção da variância (informação) obtida pelo Componente Principal (CP) foram usadas as funções `get_eigenvalue()` [pacote `factoextra`].

Para seguir o estudo das relações entre as características, foi realizado correlação de Spearman, apenas motilidade foi excluída por ser uma variável qualitativa. Os coeficientes obtidos foram testados quanto ao nível de 5% de significância, os valores de correlação variam de -1 a 0 para correlações negativas (vermelho) e de 0,1 a 1 para correlações positivas (azul).

Ademais, foi realizada análise de regressão para verificar o aspecto de simetria entre os ovários esquerdo e direito, utilizando modelo linear simples ajustado por métodos de regressão correlacionando os pesos dos ovários. O modelo ajustado tem a seguinte forma:

$$y_i = a + bx_i + \epsilon_i$$

No qual y e x se referem aos pesos dos ovários direito e esquerdo, respectivamente, a e b são os coeficientes do modelo, ϵ é o erro aleatório, e o índice i identifica as rainhas. A simetria perfeita gerou uma equação linear onde $a = 0$ e $b = 1$ e foi usada como referência de simetria para o modelo ajustado.

5 RESULTADOS

Os resultados descritivos a seguir caracterizam a população de rainhas coletadas (Tabela 1), demonstrando a variação existente dentro de cada característica avaliada.

Tabela 1. Resultados descritivos da população de rainhas coletadas no sudoeste do Paraná/BR.

Variáveis	Média	Erro Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Intervalo entre min-máx
Peso (mg)	183,31 ± 22,6 (n=117)	2,09	183,60	129,80	236,70	106,90
Comprimento Total (mm)	18,16 ± 1,02 (n=117)	0,09	18,22	15,48	20,39	4,91
Comprimento abdômen (mm)	10,39 ± 0,93 (n=117)	0,08	10,42	8,31	12,80	4,49
Largura abdômen (mm)	4,80 ± 0,30 (n=117)	0,02	4,80	3,50	5,57	2,07
Comprimento da asa (mm)	10,4 ± 0,66 (n=117)	0,06	10,37	8,95	11,97	3,02
Largura da asa (mm)	3,59 ± 0,29 (n=117)	0,02	3,57	2,97	4,64	1,67
Comprimento do Tórax (mm)	4,29 ± 0,32 (n=117)	0,03	4,31	3,36	5,11	1,75
Largura do Tórax (mm)	3,42 ± 0,43 (n=117)	0,04	3,36	2,59	5,00	2,41
Peso Espermateca (mg)	0,95 ± 0,35 (n=116)	0,03	0,90	0,40	2,00	1,60
Peso Ovário Direito (mg)	30,72 ± 10,58 (n=117)	0,97	28,80	3,70	64,40	60,70
Peso Ovário Esquerdo (mg)	30,58 ± 10,52 (n=117)	0,97	29,10	4,80	64,80	60,00
Número de ovariolos direito (un)	165,21 ± 43,57 (n=113)	4,09	159,00	85,00	280,00	195,00
Número de ovariolos esquerdo (un)	169,58 ± 50,05 (n=112)	4,72	164,00	67,00	366,00	299,00
Concentração (x10 ⁶)	1,79 ± 0,9 (n=114)	0,08	2,00	0,30	4,80	4,50
Viabilidade (%)	56,17 ± 24,67 (n=111)	2,34	60,00	1,33	96,00	94,66

Fonte: Autoria própria (2023)

As mensurações lineares externas apresentaram valores médios e desvios padrão para peso total (183,32 ± 22,66 mg), comprimento total (18,17 ± 1,03 mm), comprimento (10,39 ± 0,93 mm) e largura do abdômen (4,81 ± 0,31 mm), comprimento (4,30 ± 0,33 mm) e largura do tórax (3,43 ± 0,43 mm), comprimento (10,43 ± 0,67 mm)

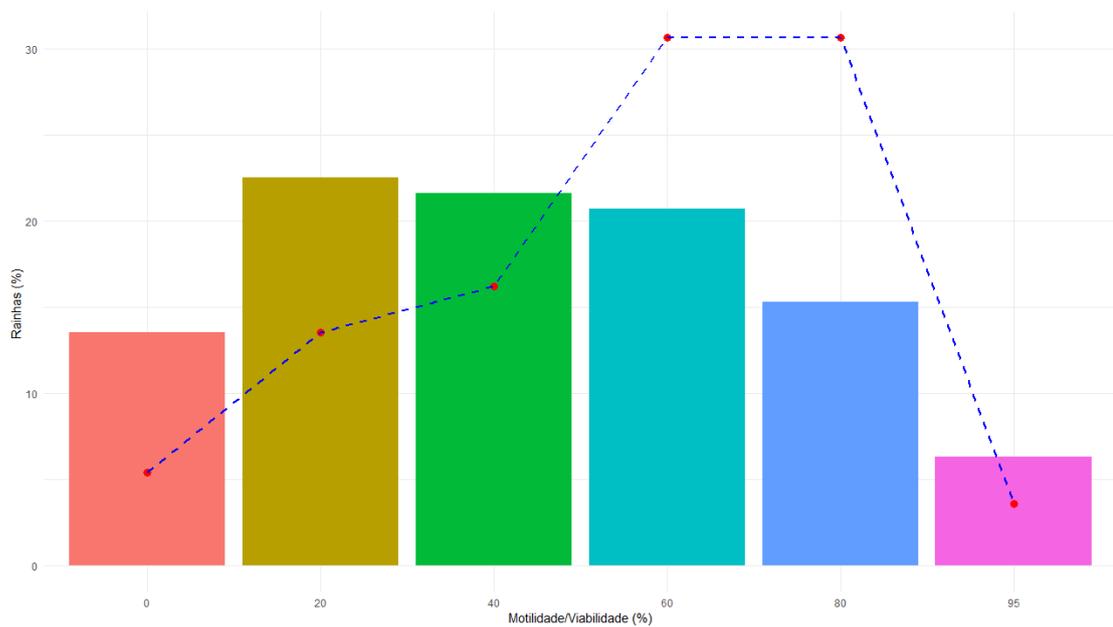
e largura da asa ($3,60 \pm 0,30$ mm), de forma a descrever rainhas africanizadas advindas de um sistema de produção de mel comercial.

Ainda para aprimorar a descrição, a Tabela 1 traz as médias e desvios padrão para as características morfofisiológicas com o peso de ovário direito ($30,72 \pm 10,58$ mg) e esquerdo ($30,58 \pm 10,52$ mg), número de ovariolos de ovário direito ($165,21 \pm 43,57$) e esquerdo ($169,58 \pm 50,05$). Da mesma forma, para a descrição da estrutura e conteúdo da espermateca se observou o peso médio ($0,95 \pm 0,35$ mg), a concentração de aproximadamente 1,8 milhão de espermatozoides ($1.793.421,05 \pm 923.501,25$), e viabilidade espermática de 56,17% ($56,17 \pm 24,67$ % vivos e $44,24 \pm 24,55$ % mortos).

De maneira a descrever o potencial dos espermatozoides quanto à capacidade de movimentação entre os ovidutos lateral e mediano para a espermateca, e vice-versa, a Figura 2 demonstra a motilidade espermática (barras). Foram coletados dados de 111 espermatecas, das quais 60% apresentaram motilidade inferior à 40%, e as demais (cerca de 40%) acima de 60%.

Para pormenorizar a variação de espermatozoides vivos dentro da espermateca de cada rainha, a Figura 2 demonstra com a linha pontilhada a viabilidade espermática. Cerca de 60% das 111 espermatecas ficaram dentro das classes de 60 e 80% de viabilidade, destas menos de 5% atingiram valores próximos de 95%.

Figura 2. Qualidade espermática dada por avaliação da motilidade e viabilidade dos espermatozoides presentes nas espermatecas de 111 rainhas de população coletada no sudoeste do Paraná/BR.

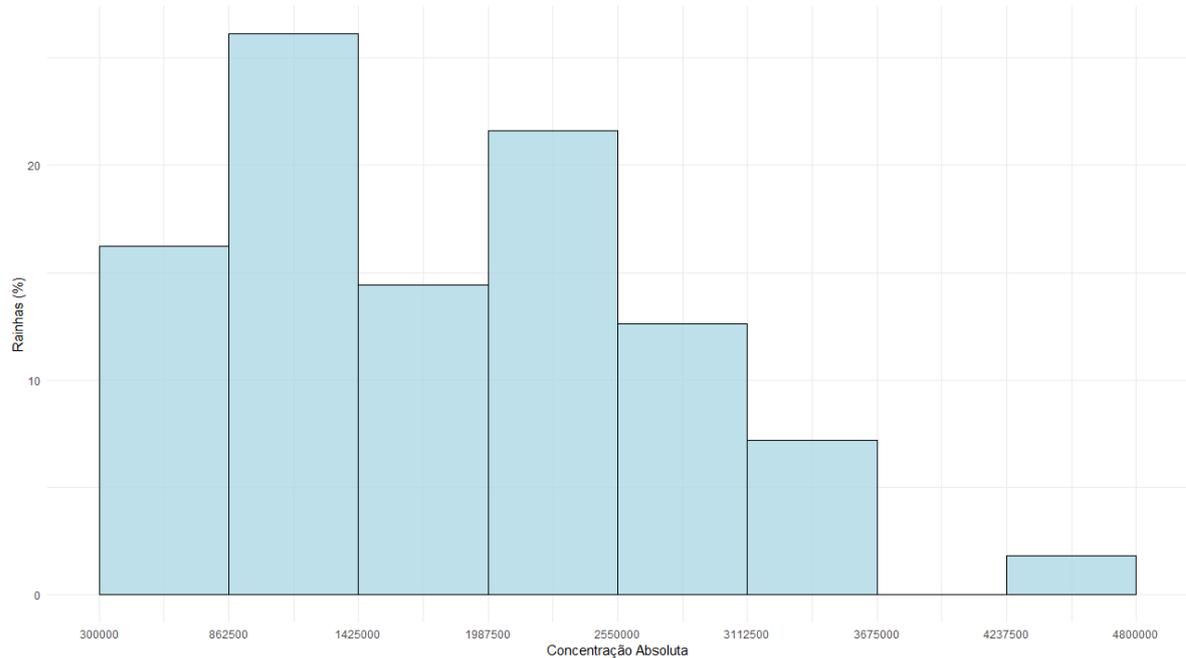


Pontos vermelhos representam o centro da classe de viabilidade espermática.

Fonte: Autoria própria (2023)

Em relação a concentração espermática, a Figura 3 mostra os números absolutos de espermatozoides nas espermatecas das rainhas analisadas. Os valores vão de 300 mil espermatozoides até 4,8 milhões, destes mais de 50% das rainhas têm valores abaixo de 1,5 milhão e menos de 10% ultrapassam os 3 milhões de espermatozoides.

Figura 3. Histograma (%) com a distribuição de 114 rainhas de população coletada no Sudoeste do Paraná/BR de acordo com a concentração absoluta de espermatozoides nas espermatecas.



