

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

QUALIDADE ESPERMÁTICA DE ZANGÕES DE
Apis mellifera L. SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE
GELEIA REAL

Autora: Sandra Milena Diaz Puentes
Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

QUALIDADE ESPERMÁTICA DE ZANGÕES DE
Apis mellifera L. SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE
GELEIA REAL

Autora: Sandra Milena Diaz Puentes
Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo
Coorientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

D542q	<p>Diaz Puentes, Sandra Milena</p> <p>Qualidade espermática de zangões de <i>Apis mellifera</i> L. selecionados para produção de geleia real / Sandra Milena Diaz Puentes. -- Maringá, PR, 2020. 72 f.: il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo. Coorientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2020.</p> <p>1. Anormalidades espermáticas - Abelhas. 2. Marcador microssatélite - MRJP3. 3. Abelhas - Brasil. 4. Sêmen - Abelhas. 5. Genética - Abelhas. I. Toledo, Vagner de Alencar Arnaut de, orient. II. Moraes, Gentil Vanini de, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.</p>
-------	---

CDD 23.ed. 638.1



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

QUALIDADE ESPERMÁTICA DE ZANGÕES DE *APIS
MELLIFERA* L. SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE
GELEIA REAL

Autora: Sandra Milena Diaz Puentes
Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

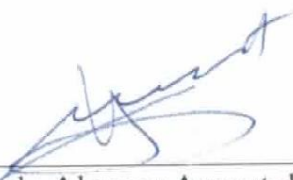
APROVADA em 20 de fevereiro de 2020.



Prof.^a Dr.^a Maria Claudia Colla
Ruvolo Takasusuki



Prof. Dr. Jorge Euclides Tello
Durán



Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo
Orientador

“Somos todos visitantes deste tempo, deste lugar, estamos só de passagem. Nosso objetivo é observar, aprender, crescer e amar... e depois vamos para casa.”

Provérbio aborígene

À minha família, especialmente ao meu pai, **Victor Julio Diaz Valbuena**, à minha mãe, **Ana Elizabeth Puentes Puentes**, e à minha irmã, **Imelda Diaz Puentes**, pela confiança, apoio constante e infinito amor que sempre me oferecem.

A todos os zangões e abelhas que deram a sua luz para brilhar neste trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos concedida durante todo período de estudo.

À **Universidade Estadual de Maringá**, especialmente ao **Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPZ)**, todos e cada um dos docentes que brindaram seus conhecimentos na minha formação, tanto profissional como pessoal.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo**, por toda a confiança depositada em mim na realização do experimento, por oferecer seus conhecimentos no mágico mundo apícola, e por fazer de seu lar o nosso.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes**, por tirar minhas dúvidas da melhor forma possível.

Ao **Brasil**, por acolher-me e mostrar-me uma cultura maravilhosa e diversa.

A **José Washington Santos Oliveira**, por ser essa pessoa magnífica que conseguiu me aguentar o tempo todo, palavras nunca serão suficientes para lhe agradecer por ter sido fundamental nesta etapa e expressar o quão importante você se tornou em minha vida. E não esqueça que você será sempre meu “perfeito imperfeito”.

Ao pessoal dos laboratórios de **Genética e melhoramento animal, Cultura de tecidos e eletroforese de vegetais e Métodos quantitativos aplicados à zootecnia**, tanto a

equipe técnica como estudantes e docentes. Especialmente, à **MSc. Francieli das Chagas** e às professoras: **Dr.^a Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki** e **Dr.^a Claudete Aparecida Mangolin**.

À **Maria Carolina Paleari de Oliveira** e **Eleven**, pela sua força e amizade, por me permitirem fazer parte de seu lar.

A **Vicente Alfonso Diaz Avila** e **Jesus Alberto Cardozo Osório**, pelo apoio, ajuda, conselhos e amizade forjada nesses anos fora de casa, mantendo o espírito Colombiano.

A **Douglas Galhardo**, **Cibele Regina Schneider**, **Cinthia Leão Figueira**, pela amizade, paciência, conselhos e apoio (e à **Cibele** pelas maravilhosas sobremesas).

À **Jessica Carolina Camargo López**, por ter compartilhado dessa aventura, foram muitas as vivências e os aprendizados que ficaram na minha vida.

Ao grupo de pesquisas em abelhas **GPBee**, pela acolhida inicial no Brasil, especialmente, a **Tuan Henrique Smielewski**, **Claudio Junior Silva**, **Jose Elton Melo**, **Priscila Wielewski**, **Pedro da Rosa Santos**, **Joyce Cristina Paiva Francisco**, **Lucilene Mattos**, obrigada pela paciência.

Aos meus amigos: **Clara Jenny López Londoño**, **Daniel Mauricio Prieto Reyes**, **Laura Milena Ramirez Soler**, **Leidy Catherine Triana Gutierrez**, **Jairo Andrés Santana León**, **Jorge Armando Guevara Rodriguez**, **Jaidy Tovar Molina**, **Giovanni Andres Vargas Bautista**, **Yanina Loreto Muñoz Silva**, que confirmam que a verdadeira amizade não tem limites; seu apoio foi muito importante.

A todas as pessoas que não estão na lista, mas que foram parte fundamental neste processo, direta ou indiretamente, são muitas as experiências maravilhosas, levo muitas lembranças comigo e desejo sucesso a cada um de vocês.

BIOGRAFIA

SANDRA MILENA DIAZ PUENTES, filha de Victor Julio Diaz Valbuena e Ana Elizabeth Puentes Puentes, nasceu no município de Tenjo - Cundinamarca, Colômbia, no dia 13 de abril de 1989. Estudou o ensino fundamental no Instituto Departamental Ricardo González em Subachoque - Cundinamarca. Formou-se como Auxiliar de enfermeira na Fundación de Estudio Empresarial (FEE) no ano de 2007. Trabalhou durante o período de 2006 a 2016 (aos finais de semana, feriados e férias) no restaurante campestre La Huertana, no qual participou de cursos com foco em atendimento ao cliente, mesa e bar, colaborando em diversos cargos até chegar ao cargo de auxiliar administrativa. Trabalhou na Fundação Planeta Amor durante o período de junho a novembro de 2011 como acompanhante médica. No ano de 2018, formou-se como zootecnista na Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá. Após formada, realizou dois estágios em apicultura, o primeiro, como apoio técnico na Fundação Crecer em Paz no município de El Carmen de Bolívar com duração de cinco meses, e o segundo, na Universidade Estadual de Maringá, como apoio no setor de apicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi. Ingressou, no ano 2018, na Universidade Estadual de Maringá no programa de pós-graduação em Zootecnia, na área de produção animal-apicultura, no curso de pós-graduação a nível de Mestrado. No dia 20 de fevereiro de 2020, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I-INTRODUÇÃO	2
1.Zangão	2
1.1.1 Condições para criação e manutenção de zangões	2
1.1.2 Aparelho reprodutor dos zangões	3
1.1.3. Sêmen	5
1.1.4. Hormônios	7
2. Geleia real.....	8
Referências	122
II-QUALIDADE ESPERMÁTICA DE ZANGÕES DE <i>Apis mellifera</i> L. SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE GELEIA REAL	199
Resumo	199
Abstract.....	199

Introdução.....	2020
Material e métodos	222
Resultados.....	266
Discussão.....	344
Referências	377
III-APÊNDICE	4040
Protocolo extração de DNA de <i>Apis mellifera</i> L.....	43
Normas da revista	455