Fonte: Autoria própria (2023)

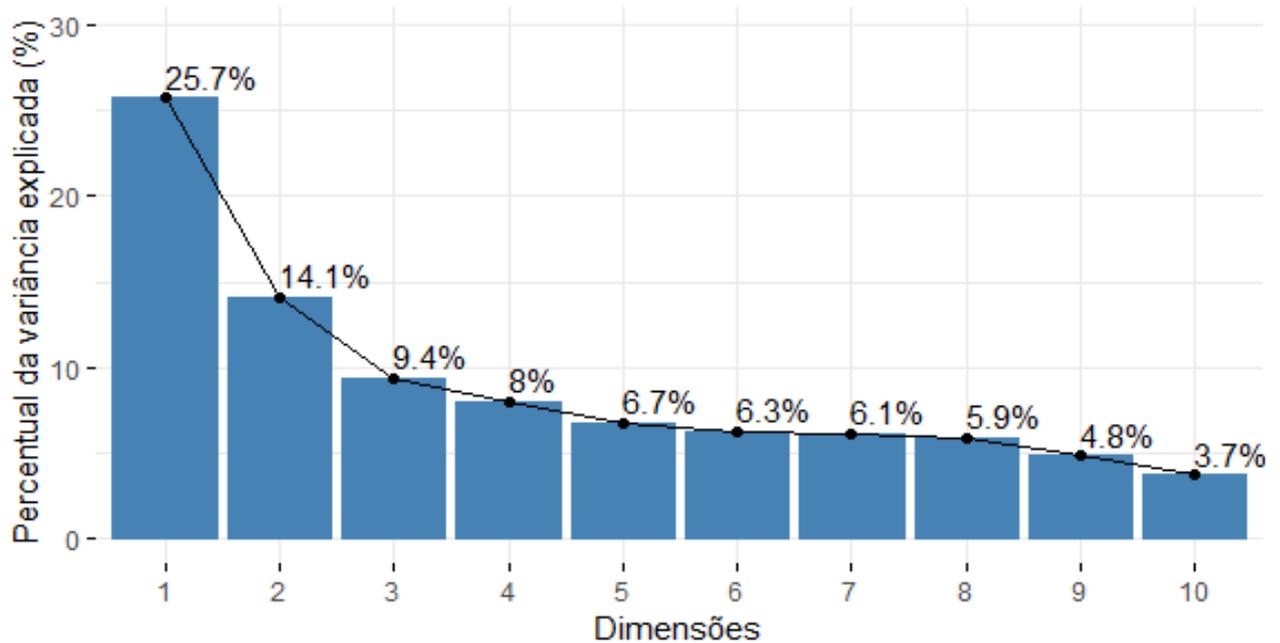
De modo a explorar melhor as variáveis analisadas, foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP). A Tabela 2 e a Figura 4 representam os critérios que podem ser utilizados para escolha dos Componentes Principais (CP), autovalores acima de 1 e a variância acumulada. O critério aqui adotado como medida explicativa foi a soma da variância, demonstrando que as seis primeiras dimensões somadas atingem 70,21% da variância total.

Tabela 2. Critérios de escolha dos Componentes Principais (CP) da Análise de Componentes Principais (ACP) realizadas nas variáveis analisadas para as rainhas da população coletada no sudoeste do Paraná/BR.

	Autovalores	Percentual de Variância	Variância Acumulada
Dimensão 1	4,11	25,72	25,72
Dimensão 2	2,25	14,10	39,82
Dimensão 3	1,49	9,37	49,19
Dimensão 4	1,28	8,00	57,19
Dimensão 5	1,07	6,72	63,92
Dimensão 6	1,00	6,29	70,21

Fonte: Autoria própria (2023)

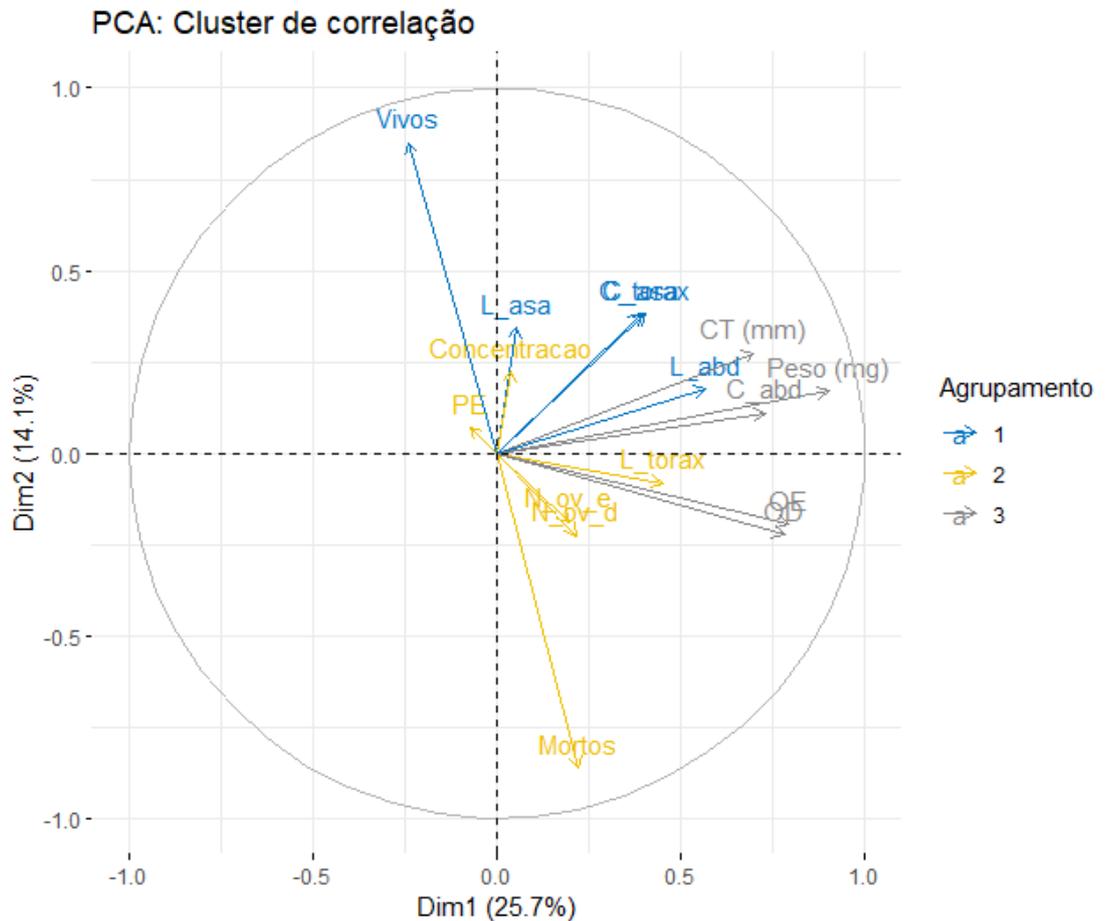
Figura 4. Gráfico “Scree plot” utilizado como critério de escolha dos Componentes Principais (CP) da Análise de Componentes Principais (ACP) realizadas nas variáveis avaliadas para as rainhas da população coletada no sudoeste do Paraná/BR.



Fonte: Autoria própria (2023)

Para explicar as variações do presente trabalho, as dimensões 1 e 2, as quais explicam 39,82% (Tabela 1 e Figura 4) da variância total foram utilizadas. Deste modo, foi possível elaborar o Gráfico de correlações e realizar os agrupamentos (Figura 5). Ao correlacionar todas as variáveis das dimensões 1 e 2 (Figura 5) observou-se a formação de três principais grupos, que concentram as características que mais se correlacionaram.

Figura 5. Gráfico circular da correlação entre as variáveis das dimensões 1 e 2, com formação de 3 agrupamentos/clusters: 1 variáveis em azul, 2 em amarelo e 3 em cinza.



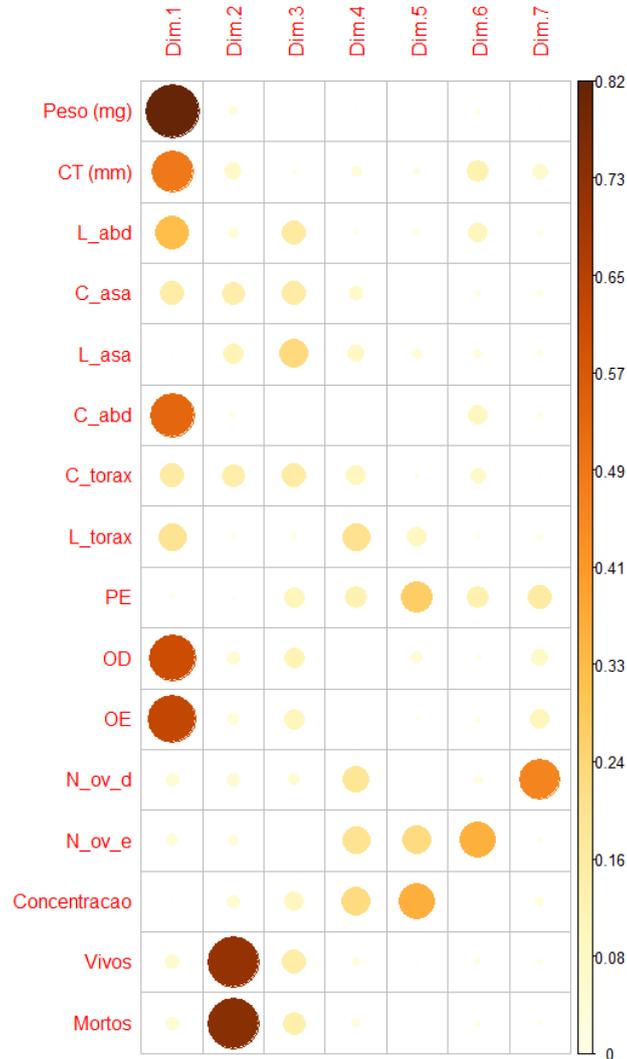
Fonte: Autoria própria (2023)

O agrupamento 1, é composto por número de espermatozoides vivos, comprimento e largura de asa, comprimento do tórax e largura de abdômen. O segundo agrupamento é composto por número de espermatozoides mortos, concentração, peso da espermateca, largura do tórax e número de ovários dos ovários esquerdo e direito. Já o terceiro agrupamento reuniu as características de peso da rainha, dos ovários direito e esquerdo, comprimento total e do abdômen.

A visualização da importância de cada variável dentro de cada Componente Principal (CP) (dimensões) é demonstrada por meio do gráfico de qualidade de representação (Figura 6). Das características que compõem a Dimensão 1, o peso da rainha, peso dos ovários direito e esquerdo, assim como o comprimento do abdômen e comprimento total da rainha são assim classificados em ordem decrescente de importância. A viabilidade espermática, caracterizada pela porcentagem de espermatozoides vivos e mortos tem na Dimensão 2 sua importância representada.

As demais dimensões podem ser melhor exploradas em trabalhos futuros, porém não representam mais de 10% de variância cada uma, sendo menos representativas.

Figura 6. Gráfico de qualidade de representação de cada variável em cada Componente Principal (CP) da Análise de Componentes Principais (ACP) realizadas nas variáveis avaliadas para as rainhas da população coletada no sudoeste do Paraná/BR.



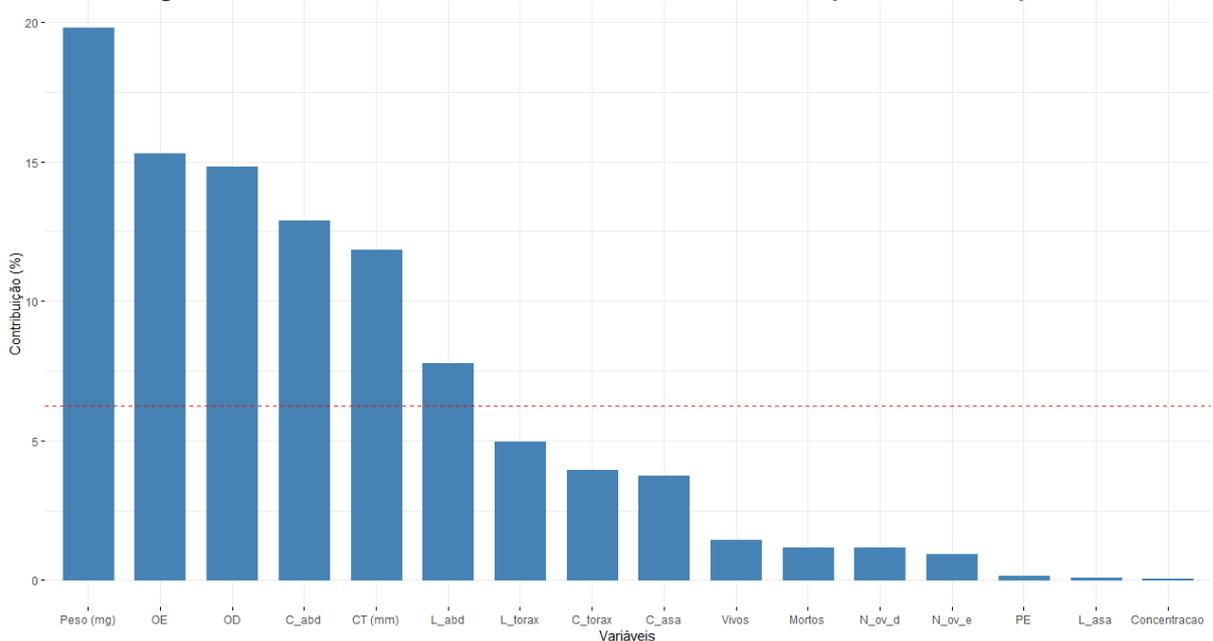
CT= Comprimento Total | L. abd = Largura abdômen | C. asa= Comprimento da asa |
 C. abd = Comprimento abdômen | L. Tórax= Largura do Tórax | PE= Peso Espermateca |
 OD= Peso Ovário Direito | OE= Peso Ovário Esquerdo | N_ov_d= número de ovariolos direito |
 N_ov_e= número de ovariolos esquerdo.

Fonte: Autoria própria (2023)

Cabe ressaltar que os círculos estão relacionados ao tamanho da seta das coordenadas (Figura 5), corroborando com o quanto cada variável interfere no resultado. Ao observar a variável peso da rainha na Figura 5, a mesma apresenta a maior seta, e na Figura 6, o círculo maior e mais escuro, logo, peso é a variável que explica a maior porcentagem de variação dentre as outras características da mesma dimensão.

Neste sentido, em ordem decrescente, as variáveis peso, comprimento total, peso do ovário direito e esquerdo, comprimento e largura do abdômen, comprimento e largura do tórax e comprimento da asa são as com maior variação dentro da Dimensão 1. Na Dimensão 2 as características com maior variação são os espermatozoides vivos e mortos, seguidos de comprimento e largura da asa e comprimento do tórax, resultado confirmado na Figura 7, que contém a contribuição de cada variável dentro do CP1.

Figura 7. Contribuição de cada variável dentro do Componente Principal 1.



Linha tracejada em vermelho representa a média das contribuições.

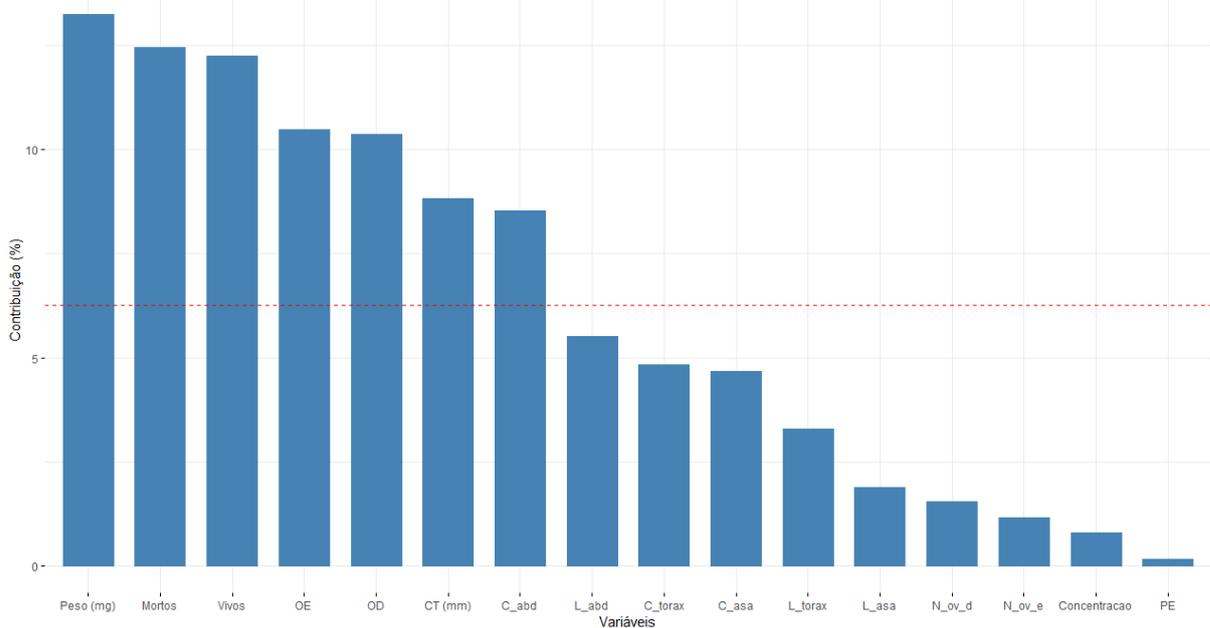
CT= Comprimento Total | L. abd = Largura abdômen | C. asa= Comprimento da asa |
 C. abd = Comprimento abdômen | L. Tórax= Largura do Tórax | PE= Peso Espermateca |
 OD= Peso Ovário Direito | OE= Peso Ovário Esquerdo | N_ov_d= número de ovariolos direito |
 N_ov_e= número de ovariolos esquerdo.

Fonte: Autoria própria (2023)

Na Figura 7, a linha tracejada em vermelho representa a média da contribuição entre as variáveis, ou seja, valores acima da linha são os maiores contribuintes da variação entre as variáveis presentes, que são 6 das 16 variáveis (vivos e mortos compõem a viabilidade espermática). A contribuição para o CP1 é uma das mais importantes, pois é o componente que representa a maior parte da variância. O peso total, peso de ovário esquerdo e direito, comprimento do abdômen, comprimento total e largura abdômen são as variáveis medidas que contribuíram para mais de 50% dos resultados.

Ao somar a contribuição das variáveis nos CP 1 e 2 (Figura 8) levados em consideração no trabalho, observa-se que peso continua sendo a variável de maior relevância, e é seguido da viabilidade espermática (valores de espermatozoides vivos e mortos), após segue sendo peso de ovário esquerdo e direito, comprimento total e muda para o comprimento do abdômen. Variáveis que são correlacionadas com CP1 (Dim.1) e CP2 (Dim.2) são as mais importantes para explicar a variância do conjunto de dados. Variáveis não correlacionadas com nenhum CP ou correlacionadas com as últimas dimensões são variáveis com pequena contribuição, como é o caso de peso de espermateca, número de ovariolos e concentração (Figura 8).

Figura 8. Contribuição de cada variável na soma dos Componentes Principais 1 e 2.



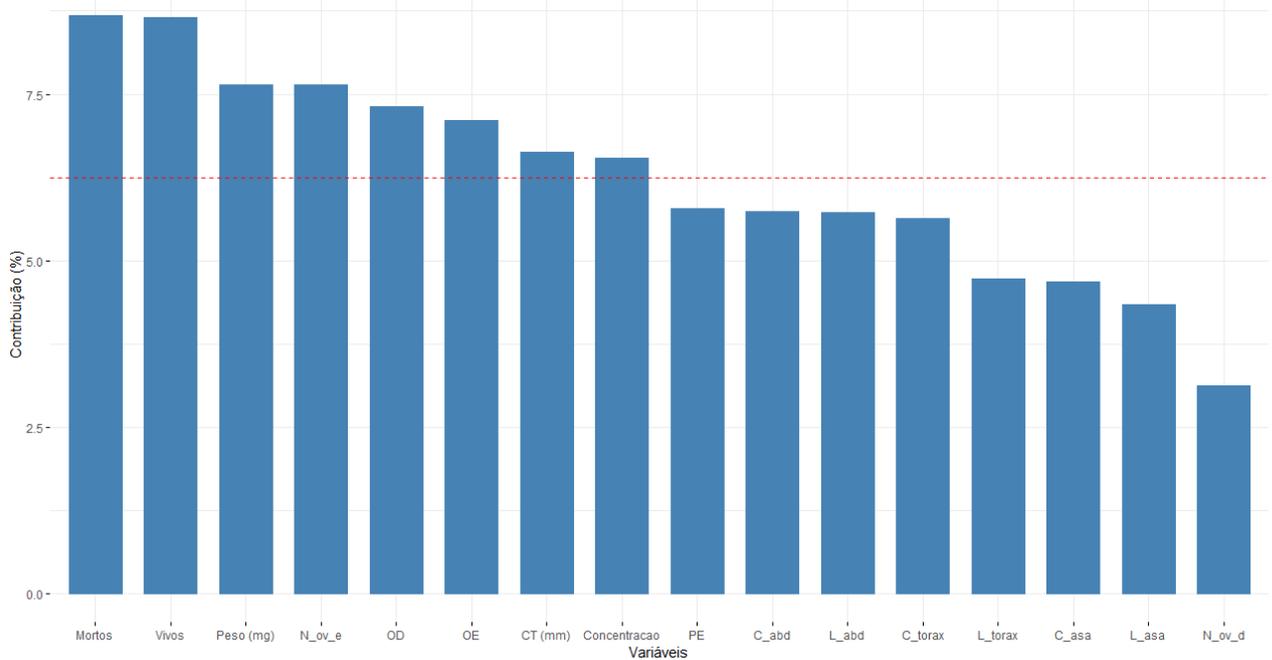
Linha tracejada em vermelho representa a média das contribuições.

CT= Comprimento Total | L. abd = Largura abdômen | C. asa= Comprimento da asa |
 C. abd = Comprimento abdômen | L. Tórax= Largura do Tórax | PE= Peso Espermateca |
 OD= Peso Ovário Direito | OE= Peso Ovário Esquerdo | N_ov_d= número de ovariolos direito |
 N_ov_e= número de ovariolos esquerdo.

Fonte: Autoria própria (2023)

No entanto, ao analisar a Figura 9 visualiza-se as variáveis somadas dos CPs 1 até o 6, os quais representam 70% da variabilidade dos dados. Neste contexto é interessante observar que variáveis como a concentração espermática e peso de espermateca ganham valor de explicação maior do que quando observado apenas, para os CP 1 e 2.

Figura 9. Contribuição de cada variável na soma dos Componentes Principais de 1 até 6.



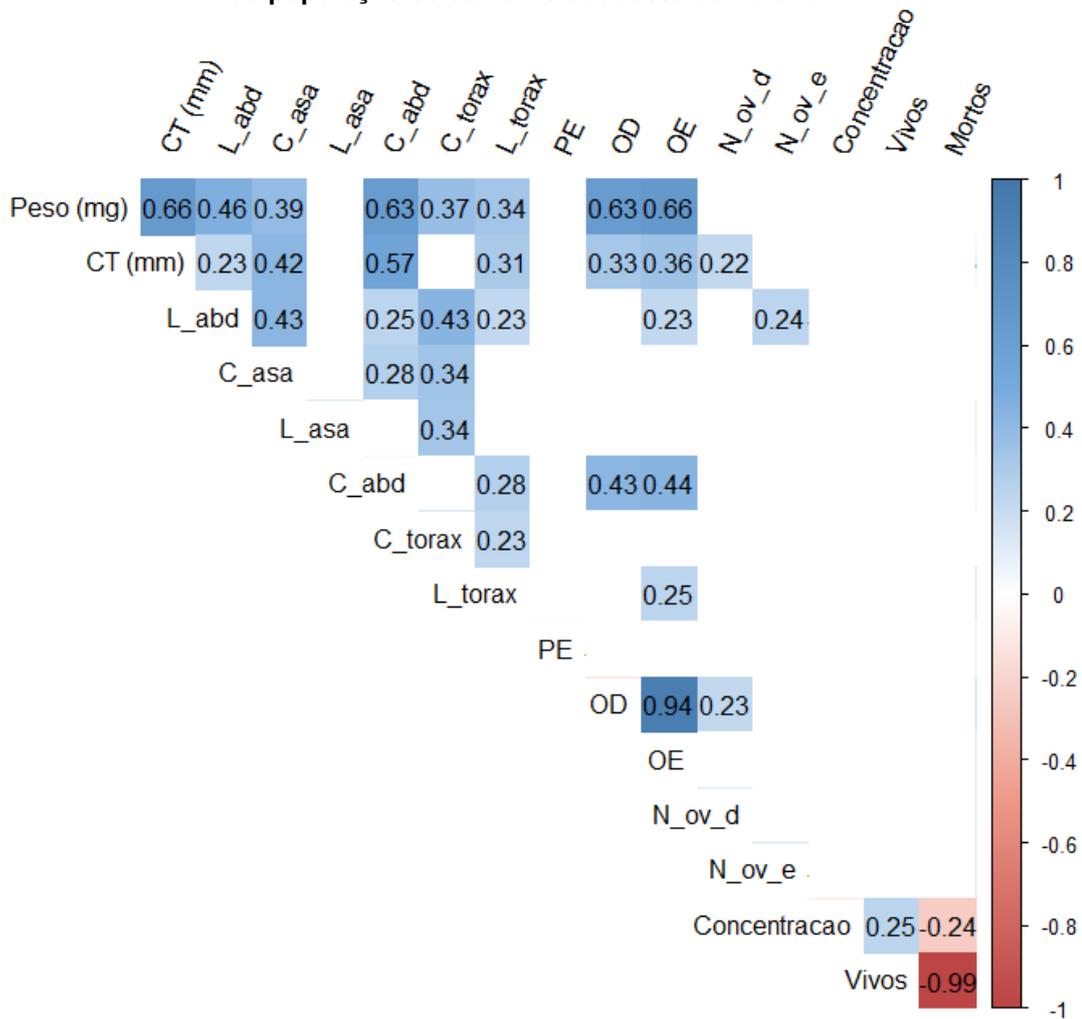
Linha tracejada em vermelho representa a média das contribuições.