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Estimativas dos parâmetros do modelo ajustado.....	29
Tabela 2. Expressões e estimativas da chance de ocorrência da categoria de resposta j em relação à categoria r, $p_j(x)/p_r(x)$, $j=1,2,3,4$ e $r=5$	30
Tabela 3. Estimativas do modelo de regressão logística	32
Tabela 4. Estimativas do modelo de regressão logística quanto a mortalidade.....	32
Tabela 5. Valores médios das variáveis em geral em estudo.....	33
Tabela 6. Valores médios das variáveis por tratamento.....	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
Introdução	
Figura 1. Órgãos reprodutivos do zangão (A : Testículos; B : Dutos ejaculatórios; C : Pênis; D : Glândulas acessórias ou de muco; E : Vasos deferentes; F : Vesículas seminais; G : Bolsas basais do pênis; H : Câmara de paredes finas; I : Lobo duplo pinado; J : Bulbo do pênis e K : Placas quitinosas (Snodgrass et al. 2015b).....	4
Artigo	
Figura 1. Alelos de produção de geleia real identificados nas colônias matrizes da FEI.....	23
Figura 2. Peso em mg dos zangões maduros, com média de 196,6 e 187,8 mg para alelos EF e EG (baixa produção de geleia real) e para alelos DE e EE (alta produção de geleia real), respectivamente, valor-p= 0,016.....	27
Figura 3. Volume de sêmen produzido por zangões, média de 1,21µL para alelos EF e EG de baixa produção de geleia real, e de 1,20µL para alelos DE e EE para alta produção de geleia real, valor-p= 0,96.....	28
Figura 4. Grau de turbilhonamento considerando a genética dos zangões. A cor representa cada categoria de turbilhonamento, dada pela proporção exibida pelo sêmen de ondas altas com base estreita. 1:<10%; 2 entre 20 e 40%; 3: entre 45 e 75%; 4: entre 75 e 80% e 5: >90%.....	29
Figura 5. Número de espermatozoides vivos para cada tratamento, alelos EF e EG (menor produção de geleia real) com média de 176, 10 e alelos DE e EE (alta produção de geleia real) com média 177, 40, valor-p= 0,79.....	31
Figura 6. Anormalidades dos espermatozoides de <i>Apis mellifera</i> L. A : Padrão mais comum. B : Cabeça solta; C : Cauda solta; D : Cauda bifurcada; E : Cauda com estrutura alterada; F :Cauda em saca-rolha; G1-G2-G3 : Caudas enroladas.....	34

Apêndice

	Página
Figura 1. Géis de eletroforese para identificar alelos da MRJP3 presentes em colônias matrizes de <i>Apis mellifera</i> L.....	41
Figura 2. Espermatozoides mortos corados com eosina-nigrosina.....	41
Figura 3. Espermatozoides vivos sem corar com eosina-nigrosina.....	42
Figura 4. Espermatozoides corados com Rosa de Bengala 3%, para identificar anomalias.....	42
Figura 5. Turbilhonamento do sêmen de zangão (A : Categoria 5; B : Categoria 4; C : Categoria 3 e D :Categoria 1.....	42

RESUMO

Qualidade espermática de zangões de *Apis mellifera* L. selecionados para produção de geleia real

A geleia real é de ampla importância dentro da colônia para alimentação da rainha e das larvas, e, em zangões, ajuda na regulação de hormônios sexuais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características reprodutivas dos zangões de colônias que apresentam dois alelos para maior produção de geleia real em relação às colônias com pelo menos um alelo de menor produção. Em um estudo conduzido em 18 colônias de *Apis mellifera* L. localizadas em Maringá, PR, e mediante análises moleculares utilizando microsatélite de MRJP3, foi avaliada a presença dos alelos C, D e E, para maior produção de geleia real, e dos alelos A, B, F e G para baixa produção de geleia real. Com base nos resultados, foram conduzidas as criações de zangões de seis colônias selecionadas, sendo três delas com a presença de alelos de maior produção de geleia real (DE e EE) e três com um alelo de menor produção (EF e EG); ainda, foi realizada a avaliação da qualidade do sêmen e o peso de cada um dos zangões. As colônias que apresentaram os alelos DE e EE tiveram uma maior produção de zangões, mas com pesos menores em relação às colônias que apresentaram alelos EF e EG. No entanto, não foi observada a interferência dos alelos sobre a qualidade espermática do zangão, em que a média das variáveis foi: sobrevivência 88,38%, volume 1,2 μ L, turbilhonamento em massa cinco, e as principais anormalidades dos espermatozoides foram cauda dobrada, cabeça solta, cauda solta e cauda bifurcada. Os alelos de maior produção de geleia real influenciaram o peso e a quantidade de zangões criados nas colônias de *A. mellifera*, mas não a qualidade espermática. **Palavras-chave:** Anormalidades espermáticas, Brasil, genética, MRJP3, sêmen, turbilhonamento.