CT= Comprimento Total | L. abd = Largura abdômen | C. asa= Comprimento da asa |
 C. abd = Comprimento abdômen | L. Tórax= Largura do Tórax | PE= Peso Espermateca |
 OD= Peso Ovário Direito | OE= Peso Ovário Esquerdo | N_ov_d= número de ovários direito |
 N_ov_e= número de ovários esquerdo.

Fonte: Autoria própria (2023)

A Figura 5 é uma forma de apresentar a correlação entre as variáveis medidas, diretamente ligada às variações dos CP 1 e 2, dentro da ACP. De forma complementar, foi montada a matriz de correlação de Spearman, para visualizar a correlação das variáveis, duas a duas (Figura 10).

Figura 10. Matriz de Correlação de Spearman realizada nas variáveis avaliadas para as rainhas da população coletada no sudoeste do Paraná/BR.



Os coeficientes obtidos foram testados quanto ao nível de significância de 5%.

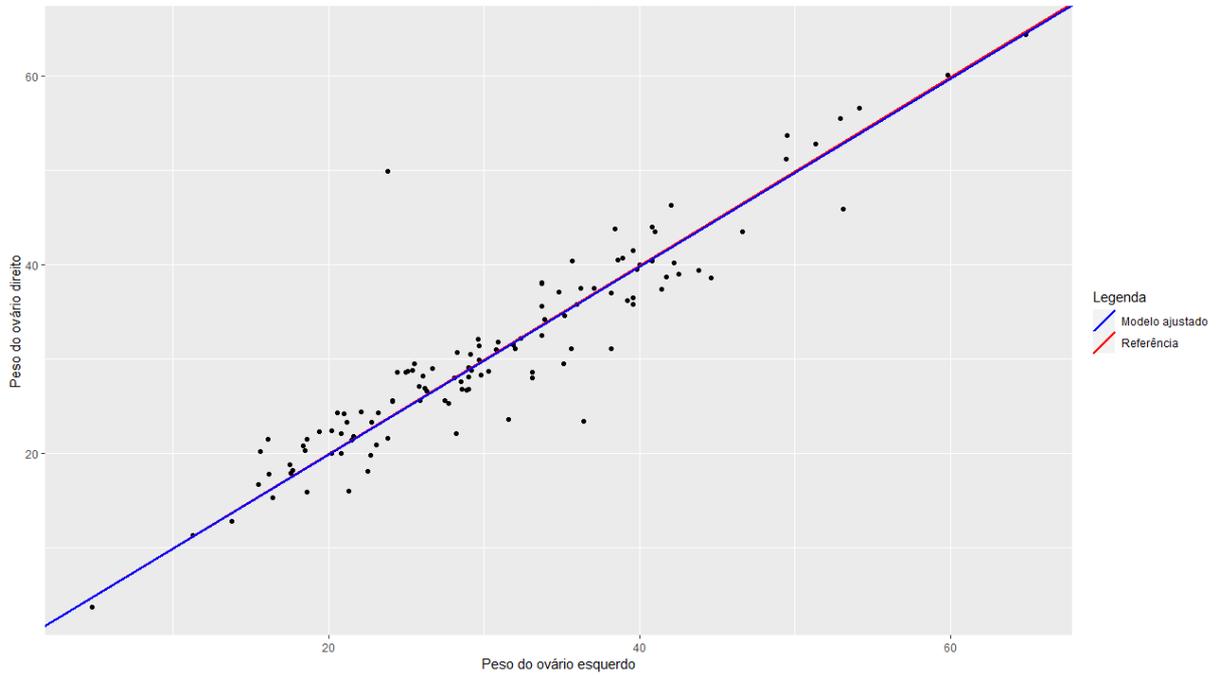
CT= Comprimento Total | L. abd = Largura abdômen | C. asa= Comprimento da asa |
 C. abd = Comprimento abdômen | L. Tórax= Largura do Tórax | PE= Peso Espermateca |
 OD= Peso Ovário Direito | OE= Peso Ovário Esquerdo | N_ov_d= número de ovariolos direito |
 N_ov_e= número de ovariolos esquerdo.

Fonte: Autoria própria (2023)

Observa-se que há apenas duas correlações negativas, uma entre espermatozoides vivos e mortos (-0,99), e a outra entre concentração espermática e porcentagem de espermatozoides mortos (-0,24), o que representa numericamente o impacto da sobrevivência e mortalidade.

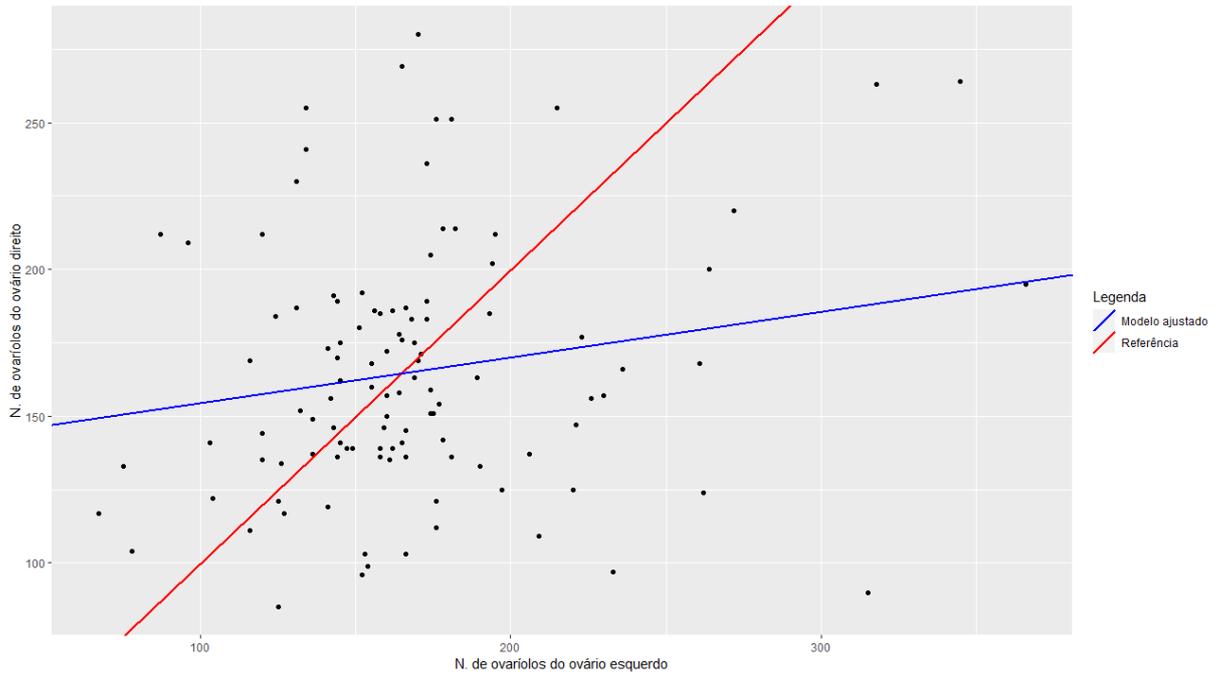
Em contrapartida, a maior correlação é a do peso entre ovário direito e esquerdo (0,94), formando correlação de alta magnitude (valor acima de 0,9), resultado que é confirmado pela análise de regressão apresentada na Figura 11. Ao contrário de peso de ovário direito e esquerdo, número de ovariolos dos ovários direito e esquerdo não apresentaram correlação um com o outro (espaços em branco na matriz), confirmado pela análise de regressão da Figura 12.

Figura 11. Análise de regressão correlacionando os pesos dos ovários direito e esquerdo (OE E OD).



Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 12. Análise de regressão correlacionando os números de ovários presentes nos ovários direito e esquerdo.



Fonte: Autoria própria (2023)

Pode ser apreciado na matriz de correlação (Figura 10), que a maioria delas são positivas, e podem ser classificadas como valores nulos ($=0$), e correlações de magnitude baixa, com valores entre 0 e 0,3. Estão inclusas nesta segunda classe a correlação entre comprimento total e largura abdômen (0,23), comprimento total com

número de ovariolos direito (0,22), largura abdômen com comprimento de abdômen, largura do tórax, peso do ovário esquerdo, número de ovariolos esquerdo (0,25; 0,23; 0,23; 0,24), comprimento da asa com comprimento de abdômen (0,25), comprimento de abdômen com largura do tórax (0,28), comprimento do tórax e largura do tórax (0,23), comprimento do tórax com peso do ovário esquerdo (0,25), largura do tórax com peso do ovário esquerdo (0,25) e peso ovário direito com número de ovariolos direito (0,23).

Consequente, correlações moderadas incluem valores de 0,3 a 0,6, nos quais se encontram a maioria das relações apresentadas (Figura 9). Os resultados incluem a correlação entre as variáveis peso e largura do abdômen (0,46), peso e comprimento da asa (0,39), peso e comprimento do tórax (0,37), peso e largura do tórax (0,34), comprimento total com comprimento da asa (0,42), comprimento total com largura do tórax (0,31), comprimento total com peso dos ovários direito e esquerdo (0,33 e 0,36), largura do abdômen e comprimento da asa (0,43), largura do abdômen e comprimento do tórax (0,43), comprimento da asa com comprimento de tórax (0,34), largura da asa com comprimento tórax (0,34), comprimento de abdômen com peso dos ovários direito e esquerdo (0,43 e 0,44) e o comprimento total com o comprimento do abdômen (0,57).

Os valores entre 0,60 e 0,90 representam as correlações de magnitude alta, apenas as combinações entre o peso da rainha com comprimento total (0,66), comprimento do abdômen (0,63) e peso dos ovários direito e esquerdo (0,63; 0,66) estão nesta classe.

Em termos de peso dos ovários o lado direito e o lado esquerdo são muito simétricos, como pode ser visto na análise de regressão da Figura 10, com coeficiente de determinação elevado ($R^2 = 0,98$). Por outro lado, isso não significa que por serem simétricos em peso também são simétricos em número de ovariolos. A regressão da Figura 11 tem coeficiente de determinação muito baixo $R^2 = 0,043$ e isso pode ser observado na dispersão dos pontos, não sendo possível observar nenhuma simetria.

6 DISCUSSÃO

A temática rainhas de abelhas africanizadas a senescência, principalmente em apiário comerciais, é ainda pouco explorada. Observa-se tal fato ao buscar literatura em plataformas como a “Web of Science”: em todo período até março de 2023, com termos relacionados a rainha de abelhas (Queen and bee OR honey bee OR honeybee OR Apis mellifera OR bees OR bee mellifera OR Apis or honeybee), a longevidade, senescência, substituição, rainha velha (Queen and longevity OR senescence OR disposal OR discarded OR replaced OR replac* OR old), e abelhas africanizadas (Queen and Africanized OR hybrid OR polyhybrid OR hybridized poly OR africanizing OR Africana), apenas 196 resultados são encontrados.

Entretanto, nenhum deles aborda a descrição de populações comerciais de abelhas rainhas africanizadas ao descarte. Este fato impede a comparação direta aos nossos resultados. Mesmo assim, os parâmetros médios serão aqui citados de modo a verificar se as medidas das rainhas ao descarte têm valores semelhantes aos das jovens, ou se elas sofrem alterações ao longo do tempo.

As rainhas aqui estudadas diferem da maioria dos estudos publicados, pois elas não foram criadas em condições controladas como as de laboratório, foram geradas nas condições naturais, dentro das colônias. Essa condição caracteriza a morfofisiologia destas rainhas.

Em relação ao peso, a média encontrada para rainhas jovens é de 157 a 236 mg (TOWNSEND; SHUEL, 1981; SZABO; HEIKEL, 1987; DELANEY et al., 2011; RANGEL; TARPY, 2013; SOUZA et al., 2013; METORIMA et al., 2015; SHEHATA), e mesmo com variação considerável, as rainhas ao descarte ($183 \pm 22,6$ mg) estão com o peso médio dentro do intervalo encontrado na literatura. Vale ressaltar, que Souza et al. (2013) consideraram rainhas virgens abaixo de 180 mg como de qualidade inferior, valores próximos aos aqui encontrados para rainhas já fecundadas, ao descarte.

Dentre as medidas aqui realizadas, o peso da rainha tem a maior relevância na variabilidade, se correlacionando com a maioria das demais (Figura 5 e 10). Explica-se, pois, a maior parte das características interferem diretamente no peso, como o comprimento total (0,66), largura (0,46) e comprimento do abdômen (0,63), peso dos ovários direito (0,63) e esquerdo (0,66), comprimento da asa (0,39), largura (0,34) e comprimento do tórax (0,37). Na Figura 10, visualiza-se a correlação do peso com as

demais variáveis, confirmando que esta característica tem relação com peso de ovário direito e esquerdo (SOUZA et al., 2013).

Por isso, a variável peso da rainha vem sendo considerada como a mais importante das morfométricas analisadas, dado a magnitude de sua correlação com as demais características morfométricas, e principalmente por evidências de existência de relação com área de cria na colônia (BOCH; JAMIESON, 1960; AKYOL; YENINAR; KAFTANOGLU, 2008; SOUZA et al., 2013). Segundo Akyol, Yeninar e Kaftanoglu (2008), a correlação entre peso também impacta positivamente no número de espermatozoides, e no diâmetro da espermateca, o que não ocorreu neste trabalho. Nesse sentido, a ausência dessas correlações pode ser explicada pela baixa qualidade espermática das rainhas avaliadas, especialmente por estarem na fase do descarte.

Visto que, a correlação entre peso e comprimento total é positiva e de alta magnitude (0,66), esta última característica impacta também na largura (0,23) e comprimento do abdômen (0,57), largura do tórax (0,31), comprimento da asa (0,42), e com peso dos ovários direito (0,33) e esquerdo (0,36). O desafio das mensurações fenotípicas ultrapassa a tecnologia disponível na produção animal, visto a dificuldade de coleta de dados fidedigna a campo. Pensando em soluções para a coleta de informações de qualidade, o comprimento total da rainha pode ser utilizado em substituição ao peso dela, trazendo economia e praticidade.

Outro aspecto importante do comprimento total da rainha, foi a relação positiva com o número de ovariolos do ovário direito (0,22). Na literatura, o número de ovariolos não apresenta nenhuma relação com o peso ou medidas externas de rainhas jovens (JACKSON; TARPY; FAHRBACH, 2011; RAULINO-DOMANSKI, 2018), inclusive no âmbito genético (COSTA-MAIA et al., 2019).

Nesse sentido, a largura do abdômen foi a outra característica externa que apresentou correlação com número de ovariolos (0,24), entretanto, com o lado esquerdo. A relação entre senescência de abelhas rainhas, comprimento total e largura do abdômen devem ser estudadas, a fim de elucidar aspectos de simetria em insetos, e futuramente relacioná-los com o potencial reprodutivo das rainhas.

Comumente, a rainha sai para o voo de fecundação uma única vez em sua vida, e podemos dizer que esse é o momento em que as asas serão mais utilizadas. Em função disso, as asas e tórax tem sido estudados, de maneira a estabelecer alguma relação com a qualidade da rainha. O comprimento do tórax tem relação

positiva com o comprimento (0,34) e largura (0,34) da asa, pois funcionalmente se complementam (Figura 10).

O tórax abriga as partes locomotoras da rainha, as asas, as pernas e os músculos, logo é compreensível sua relação com as asas (WINSTON, 1987). Desta forma, tórax maior permite estrutura de músculos e asas maiores, que permite as rainhas voarem maiores distâncias por mais tempo para acasalarem. Assim, acasalam com maior quantidade de zangões, aumento a variabilidade dos genes e podendo armazenar maior quantidade espermática (DELANEY et al., 2011).

Na Figura 5, isso pode ser confirmado, uma vez que, estão no mesmo nível de interação dentro do Componente Principal 1 (CP1). No mesmo agrupamento está a largura do abdômen, que também se correlaciona positivamente com comprimento de tórax (0,43). Essa relação parece ser importante, pois em eventual fuga ou na reprodução da colônia, mais especificamente na enxameação, a rainha fecundada migra para nidificar em outro local, exigindo resistência em atividade de voo por quilômetros.

Aspectos interessantes que relacionaram positivamente a largura do tórax e comprimento da asa, com o número de espermatozoides são relatados por Delaney et al. (2011). No presente estudo, não foram observadas relações entre medidas morfométricas e concentração de espermatozoides, provavelmente por se tratar de rainhas ao descarte. As relações estabelecidas para pesquisas com rainhas jovens, parecem não atender os estudos qualitativos para a fase de senescência.

Dois, dos poucos trabalhos que tratam de medidas lineares em tórax (TARPY et al., 2011; 2012) consideraram que rainhas de baixa qualidade apresentam largura torácica média de $4,24 \pm 0,23$ mm. As rainhas aqui estudadas, apresentaram média de $3,42 \pm 0,43$ mm, o que pode ser gerado por processos bioquímicos na fase de envelhecimento, por passarem a maioria de suas vidas reprodutivas dentro da colônia. Por outro lado, o comprimento do abdômen ($10,39 \pm 0,93$ mm) e das asas ($10,40 \pm 0,66$ mm) foram maiores aos encontrados na literatura por Meteorima et al. (2015) (9,43 mm), e por Tarpy, Hatch e Fletcher (2000) (9,60 mm / 9,33 mm) em rainhas virgens.

As asas tem variação de tamanho ao longo da vida da rainha recém emergida até oito dias de vida (METORIMA et al., 2015). A campo, um conhecimento de senso comum é que rainhas velhas ou de baixa qualidade apresentam fissuras na parte final da asa, sendo essa ainda uma especulação, que futuramente poderá ser testada. Se

validada, poderá ser um parâmetro para determinar visualmente o momento da troca da rainha.

Ao observar os resultados de pesos dos ovários (OD e OE), pode ser verificado que eles apresentaram correlações com as características de tamanho da rainha, como peso, comprimento, abdômen e até mesmo com a largura do tórax. Apesar dos ovários serem constituídos de ovaríolos, apenas o ovário direito se correlacionou com o número de ovaríolos direito, o ovário esquerdo não se correlacionou com os ovaríolos (Figura 10).

Entre si, os ovários têm correlação forte (0,94), e são muito simétricos (Figura 11). Entretanto, isso não significou que o número de ovaríolos também fosse, pois não foi observado correlação entre eles, com valores muito dispersos (Figura 12). Jackson e Tarpy (2011) em seu estudo, encontraram assimetria no número de ovaríolos, com tendência do ovário direito ter mais ovaríolos que o esquerdo, o que não foi confirmado pelo presente estudo.

Ao correlacionar peso total com os número de ovaríolos, autores anteriores não verificaram relação (KAHYA; GENÇER; WOYKE, 2008; METORIMA et al., 2015). Fato não corroborado por Hoopingarner e Farrar (1959), que nos primeiros estudos nessa linha encontraram relação entre peso da rainha e número de ovaríolos, o que deixa margem para prosseguir o estudo nessa área, como forma de estabelecer se há ou não está correlação.

Vale destacar que foram observadas correlações entre número de ovaríolos com peso de ovário direito (0,23), largura de abdômen (0,24) e comprimento total (0,22). Essas relações são de grande importância devido a não haver registros anteriores na literatura. Quantificar os ovaríolos é uma das avaliações de maior complexidade, pois é necessário sacrificar a rainha. Os resultados mostram que ainda a um caminho a ser trilhado até confirmar outra avaliação de fácil análise, como o comprimento total, que possa ser realizada a campo, o que também ocorre com as características de qualidade espermática.

O par de ovários forma um órgão que ocupa cerca de 2/3 do abdômen da abelha rainha, logo não é surpreendente que as características de tamanho tenham correlação (SNODGRASS, 1956). Ovários bem desenvolvidos são importantes para a produção dos ovos que dão origem a toda prole da colônia (operárias, rainhas e zangões), por isso após o acasalamento os ovários podem ficar até 8 vezes maiores do que quando a rainha estava virgem (SHEHATA; TOWNSEND; SHUEL, 1981).

Para mais, o peso dos ovários em uma rainha madura não depende apenas do número de ovários, está vinculado a quantidade e ao estágio de desenvolvimento dos ovos presentes neles (AMIRI et al., 2017). Cada ovário tem entre 100 a 180 ovários, são produzidos cerca de 5 óvulos por dia cada um, estima-se que um ovogônio passa do ovário para o oviduto aproximadamente a cada 3-5 horas, caracterizando um óvulo maduro (SNODGRASS, 1956; ENGELS, 1973; CRUZ-LANDIM, 2009).

Sendo assim, é possível ilustrar que rainhas com média de 335 ovários (165,21 ovário direito e 169,58 no esquerdo) podem madurar de 4 a 8 ovócitos cada um por dia, e gerar até 2.680 ovos. Estas quantidades estão dentro dos parâmetros esperados, inclusive de produção de ovos, os quais estima-se que em ótimas condições podem chegar a 3.000 ovos por dia, todavia dentro do normal é cerca de 1.500 (ECKERT, 1934; SNODGRASS, 1956; CRUZ-LANDIM, 2009; JACKSON; TARPY; FAHRBACH, 2011; KOZII et al., 2021).

A variação no tamanho do ovário pode também ser gerada pelo fato da reabsorção natural dos ovócitos em condições adversas, ou pelas rainhas velhas apresentarem ovários em degeneração (CRUZ-LANDIM, 2009). Gregorc e Škerl (2015), analisaram os pesos dos ovários por 3 anos, em abelhas europeias, e encontraram valores de 69, 73 e 78 mg, valores maiores do que os aqui observados. No entanto, a quantidade de ovários do estudo presente foi maior, mesmo com o peso menor que a literatura.

Neste sentido, ao realizar análises futuras em rainhas, sugere-se a realização de análises qualitativas além das quantitativas, buscando saber quais destes ovários ainda estão funcionais e não apenas a quantidade presente em cada rainha. Para mais, buscar correlacionar com a idade da rainha para descobrir em que momento que o ovário começa sua degeneração.

Ademais, as variações encontradas podem estar relacionadas a idade da rainha, a qual não foi possível ser estimada. Outro fator de variabilidade é a genética das diferentes rainhas, por esses motivos são pontos importantes a serem analisados em futuras pesquisas

Outro ponto de interesse, é que os ovários variam também em comprimento, sendo está outra medida a ser avaliada futuramente. Pois, o filamento terminal sofre o processo de desagregação em rainhas velhas (CRUZ-LANDIM, 2009), esta medida traria possíveis repostas de qual é o padrão e quando começa a reduzir.