ABSTRACT

Sperm quality of *Apis mellifera* L. drones selected for royal jelly production

Royal jelly is of great importance within the colony to feed the queen and as larvae, and in drones, it helps in the regulation of sex hormones. This research was carried out to evaluate as reproductive resources of colony drones that presented two alleles for greater production of royal jelly concerning colonies with less than one lesser allele. Through molecular analysis using MRJP3 microsatellite, the presence of alleles C, D and E were evaluated for greater production of royal jelly, and alleles A, B, F and G for low production of royal jelly in 18 colonies of *Apis mellifera* L. located in Maringá, PR. Drones were reared from six selected colonies, three with the presence of alleles of greater production of royal jelly (DE and EE) and three with an allele of less production (EF and EG), and the evaluation of the semen quality and the weight of each one was evaluated. The colonies that presented the DE and EE alleles had a higher production of drones, but with lower weights concerning the colonies that presented EF and EG alleles. As the colonies that exhibited alleles for greater production of royal jelly, there was a greater production of drones, but with lower weights about the colonies that presented alleles of royal jelly lower production. However, no allele interference was observed on the sperm quality of the drone, with an average of the following variables: 88.38%, volume 1.2 μ L, mass swirling five and main abnormalities of the spermatozoa were bent tail, headless, tailless sperm, and bifurcated tail. The alleles of greater production of royal jelly influence the weight and number of drones reared in the colonies of *A. mellifera*, but not in the sperm quality.

Keywords: Brazil, genetics, mass motility, *MRJP3*, semen, sperm abnormalities.

I – INTRODUÇÃO

1. Zangão

As abelhas apresentam um dimorfismo sexual, com os zangões sendo maiores que as fêmeas, e principalmente nos órgãos sensoriais ligados ao acasalamento, como olhos e as antenas (Snodgrass et al. 2015a). As últimas, constituídas por sensilas, que são estruturas que variam em morfologia e função, sendo as placoides relacionadas ao olfato (Ochieng et al. 2000). O sistema olfativo dos machos é maior, com antenas mais longas e com sete vezes mais sensilas placoides do que as fêmeas (Kelber et al. 2006). Além disso, existem também diferenças entre os glomérulos contidos nos lóbulos das antenas e o número de arranjos dos macroglomérulos entre machos das diferentes espécies de abelhas com menor quantidade em *Apis mellifera* e maior em *Apis cerana* (Bastin et al. 2018).

Quando a origem dos ovos de zangões é a postura realizada por uma operária, estes são mais suscetíveis à umidade do que aqueles que são da rainha, além disso, os ovos da rainha geram zangões com peso maior e com melhor qualidade de sêmen (Wegener et al. 2010, Gençer e Kahya 2011). Por outro lado, zangões emergidos de ovos fertilizados (diploides) são consumidos pelas operárias (Koeniger et al. 2014), condição que permite limitar o desenvolvimento de machos diploides com anomalia genética.

Dada sua morfologia e qualidade espermática, a principal função do zangão é a reprodução, no entanto, sua condição e capacidade são muito importantes e podem ser afetadas por vários fatores (Koeniger et al. 2014). Inicialmente, o peso dos zangões está condicionado pela presença de alimento disponível para as larvas, especialmente quando em um estado avançado de desenvolvimento (Szentgyörgyi et al. 2017). Quando o macho é

desenvolvido a partir de ovos diploides ou haploides, os primeiros levam a obtenção de valores mais elevados e são maiores em tamanho (Koeniger et al. 2014).

O peso apresenta uma correlação positiva com o tamanho das asas (Szentgyörgyi et al. 2017). A asa direita dos zangões é maior que a esquerda, o que gera uma assimetria entre elas (Szentgyörgyi et al. 2017), além da morfologia das asas, a idade também é um fator que influencia o peso dos zangões, tendo uma relação inversamente proporcional (Mazeed e Mohanny 2010). Em termos de longevidade, a média dos zangões é de 29,9 dias, com uma variação entre 7 e 54 dias (Rueppell et al. 2005).

As abelhas são protândricas, caracterizadas por um desenvolvimento dos órgãos reprodutivos primeiro nos machos e depois nas fêmeas (Page 1981). Os zangões emergem primeiro que as rainhas, e o pico de produção de machos acontece 30 dias antes de enxamear, sincronizado com o momento em que há maior quantidade de rainhas prontas para acasalar (Page 1981). O número de zangões produzidos em uma colônia é, em média, de 2.400 zangões, número que vai reduzindo à medida em que ocorre a enxameação (Lee e Winston 1987).

1.1.1 Condições para criação e manutenção de zangões

A capacidade de uma colônia para criar e manter uma população de zangões depende de inúmeros fatores, o primeiro é a presença de alimento, que pode variar de acordo com a época do ano, sendo assim, a colônia depende do fluxo contínuo de entrada de pólen (Boes 2010). Se a quantidade de pólen diminui, os zangões adultos são expulsos da colônia, e as larvas que dariam origem a eles são consumidas pelas operárias (Wharton et al. 2008).

Diariamente, as larvas de zangões têm uma exigência de proteína que varia entre 65,0 e 98,2mg/larva, enquanto as operárias consomem entre 25,0 a 37,5mg (Hrassnigg e Crailsheim 2005, Mandla e Kumar 2016). A partir do terceiro até o sétimo dia de vida, a quantidade de alimento para as larvas de zangões aumenta, e é nesse período que o alvéolo é operculado (Hrassnigg e Crailsheim 2005). Os zangões adultos são alimentados pelas operárias até o sétimo dia de vida e, em seguida, eles buscam os favos de alimento e conseguem se alimentar sozinhos (Hrassnigg e Crailsheim 2005, Goins e Schneider 2013).

A disponibilidade do pólen está relacionada positivamente com o peso do zangão, a facilidade de ejacular, o volume e a viabilidade do sêmen e, em menor medida, está ligada

também ao número de zangões criados e à concentração de espermatozoides (Czekońska et al. 2015, Rousseau e Giovenazzo 2016). Portanto, a facilidade de ejacular e a qualidade do sêmen são potencializadas quando se oferta suplementação proteica à colônia (Rousseau e Giovenazzo 2016).

O segundo fator relacionado a capacidade da colônia é o tamanho da população, devido à exigência de um número suficiente de operárias, tanto para coletar o pólen quanto para a alimentação dos zangões (Free e Williams 1975). Para manter esse equilíbrio de indivíduos dentro da colônia, as pupas de zangões representam menos de 20% quando comparados ao número das pupas de operárias (Free e Williams 1975, Rowland e McLellan 1987). O terceiro fator que influencia a capacidade da colônia é o número de alvéolos de zangões presentes na colônia. Deste modo, as colônias que ainda não possuem alvéolos, irão construí-los em maior quantidade quando comparadas as colônias que já têm alvéolos construídos (Free e Williams 1975).

A presença da rainha é o quarto fator que influencia na manutenção da colônia, pois se a colônia perde a rainha, as operárias vão permitir que os zangões permaneçam ali por mais tempo como uma estratégia para manter a sua genética (Free e Williams 1975). O quinto fator é a salubridade da colônia, pois quanto maior a presença de doenças ou ácaros, como *Varroa destructor*, menor será a qualidade do zangão e de seu sêmen (Duay et al. 2002). O último fator, tão determinante quanto os demais, são os agrotóxicos, que afetam o desenvolvimento normal de machos, gerando um menor valor adaptativo quando comparados àqueles que não foram expostos ao agrotóxico (Rangel e Fisher 2019).

1.1.2 Aparelho reprodutor dos zangões

Os órgãos reprodutivos do zangão consistem em: testículos, vasos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias ou de muco, e o órgão copulatório ou pênis (**Figura 1**). Os testículos se desenvolvem na pupa e cada um consiste em vários túbulos pequenos que formam os espermatozoides e os conduzem até os vasos deferentes (Snodgrass et al. 2015b). Os testículos são maiores durante o estado de pupa e, com o aumento da idade, o tamanho dos testículos diminui devido à migração dos espermatozoides dos mesmos às vesículas seminais (Mazeed e Mohanny 2010, Snodgrass et al. 2015b, Metz e Tarpy 2019).