Os fatores que afetam o potencial produtivo das rainhas estão entrelaçados, com as características espermáticas não seria diferente. Rainhas provenientes de ovos e larvas recém eclodidas apresentam espermatecas maiores, comparadas as rainhas advindas de larvas de 3º instar (HATCH; TARPY; FLETCHER, 1999; TARPY; HATCH; FLETCHER, 2000; RANGEL; KELLER; TARPY, 2013).

O peso da espermateca (PE) é atrelado ao seu tamanho, logo, a quantidade de espermatozoides que ela é capaz de armazenar. Contudo, uma espermateca grande não significa sozinha uma rainha de boa qualidade, caso ela não realize uma cópula eficiente.

O PE não apresentou nenhuma correlação com as demais características (Figura 10), tem a menor correlação com o Componente Principal (Figura 5), e é um dos fatores com menor contribuição para explicar a variação (Figuras 7,8 e 9). Como citado anteriormente, essa é outra característica que pode apresentar esse padrão pela baixa qualidade espermática da rainha ao descarte.

A concentração espermática, também chamada em outros estudos de número de espermatozoides, foi de aproximadamente 1,8 milhão de espermatozoides por espermateca, variou entre 300 mil a 4,8 milhões de espermatozoides (Tabela 1). Diversos estudos apontam amplas faixas de concentração de espermatozoides, em média de 4 a 7 milhões de espermatozoides ficam armazenados na espermateca da rainha (WOYKE, 1962; COBEY, 2007; AL-LAWATI; KAMP; BIENEFELD, 2009; DELANEY et al., 2011), os quais serão usados durante toda sua vida reprodutiva.

A redução do estoque de espermatozoides aqui encontrada (1,8 milhão de rainhas ao descarte vs 4 - 7 milhões rainhas recém fecundadas) pode ser explicada pelo fato das rainhas colocarem até 3.000 ovos por dia (SNODGRASS, 1956; CRUZ-LANDIM, 2009; KOCHER; TARPY; GROZINGER, 2010), e cada membrana do ovo ser penetrada por até 20 espermatozoides (HARBO, 1979; BAER et al., 2016; GILLARD; OLDROYD, 2020).

Harbo (1979), observou que as rainhas usaram metade de seus espermatozoides em cerca de 5 meses, equivalente à metade da safra local, passaram de 5 para 3,25 milhões. De acordo com as observações anteriores Szabo e Heikel (1987) verificaram que as concentrações diminuíram logaritmicamente com a idade da rainha. Lodesani, Balduzzi e Galli (2004) corroboram ao verificar que rainhas apresentaram 5,1 milhões com 2 meses de vida, 4 milhões com um ano e 2,6 milhões com dois anos.

Uma rainha com menos de 500 mil espermatozoides pode passar a produzir muitos zangões ao invés de operárias, o que significa que ela só pode colocar ovos não fertilizados (PAILLARD et al., 2017). Tendo isto em vista, as rainhas encontradas nas colônias estudadas estavam muito próximas de findar sua fecundação de ovos sendo que foram obtidos valores de até 300 mil.

Gençer e Kahya (2011) encontraram média de 7,25 milhões de espermatozoides em rainhas jovens. Todavia, Tarpay et al. (2012), verificaram 4,37 milhões. Delaney et al. (2011), avaliaram 115 rainhas recém-fecundadas e obtiveram média de $3,99 \pm 1,504$ milhões de espermatozoides (variação de 0,20 – 9,03 milhões). Os próprios autores classificaram 18,9% das rainhas avaliadas como “mal inseminadas”, consideradas as com menos de 3 milhões de espermatozoides armazenados, e 81,1% como “subinseminados” com menos de 5 milhões com base em Woyke (1962).

De acordo com a classificação acima, todas as rainhas aqui analisadas estão “subinseminados” e “mal inseminadas”, ou seja, abaixo do nível desejado, entretanto é importante ressaltar que essa classificação e denominação são para rainhas recém fecundadas. Neste caso, as rainhas se mostraram realmente desgastadas, aptas a serem substituídas em suas colônias de origem.

Esses dados são apoiados pelo estudo de Al-lawati et al. (2009) que compararam rainhas recém fecundadas, com rainhas trabalhando por um e dois anos, observaram que o número de espermatozoides na espermateca das rainhas diminuiu significativamente com o tempo após o acasalamento, mas que de um ano para dois não havia diferença significativa. Pode significar que no primeiro ano de vida a rainha está em pleno funcionamento, mas que após seu desempenho decresce e estabiliza em uma média baixa. Eles observaram que em média a espermateca de rainhas de um ano tinha apenas 38% de uma espermateca de uma rainha jovem e as de dois anos apenas 21%.

Por outro lado, existe a possibilidade dessas rainhas terem sofrido fecundação de baixa qualidade, esgotando seu estoque de espermatozoides rapidamente. São diversos os motivos que podem interferir na fecundação como a idade da rainha e dos zangões, condições climáticas, disponibilidade de alimentos, qualidade espermática, estresse (METZ; TARPAY, 2019).

Esses dados são apoiados pela pesquisa de Metz e Tarpay (2019), que encontraram variação da qualidade dos zangões maior do que se pensava até então,

mudando a produção de espermatozoides e seu próprio tamanho corporal ao passar do seu ciclo da vida. Os autores mostram que ao nascer eles não possuem espermatozoides viáveis, e atingem a máxima produção por volta dos 20 dias, com média de $7,39 \pm 0,19$ milhões de espermatozoides, que começa a declinar quando os zangões completam 30 dias. Este é mais um fator de interferência na qualidade da rainha, pois os problemas de baixa qualidade espermática pode estar vinculada ao processo de acasalamento.

Delaney et al. (2011), encontraram sete diferentes vírus em rainhas recém fecundadas, com maior prevalência do vírus de asa deformada (DWV). As doenças podem afetar a reprodução, como o DWV, que pode interferir na produção de espermatozoides por zangões ou na capacidade das rainhas de armazenar espermatozoides. O contato social entre as abelhas pode ser um meio transmissor de doenças, como o ato da trofalaxia, tendo isso em vista é possível que ao longo da vida da rainha ela adquira alguma doença que também possa reduzir a quantidade de espermatozoides ou a qualidade de armazenamento (PRODELALOVÁ; MOUTELÍKOVÁ; TITERA, 2019).

Como observado na Figura 2, a motilidade das rainhas ao descarte encontrada foi baixa (0, 20 e 40% ou classificação 0, 1 e 2), de acordo com os próprios autores que elaboraram a classificação (KAFTANOGLU; PENG, 1984), pois ao realizarem a pesquisa só utilizaram sêmen classificados como 3 ou mais. A motilidade espermática é fundamental para a migração do sêmen para a espermoteca da rainha, subsequentemente para a fertilização do óvulo (YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020).

Mesmo assim, quando se trata de abelhas essa variável é analisada apenas ocasionalmente, na maior parte dos estudos está diretamente relacionado ao zangão e não na rainha. Mesmo sendo um dos parâmetros mais utilizados para determinar a qualidade do esperma em mamíferos (YÁNIZ et al., 2018; YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020).

Somado a isso, há uma dificuldade do estabelecimento de um método objetivo da realização da análise, pois são várias as particularidades na morfologia dos espermatozoides de abelhas. Os mesmos não têm a cabeça proeminente como nos mamíferos, ela é pequena e estreita se confundindo facilmente com o flagelo, este fato dificulta a identificação de cada espermatozoide por análise de imagem (PENG; YIN; YIN, 1993; YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020).

A maioria dos estudos trabalha com sistema de classificação (KAFTANOGLU; PENG, 1984), assim como o realizado aqui, mudando apenas as escalas, mas sempre referente a percentuais de movimentação (VERMA, 1978). Outros métodos tem sido desenvolvidos em busca de amenizar a subjetividade ou até mesmo progredir a um método objetivo, como a porcentagem de células móveis, o tipo de movimento (WEGENER et al., 2012) e o uso de programas computacionais (AL-LAWATI; KAMP; BIENEFELD, 2009).

Al-lawati et al. (2009), avaliaram motilidade de forma diferente ao presente estudo, os autores verificaram a velocidade e o movimento dos espermatozoides, todavia não classificaram velocidade de 1 a 5, usaram um software para medir a velocidade. Concluíram, que os espermatozoides na espermateca das rainhas mais velhas movem-se mais lentamente, em particular nas rainhas de dois anos que inclusive apresentaram espermatozoides imóveis. Pode-se fazer uma relação com a motilidade 0 (imóveis) encontrada nas rainhas deste experimento, o que indica que tais rainhas tinham mais de 2 anos.

Além disso, Al-lawati et al. (2009), avaliaram o movimento dos espermatozoides, atribuíram o movimento circular padrão para rainhas jovens e movimento em linha reta para rainhas velhas. Desta forma, encontraram que as rainhas recém acasaladas tinham apenas um padrão de movimento circular, rainhas de dois anos apresentaram movimento exclusivo em linha reta e rainhas de um ano os dois tipos de movimentos sendo 75% em linha reta e 25% em movimento circular padrão.

Wegener et al. (2012), também avaliaram motilidade dos espermatozoides, porém com o sêmen diretamente do zangão, sem passar pela espermateca. Os autores classificaram os espermatozoides como móveis ou imóveis e quanto ao movimento circular ou não circular. Obtiveram resultado de $96,1 \pm 2,8$ dos espermatozoides móveis e $96,7 \pm 1,8$ com movimentos circulares, no mesmo caminho dos resultados de Al-lawati et al (2009), que apontaram o sêmen na espermateca ainda com movimento circular na rainha recém fecundada.

Os movimentos circulares dos espermatozoides podem ser explicados pelo fato dos espermatozoides longos precisarem desse movimento para evitar se emaranharem dentro da espermateca. Outrossim, este movimento pode ajudar os espermatozoides individuais a deixarem a massa para fertilização (WERNER; ZISSLER; PESCHKE, 1999).

Pode ser inferido que a redução dos espermatozoides, a baixa motilidade e a mudança para o movimento retilíneo, façam com que mesmo a rainha ainda possuindo espermatozoides armazenados, mesmo que vivos, eles não consigam se desenrolar dos demais e saírem para fecundarem os ovos. Estes fatores apoiam a prática de substituição das rainhas, entretanto é necessário realizar o controle zootécnico para otimizar o manejo.

A viabilidade espermática pode ser vista de diversos ângulos, como nas diferentes fases da vida do zangão, na vesícula seminal, no ejaculado, no oviduto lateral da rainha e por fim na espermateca. Vários fatores influenciam na variação, como o ambiente, o clima, nutrição, manejos, exposição a pesticidas, idade de zangão e por fim a idade da rainha (RHODES, 2008; YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020).

O fato é que há grande variação nos resultados encontrados. A viabilidade ou vitalidade do sêmen dos zangões, antes da rainha ser fecundada, e muito antes dela completar seu ciclo reprodutivo na colônia, podem variar entre 55 e 99% (RHODES, 2008; GENÇER; KAHYA, 2011; FOURNIER; GIOVENAZZO, 2015; METZ; TARPY, 2019; ROUSSEAU; YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020).

Sob outra perspectiva, na espermateca da rainha a viabilidade é em média entre 80 e 98% (GENÇER; KAHYA, 2011; TARPY et al., 2012; TARPY; OLIVAREZ, 2014). A perda progressiva com o avançar da idade da rainha é esperada, o decréscimo de espermatozoides vivos está de acordo com Lodesani, Balduzzi e Galli (2004) e Tarpay e Olivarez (2014). Os primeiros, verificaram taxas de $79,5 \pm 2,5\%$ de espermatozoides vivos em rainhas após 2 meses de postura, $78,5 \pm 2,1\%$ em rainhas com 1 ano e caindo para $66,5 \pm 3,2\%$ em rainhas com 2 anos. Por outro lado, os segundos observaram redução aproximada de 10% em 6 meses.