Os vasos deferentes são a continuação do epitélio externo dos testículos, e servem para conectar os mesmos com as vesículas seminais, encarregadas de armazenar os espermatozoides depois do primeiro dia de emergência do zangão (Snodgrass et al. 2015b). As glândulas do muco apresentam um tecido muscular de três capas, e células glandulares que permitem a secreção do muco, o qual evita a saída dos espermatozoides da rainha após acasalamento (Woyke 2011). O órgão copulatório é composto de três partes: dutos ejaculatórios, bulbo e o tubo do pênis que, em conjunto, encontram-se invaginados na cavidade abdominal do zangão (Snodgrass et al. 2015a).

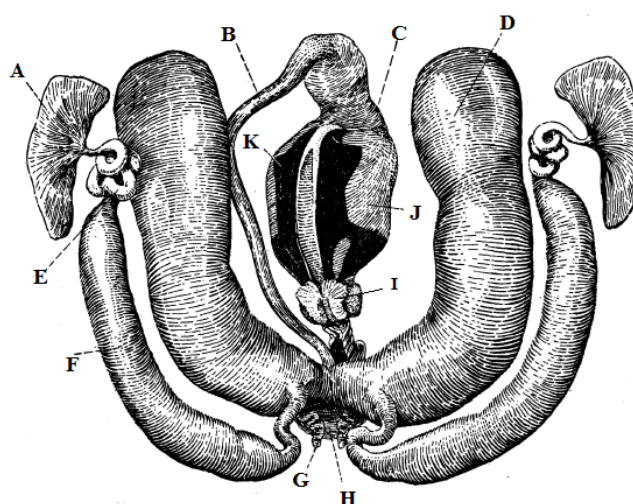


Figura 1. Órgãos reprodutivos do zangão (A: Testículos; B: Dutos ejaculatórios; C: Pênis; D: Glândulas acessórias ou de muco; E: Vasos deferentes; F: Vesículas seminais; G: Bolsas basais do pênis; H: Câmara de paredes finas; I: Lobo duplo pinado; J: Bulbo do pênis e K: Placas quitinosas (Snodgrass et al. 2015b).

A eversão do endofalo ocorre pela pressão que a musculatura abdominal gera ao empurrar a hemolinfa para trás (Woyke e Ruttner 1978). No acasalamento natural, a ejaculação ocorre a partir do bulbo sem everter, o que faz com que o tórax e a cabeça do zangão fiquem paralisados e o abdômen continue ativo (Woyke e Ruttner 1978). São três as substâncias ejetadas pelo macho: o muco de cor branca, o sêmen de cor creme e uma substância X que são fragmentos da membrana epitelial, de cor transparente e que representa 1/3 do volume total (Woyke 2010). O zangão deixa um sinal de acasalamento, mas a rainha pode ter mais de um e, a capacidade de tirar o sinal de acasalamento será o

regulador da idade de início de postura, indiretamente, determinado pelo zangão (Woyke 2011).

1.1.3. Sêmen

O sêmen é um conjunto de secreções das glândulas reprodutivas, composto pelos espermatozoides e pelo plasma seminal (Setchell 2014). A proporção de plasma seminal e espermatozoides é em torno de 1:1 ou 1:2, dependendo da época do ano (Novak et al. 1960). No plasma seminal e nos espermatozoides existem 15 aminoácidos livres e ligados, sendo que a maior parte deles se encontra nos espermatozoides (Novak et al. 1960). As maiores quantidades de aminoácidos são representadas pela arginina, pela lisina, pela leucina e pelo ácido glutâmico, e as menores partes por treonina, por triptofano e por metionina (Novak et al. 1960).