Os resultados aqui encontrados de viabilidade espermática (média $56,17 \pm 24,67\%$; com intervalo entre 1,33 e 96% em 111 rainhas)(Tabela 1 e Figura 2), estão no limite do mínimo necessário de 42,5%, antes de afetar a produção de ovos fecundados (COLLINS, 2000). Pettis et al. (2016), apuraram que colônias identificadas com baixo desempenho pelos apicultores estavam com rainhas que apresentaram espermatozoides com baixa viabilidade, quando comparadas com rainhas de caixas classificadas com boa produção.

Estudos apontam caminhos diferentes em relação a saída do sêmen das vesículas seminais dos zangões para os ovidutos das rainhas. Em uma investigação

foi relatado a redução de cerca de 10% da viabilidade espermática ao ocorrer esse transporte das vesículas (98,1%) para os ovidutos (88,7%) (GENÇER; KAHYA; WOYKE, 2014). Por outro lado, Collins (2000) acurou média aproximada de 65% tanto dos zangões quanto na espermateca.

Na avaliação de Rousseau et al. (2015), os autores apontaram como preocupante seus resultados em comparação a outros estudos, mensuraram a viabilidade em zangões de $64,2 \pm 1,07\%$. Metz e Tarpy (2019), encontraram outro resultado interessante ao medir 522 zangões, com média de viabilidade de $73,52 \pm 0,80\%$.

Para fecundação dos ovos as rainhas utilizam os espermatozoides vivos, em detrimento disto o que vai restando na espermateca são os não viáveis (TARPY; OLIVAREZ, 2014; KAHYA; GENÇER, 2022). Outro ponto é o vigor da rainha em sua fase inicial de postura, na qual ela sofre grande estresse, que pode influenciar a viabilidade (KAHYA; GENÇER, 2022).

Estudos tem procurado entender os mecanismos que as abelhas rainhas usam para manter os espermatozoides viáveis por tanto tempo em seu órgão especializado. Alguns modos desta manutenção a longo prazo foram encontrados e estão sendo explorados, tais como as concentrações de Na^+ e K^+ , pH altamente alcalino de 8,6 (VERMA, 1973, 1974, 1978), atividades altas das enzimas catalase (WEIRICH; COLLINS; WILLIAMS, 2002), secreções glandulares das rainhas (BOER; BOOMSMA; BAER, 2009), um subconjunto específico de proteínas (ZAREIE et al., 2013).

As abelhas tem sido usadas como modelo biológico para diversas espécies há vários anos, por serem criadas e terem uma base maior de estudos (KÖHLER; NICOLSON; PIRK, 2013; YANG et al., 2021). Mesmo assim, não se tem informações concretas de como a espermateca mantém os espermatozoides aptos a fertilizarem os ovos por até cinco anos (VERMA, 1974; WEIRICH; COLLINS; WILLIAMS, 2002). Estudos tem sido realizados em busca destes mecanismos, todavia ainda há muitas dúvidas a serem sanadas.

Neste trabalho não foi utilizado anestésico antes da dissecação da rainha, como frio ou CO_2 , foram tomados cuidados para que a coleta de dados evoluísse o mais rápido possível, em busca de reduzir ao máximo os estímulos de nocicepção. McAfee et al. (2020) estudaram o estresse térmico em rainhas jovens, os resultados

indicaram que as rainhas resistem razoavelmente ao estresse térmico, porém os espermatozoides não.

Tendo isso em vista, resultados como de Paillard et al. (2017), podem não ser adequados, pois eles sacrificaram a rainha colocando-as no freezer -20°C por 15 minutos. Esses autores testaram diferentes conservações para o sêmen, e após avaliaram a espermateca das rainhas inseminadas, com isso encontraram uma variação de 10 a 71% de viabilidade, e uma concentração de 5.000 a 150.000; valores bem baixos, que podem ser explicados pelo estresse térmico.

Ao longo da exploração das bibliografias foi encontrada a análise da classificação da espermateca conforme a coloração, densidade e tonalidade apresentada por ela. A cor bronzeada cremosa da espermateca mostra uma boa quantidade de espermatozoides, a aparência leitosa mostra uma baixa quantidade e se a espermateca estiver clara, mostra que a rainha é virgem (COBEY; TARPY; WOYKE, 2013). Visto que, é uma análise de baixo custo e que pode apresentar de imediato resultados sobre as rainhas sugere-se realizar esta classificação em estudos futuros.

As características de qualidade espermática apresentaram apenas uma correlação positiva, entre concentração e número de espermatozoides vivos (0,25), e duas negativas, sendo uma delas entre concentração e número de espermatozoides mortos (-0,24). De modo complementar, a quantidade de espermatozoides vivos e mortos teve correlação -0,99, ou seja, inversamente proporcionais, quanto maior o número de vivos menor o número de mortos, visto que a soma dos dois é 100%.

Resultado dentro do esperado, pois a concentração é referente a quantidade de espermatozoides presentes na espermateca. Em outros trabalhos também foram encontradas correlações positivas entre a concentração e a viabilidade espermática, (METZ; TARPY, 2019).

Algumas variáveis como peso de espermateca e concentração de espermatozoides não tem influência aparente quando se olha para as dimensões 1 e 2 (Figura 5-9), apenas na dimensão 5 (Figura 6 e 9) estas características passam a ter maior potencial de explicar dado fenômeno. Porém, isso não quer dizer que as variáveis não são relevantes, a concentração baixa pode reduzir o peso da espermateca, entretanto, essas variáveis não tem correlação nem são diretamente influenciadas pelas outras como as características de tamanho, logo só aparecem nas

dimensões finais. Mas, não se deve deixar de realizar análises sobre qualidade espermática, principalmente por se tratar ainda de medidas pouco exploradas.

Foi descoberto recentemente, que as temperaturas externas extremas podem afetar as colônias, por consequência a rainha, pois as abelhas enfrentam dificuldade para termorregular (MCAFEE et al., 2020b). A cidade de Capanema tem sido noticiada com temperaturas recordes no estado do Paraná, acima de 40°, a qual é considerada muito quente. Este último, pode ser um fator para perda das colônias e redução da qualidade das rainhas. Posto isso, é necessário tomar os cuidados básicos de bem-estar animal de maneira a buscar medidas para mitigar os efeitos de estresse por temperatura.

Mesmo em revisões sobre o comportamento das rainhas não há perspectivas sobre sua longevidade, sobre como se desencadeia a senescência (ABOU-SHAARA; ADGABA; AL-GHAMDI, 2021). O fator geralmente relacionado ao envelhecimento é o esgotamento do conteúdo da espermoteca.

Além disso, se sabe que as rainhas mais velhas apresentam ovário em degeneração e desagregação no filamento terminal, mas mesmo em extensa revisão sobre a morfologia e as funções dos sistemas, não se sabe como funciona o processo de senescência nas rainhas (CRUZ-LANDIM, 2009). Em operárias, está provado que não são apenas os fatores extrínsecos que afetam seu envelhecimento, mas também fatores internos, e que há desagregação celular e descontinuação do epitélio à senescência (CRUZ-LANDIM, 2009; REMOLINA et al., 2007).

Deve ser considerada a possibilidade de que os mecanismos que mantêm o metabolismo ativo apresentem dificuldade de manter o funcionamento do sistema com o desgaste da rainha. Assim como, as rainhas vão perdendo a capacidade de liberar feromônio (ABOU-SHAARA; ADGABA; AL-GHAMDI, 2021), novos estudos podem ser feitos para avaliar essa teoria.

De maneira a concluir o exposto até então, ao comparar os parâmetros de qualidade espermática entre rainhas jovens e as deste trabalho, os resultados foram valores inferiores nos atributos de qualidade espermática, menor concentração, motilidade e viabilidade. Neste mesmo sentido, o peso médio das rainhas foi similar ao das jovens de qualidade inferior, e a largura do tórax da rainha ao descarte foi em média 20% menor.

Em contrapartida, o comprimento da asa e do abdômen foram maiores aos encontrados na literatura. Dentre os órgãos reprodutivos, os ovários mostraram-se simétricos, no entanto esta semelhança não se estendeu ao número de ovariolos.

As medidas externas apresentaram correlação entre si, porém foram poucas as correlações com as medidas morfofisiológicas. Todavia, destaca-se que comprimento total e largura de abdômen obtiveram correlação com a quantidade de ovariolos, que é uma das medidas mais complexas de serem mensuradas, indicando alternativas de mensurações a campo.

Além disso, como ferramenta para análises futuras de rainhas ao descarte, podem ser utilizadas as características que melhor explicam a variação dos dados, com base nos Componentes Principais encontrados aqui. Em especial, métricas advindas de agrupamentos distintos, à exemplo: peso, viabilidade e largura de tórax.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A variabilidade observada para o conjunto de dados deste trabalho, demonstrou que características morfofisiológicas serão úteis ao processo de seleção, para a qualidade de rainhas. Uma vez que se observou variabilidade fenotípica, a possibilidade de identificação de variação genética aditiva passa a ser também possível. Nesse sentido, as características aqui avaliadas passam a ser passíveis de serem utilizadas não apenas pela variação, mas também pela facilidade e viabilidade econômica dessas mensurações.

Entretanto, o manejo de descarte de rainhas em nosso país ainda não apresenta padrão ou controle suficiente para que as estimativas de variação possam de fato representar o potencial de ganho em qualidade de rainhas africanizadas. Neste trabalho, foi mantido o procedimento padrão dos apicultores frente ao descarte de rainhas, o que não necessariamente indica que elas estavam à fase de senescência.

Em função disso, as variações observadas, podem ir além das próprias características, sendo viesadas pela variação não controlada de idade dessas rainhas. Sendo assim, os resultados aqui apresentados devem ser usados com cautela, uma vez que mais estudos devem ser realizados, obrigatoriamente com o controle total sobre a idade das rainhas a serem avaliadas.

Ademais, foi verificada a necessidade premente do controle zootécnico das colônias, mais especificamente sobre a idade das rainhas do apiário para a tomada de decisão acertada sobre o momento adequado de descarte. Por meio dessa informação, o investimento e retorno financeiro em rainhas jovens será dimensionado, de maneira a otimizar e popularizar o manejo de substituição de rainhas controlado.

O banco de dados coletado para este trabalho poderá incentivar futuras pesquisas em busca da identificação de rainhas padronizadas quanto ao potencial reprodutivo, e a melhoria de manejos a campo.

REFERÊNCIAS

- ABEMEL, Brazilian Association of Honey exporters. **Dados Estatísticos do Mercado de Mel 2016 a 2021**, 2022.
- ABOU-SHAARA, H. F.; ADGABA, N.; AL-GHAMDI, A. A. Current knowledge about behaviors of honey bee queens with highlighting of the importance future studies. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 82, n. 37, p. 1–7, 2021.
- AKYOL, E.; YENINAR, H.; KAFTANOGLU, O. Live weight of queen honey bees (*Apis Mellifera* L.) predicts reproductive characteristics. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 81, n. 2, p. 92–100, 2008.
- AL-LAWATI, H. T.; 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.
- AMIRI, E. et al. Queen quality and the impact of honey bee diseases on queen health: Potential for interactions between two major threats to colony health. **Insects**, v. 8, n. 48, p. 1–18, 2017.
- BAER, B. et al. Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 2877–2885, 2016.
- BIGIO, G.; GRÜTER, C.; RATNIEKS, F. L. W. Comparing Alternative Methods for Holding Virgin Honey Bee Queens for One Week in Mailing Cages before Mating. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. 5, 2012.
- BIXBY, M. et al. Honey Bee Queen Production: Canadian Costing Case Study and Profitability Analysis. **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 4, p. 1618–1627, 2020.
- BOCH, R.; JAMIESON, C. A. Relation of Body Weight to Fecundity in Queen Honeybees. **THE CANADIAN ENTOMOLOGIST**, p. 700–701, 1960.
- BOER, S. P. A. DEN; 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.
- CAPA - Canadian Association of Professional Apiculturists. **Guia de Referência do Criador de Abelhas Rainhas das Abelhas de Mel canadenses (2019) - CAPA**. Disponível em: <<https://capabees.com/canadian-honey-bee-queen-bee-breeder-reference-guide-2019/>>. Acesso em: 26 abr. 2021.
- CASAMEL, C. S. DE A. E M. DE S. C. –; CELLA, I.; MALLMAN, J. **PLANO DE DESENVOLVIMENTO DA APICULTURA E MELIPONICULTURA CATARINENSE (PDAMC)**. Florianópolis: EPAGRI.
- COBEY, S. W. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally

mated honey bee queens and factors affecting their performance. **Apidologie**, v. 38, p. 390–410, 2007.