No líquido seminal e nas vesículas seminais de *Apis mellifera* também se encontram 69 proteínas, das quais 36 são únicas das vesículas seminais e 15 do sêmen (Collins et al. 2006). Essas proteínas ajudam a manter a viabilidade dos espermatozoides e seu conteúdo difere entre testículos, vesículas seminais e glândulas do muco, variando também com a idade do zangão (King et al. 2011, Matsushima et al. 2019).

Com o aumento da idade do zangão o sêmen torna-se mais viscoso e muda de cor creme claro para escuro, o volume diminui e a viabilidade aumenta (Locke e Peng 1993, Czekońska et al. 2013). Zangões entre 10–21 dias são considerados mais adequados para a inseminação instrumental e natural, devido à melhor qualidade de seu sêmen (Koeniger et al. 2014). A temperatura ambiental é um fator determinante na qualidade do sêmen do zangão, sendo a ideal entre 30 a 35 °C, uma vez que as altas e as baixas temperaturas diminuem a concentração de espermatozoides e aumentam a mortalidade (Bieńkowska et al. 2011, Wegener et al. 2012).

Outro fator que afeta o sêmen é a contaminação por bactérias, pois ele é altamente suscetível às bactérias, sendo as mais comuns os bacilos e os estafilococos (Andere et al. 2011). Outros fatores como o de armazenamento longo, o tipo de diluente utilizado para diluir, variações na flora apícola, e uso de agrotóxicos afetam negativamente a viabilidade (Locke e Peng 1993, Taylor et al. 2009, Fisher et al. 2018).

A contaminação do sêmen pode dar-se pela epiderme humana ou pela presença de conteúdo gástrico na eversão manual (Locke e Peng 1993, Andere et al. 2011). Para diminuir a contaminação, pode-se lavar o sêmen, permitindo incrementar em um 15% a viabilidade, mas isso ocasiona atraso no início da postura da rainha, possivelmente, pela retirada de algum feromônio que o zangão transmite (Collins 2004).

A qualidade do sêmen é avaliada pela viabilidade, motilidade espermática, morfologia, volume e concentração dos espermatozoides (CBRA 2013) que são células que transportam o material genético (Chenoweth e Lorton 2014). A estrutura do espermatozoide de zangão é constituída pela cabeça com acrossoma, fina e alongada e pela cauda filamentosa contendo as mitocôndrias (Pen et al. 1993). Diferindo dos espermatozoides de mamíferos, que contêm cabeça e acrossoma, peça intermediária com mitocôndrias, cauda principal e cauda terminal (Chenoweth e Lorton 2014).

A morfologia do espermatozoide consiste em uma cauda com duas derivações mitocondriais, um axon, e corpos acessórios em forma triangular, destacando que a cauda é afetada pelo tempo, que faz com que esta diminua de tamanho, mas não é afetada pelo tipo de corante usado (Lino-Neto et al. 2000, Gontarz et al. 2016). O espermatozoide está coberto por duas membranas: a externa, denominada plasmática, que envolve a totalidade do espermatozoide e a que recobre o acrossomo denominada membrana acrossomal (Baccetti 1972).

Essas membranas são compostas por carboidratos, proteínas e lipídios, os quais têm as funções de proteger o conteúdo genético e fornecer as condições para que ocorra a fusão com o óvulo (Baccetti 1972, Wolf et al. 1990). Condições que são determinadas, principalmente, pela interação entre as proteínas e os fosfolipídios das membranas, os quais geram interações para manter as funções celulares (Curry et al. 2000, Pintado et al. 2000).

A viabilidade dos espermatozoides varia entre 60-98%, e é afetada pela idade dos zangões, pela quantidade de alimento, temperatura ambiental e pelo tipo de coleta feita no momento de avaliar (Locke e Peng 1993, Collins 2004, Taylor et al. 2009, Gençer e Kahya 2011, Czekońska et al. 2013, Rousseau et al. 2015, Metz e Tarpay 2019). A viabilidade está altamente correlacionada com a concentração espermática e, em geral, não varia se os zangões são filhos de rainha ou de operária ou da subespécie de *Apis*, mas é afetada quando as avaliações são feitas individual ou grupalmente (Collins 2004, Gençer e Kahya 2011).