COBEY, S. W. An Introduction to Instrumental Insemination of Honey Bee Queens. **Bee World**, v. 93, n. 2, p. 33–36, 2016.

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

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

COLOSSENSES. **Bíblia**. Edição catequética popular. Português. São Paulo: Ave Maria, 2010.

CONTRERAS-MARTINEZ, C. A. et al. Effect of Different Substrates on the Acceptance of Grafted Larvae in Commercial Honey Bee (*Apis mellifera*) Queen Rearing. **DE GRUYTER**, v. 61, n. 2, p. 245–251, 2017.

COSTA-MAIA, F. M. et al. **Genetic aspects of emergence weight, ovary weight and number of ovarioles in honey bee queens** Montréal 46th APIMONDIA - International Apicultural Congress, 2019.

CRUZ-LANDIM, C. da. **Abelhas - Morfologia e função de sistemas**. São Paulo: UNESP, 2009.

DADE, H. A. **Anatomy and Dissection of the Honeybee**. Internacional Bee Research Association-IBRA, ed. 1994.

DELANEY, D. A. et al. The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 42, n. 1, p. 1–13, 2011.

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

ECKERT, J. E. Studies in the number of ovarioles in queen honeybees in relation to body size. p. 629–634. 1934.

ECKERT, J. E. Relation of size to fecundity in queen honeybees. p. 646–648. 1937.

ENGELS, W. Das zeitliche und räumliche Muster der Dottereinlagerung in die Oocyte von *Apis mellifica*. v. 142, p. 409–430, 1973.

GENÇER, H. V.; KAHYA, Y. Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? **Journal of Apicultural Research**, v. 50, n. 2, p. 130–137, 2011.

GENÇER, H. V.; KAHYA, Y.; WOYKE, J. Why the viability of spermatozoa diminishes

in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. **Apidologie**, v. 45, p. 757–770, 2014.

GILLARD, T. L. Reprodução controlada na abelha melífera (*Apis mellifera*) por inseminação artificial. v. 59, 2020.

GILLARD, T. L.; OLDROYD, B. P. **Controlled reproduction in the honey bee (*Apis mellifera*) via artificial insemination**. 1. ed. Elsevier Ltd. v. 59. 2020.

GREGORC, A.; ŠKERL, M. I. S. Characteristics of Honey Bee (*Apis mellifera carnica*, Pollman 1879) Queens Reared in Slovenian Commercial Breeding Stations. **DE GRUYTER**, v. 59, n. 2, p. 5–12, 2015.

HABERL, M.; TAUTZ, D. Sperm usage in honey bees. **Behav Ecol Sociobiol (1998)**, v. 42, p. 247–255, 1998.

HARBO, J. R. The Rate of Depletion of Spermatozoa in the Queen Honeybee Spermatheca. **Journal of Apicultural Research**, v. 18, n. 3, p. 204–207, 1979.

HATCH, S.; TARPY, D. R.; FLETCHER, D. J. C. Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality. **Insectes Sociaux**, v. 46, p. 373–377, 1999.

HOOPINGARNER, R. et al. Genetic Control of Size in Queen Honey Bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 52, n. 4, p. 547–548, 1 ago. 1959.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6935#resultado>>. Acesso em: 29 abr. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção de Mel de abelha**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mel-de-abelha/br>>. Acesso em: 29 abr. 2023.

JACKSON, J. T.; TARPY, D. R.; FAHRBACH, S. E. Histological Estimates of Ovariole Number in Honey Bee Queens, *Apis mellifera*, Reveal Lack of Correlation with other Queen Quality Measures. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 82, p. 1–11, 2011.

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

KAHYA, Y.; GENÇER, H. V. Temporal Variation in the Viability of Spermatozoa in the Spermathecae of Queen Honey Bees (*Apis mellifera* L.). **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 10, n. 2, p. 319–322, 2022.

KAHYA, Y.; GENÇER, H. V.; WOYKE, J. Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods . **Journal of Apicultural Research**, v. 47, n. 2, p. 118–125, 2008.

KHAN, K. A. et al. Queen cells acceptance rate and royal jelly production in worker honey bees of two *Apis mellifera* races. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, p. 13, 2021.

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. 10, 2022.

KIERNAN, J. A. Strategies for Preventing Detachment of Sections from Glass Slides. **Microscopy Society of America**, v. 7, n. 6, p. 20–24, 1999.

KINGHORN, B. P. et al. Strategies to Exploit Genetic Variation While Maintaining Diversity. **Adaptation and Fitness in Animal Populations**, p. 191–200, 2009.

KOCHER, S. D. et al. Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). **BMC Genomics**, v. 9, n. 232, p. 1–15, 2008.

KOCHER, S. D.; TARPY, D. R.; GROZINGER, C. M. The effects of mating and instrumental insemination on queen honey bee flight behaviour and gene expression. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 2, p. 153–162, 2010.

KOENIGER, N.; KOENIGER, G. Review article Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. **Apidologie**, v. 31, p. 313–339, 2000.

KÖHLER, A.; NICOLSON, S. W.; PIRK, C. W. W. A new design for honey bee hoarding cages for laboratory experiments. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics** 2008 21:6, v. 52, n. 2, p. 12–14, 2013.

KOZII, I. V et al. Histomorphological description of the reproductive system in mated honey bee queens. **Journal of Apicultural Research**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2021.

LODESANI, M.; BALDUZZI, D.; GALLI, A. A study on spermatozoa viability over time in honey bee (*Apis mellifera ligustica*) queen spermathecae. **Journal of Apicultural Research**, v. 43, n. 1, p. 27–28, 2004.

MACKENSEN, O. Relation of Semen Volume to Success in Artificial Insemination of Queen Honey Bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 57, n. 4, p. 581–583, 1964.

MATTILA, H. R.; BURKE, K. M.; SEELEY, T. D. Genetic diversity within honeybee colonies increases signal production by waggle-dancing foragers. **Proc. R. Soc. B Sci**, v. 275, p. 809–816, 2008.

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

MCAFEE, A. et al. Honey bee queens are vulnerable to heat-induced loss of fertility. **Nature Sustainability**, v. 3, n. 5, p. 367–376, 2020b.

METORIMA, F. N. et al. Morphometric measurements of Africanized honeybee queens kept in an incubator or in queen banking. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 1, p.

91–96, 2015.

METZ, B. N.; TARPY, D. R. Reproductive Senescence in Drones of the Honey Bee. **Insects**, v. 10, n. 11, p. 17, 2019.

MUTINELLI, F. Euthanasia and welfare of managed honey bee colonies Euthanasia and welfare of managed honey bee colonies. **Journal of Apicultural Research**, p. 1–9, 2021.

NASCIMENTO, A. dos R. et al. **Panorama do Arranjo Produtivo Local de Apicultura do Vale do Rio dos Bois**. Goiânia: 2022.

NUNES, S. P.; HEINDRICKSON, M. The honey production chain in Brazil: analysis from southwest Paranaense. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 9, p. 16950–16967, 2019.

OLDROYD, B. P.; FEWELL, J. H. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 8, p. 408–413, 2007.

PAILLARD, M. et al. Apicultura e insetos sociais Preservação de sêmen de zangão doméstico (Hymenoptera : Apidae). v. 110, n. 4, p. 1412–1418, 2017.

PENG, C. Y.; YIN, C.; YIN, L. C Y R. . S. . special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. **Physiological Entomology**, v. 18, p. 93–101, 1993.

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. 1–10, 2016.

PRODELALOVÁ, J.; MOUTELÍKOVÁ, R.; TITERA, D. Multiple Virus Infections in Western Honeybee (*Apis mellifera* L.) Ejaculate Used for Instrumental Insemination. **viruses**, v. 11, n. 306, p. 1–8, 2019.

RANGEL, J.; KELLER, J. J.; TARPY, D. R. The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth. **Insectes Sociaux**, v. 60, p. 65–73, 2013.

RAULINO-DOMANSKI, F. et al. Optimized Histological Preparation of Ovary for Ovariole Counting in Optimized Histological Preparation of Ovary for Ovariole Counting in Africanized Honey Bee Queens (Hymenoptera : Apidae). **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 2, p. 1–4, 2019.

REMOLINA, S. C. et al. Senescence in the Worker Honey Bee *Apis mellifera* Silvia. **Journal insect Physiol**, v. 53, n. 10, p. 1027–1033, 2007.

RHODES, J. W. **Semen Production in Drone Honeybees**. v. 130. 2008.

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. 00, p. 1–10, 2015.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological Conservation**, v. 232, n. January 2019, p. 8–27, 2019.

SCHLÜNS, H. et al. Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. **ANIMAL BEHAVIOUR**, v. 70, p. 125–131, 2005.

SEEHUUS, S. C. et al. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. **PubMed / PNAS**, v. 103, n. 4, p. 962–967, 2006.

SHEHATA, S. M.; TOWNSEND, G. F.; SHUEL, R. W. Seasonal Physiological Changes in Queen and Worker Honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 20, n. 2, p. 69–78, 1981.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of the honeybee**. Nova York: Comstock Publish, 1956.

SOUZA, D. A. de et al. Experimental evaluation of the reproductive quality of Africanized queen bees (*Apis mellifera*) on the basis of body weight at emergence. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5382–5391, 2013.

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.

TARPY, D. R. et al. Assessing the Mating ' Health ' of Commercial Honey Bee Queens. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 1, p. 20–25, 2012.

TARPY, D. R.; HATCH, S.; FLETCHER, D. J. C. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. **ANIMAL BEHAVIOUR**, v. 59, p. 97–101, 2000.

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

TEAM, R. C. R: **A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2022.

THEMUDO, G. E. et al. Declining genetic diversity of European honeybees along the twentieth century. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

VANENGELSDORP, D. et al. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. **PLOS ONE**, v. 3, n. 12, p. 8–13, 2008.

VERMA, L. R. An Ionic Basis for a Possible Mechanism of Sperm Survival in The Spermatheca of the Queen Honey Bee (*Apis mellifera* L.). **Comparative**

Biochemistry and Physiology, v. 44, p. 1325–1331, 1973.

VERMA, L. R. Honeybee Spermatozoa and their Survival in the Queen's Spermatheca. **Bee World**, v. 55, n. 2, p. 53–61, 1974.

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

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.

WEIRICH, G. F.; COLLINS, A. M.; WILLIAMS, V. P. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 33, p. 3–14, 2002.

WERNER, M.; ZISSLER, D.; PESCHKE, K. Structure and energy pathways of spermatozoa of the rove beetle *Aleochara bilineata* (Coleoptera, Staphylinidae). **Tissue & Cell**, v. 31, n. 4, p. 413–420, 1999.

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

WITHROW, J. M.; TARPY, D. R. Cryptic “royal” subfamilies in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **PLOS ONE**, p. 1–11, 2018.

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

YANG, K. et al. A new design of bee cage for laboratory experiments: nutritional assessment of supplemental diets in honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 52, p. 418–431, 2021.

YÁNIZ, J. L. et al. CASA-Mot in mammals: an update. **Reproduction, Fertility and Development**, 2018.

YÁNIZ, J. L.; SILVESTRE, M. A.; SANTOLARIA, P. Sperm quality assessment in honey bee drones. **Biology**, v. 9, n. 7, p. 1–16, 2020.

ZAREIE, R. et al. Long-Term Survival of High Quality Sperm: Insights into the Sperm Proteome of the Honeybee *Apis mellifera*. **Journal of Proteome Research, Agricultural and Environmental Proteomics**, p. A-H, 2013.