O movimento realizado pelos espermatozoides é chamado de motilidade massal, ele é determinado pelo vigor individual e pela motilidade progressiva, que é suprimida pelos cátions de Na^+ e K^+ , enquanto a adição de arginina e lisina prolongam o período de motilidade (Verma 1978, Chenoweth e Lorton 2014). A motilidade massal é influenciada pelo tempo de avaliação, o qual pode ser prolongado com uso de catalase, que evita a rápida oxidação do sêmen porque ajuda a decompor o peróxido de hidrogênio produzido pela desaminação oxidativa dos aminoácidos (Verma 1978, Chenoweth e Lorton 2014).

Pesquisas no macho e na rainha têm sido desenvolvidas a fim de compreender o mecanismo pelo qual os espermatozoides conseguem sobreviver por longos períodos na espermateca da rainha. (Gessner e Gessner 1976, Verma 1978). Os cátions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} são mais concentrados nos espermatozoides do que no sêmen, plasma seminal e na hemolinfa dos zangões (Verma 1978). Contudo, na rainha, o Na^+ e o K^+ são mais concentrados na espermateca do que na hemolinfa e, juntos, atuam como inibidores reversíveis da motilidade espermática (Verma 1978). O potássio alcalino ajuda a manter os espermatozoides vivos por longos períodos (Gessner e Gessner 1976).

A espermateca, além dos cátions, contém uma concentração de proteínas de 29 kDa, o que favorece, possivelmente, a motilidade e o armazenamento do sêmen (Klenk et al. 2004). Uma adaptação dos espermatozoides para se manter na espermateca é a utilização do ciclo das pentoses como uma alternativa do metabolismo da glicose (Kraft et al. 1978).

1.1.4. Hormônios

O conteúdo de dopamina e os seus três genes receptores de *Amdop 1*, *Amdop 2* e *Amdop 3* aumentam no cérebro de zangões entre os dias quatro e oito após a emergência (Sasaki et al. 2012). O gene *Amdop 1*, a dopamina e o hormônio juvenil regulam o comportamento reprodutivo dos zangões, uma herança das abelhas primitivas. O hormônio juvenil aumenta de acordo com o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos e, se for possível administrar esse hormônio nos zangões, a maturação pode ser acelerada (Sasaki et al. 2012, Matsushima et al. 2019).

Os níveis de dopamina são influenciados pela idade, pela colônia e pela geleia real, podendo ser aumentados aos oito dias de vida em zangões alimentados com tirosina (Sasaki 2016). Os receptores de dopamina são secretados no cérebro com níveis mais elevados do

que nos órgãos reprodutivos, destacando-se maiores valores nas vesículas seminais quando comparadas aos testículos e glândulas secretoras de muco (Sasaki 2016).

A locomoção e voo de zangões são influenciados pela idade, isso porque, em consequência da elevada expressão dos receptores *Amdop 1*, *Amdop 2* e *Amdop 3*, os níveis de dopamina aumentam na hemolinfa nos dias cinco a sete de vida (Akasaka et al. 2010). Esses fatores podem contribuir para o início do voo de acasalamento, sendo este mantido até os doze dias de vida pelo *Amdop 3* (Sasaki et al. 2012, Mezawa et al. 2013). A mortalidade dos zangões aumenta exponencialmente com o voo, o qual inicia, em média, aos onze dias de vida (Rueppell et al. 2005).

O período de voo de quatro espécies de Apis - *A. florea*, *A. andreniformes*, *A. cerana* e *A. dorsata* - é realizado em diferentes horários ao longo do dia, o que permite um tipo de isolamento reprodutivo entre as espécies (Rinderer et al. 1993). Os zangões, durante o voo, carregam néctar em concentrações elevadas de açúcar a 71,6%, como alimento para os voos de acasalamento (Hayashi et al. 2016).

2. Geleia real

A base de uma colônia de abelhas é a rainha, e ela é o resultado de uma nutrição diferenciada na qual a geleia real é a substância imprescindível como fonte de alimento (Haydak 1970). Para que uma larva de operária se transforme em uma rainha, a mesma deve ser alimentada exclusivamente com geleia real em todo o período de desenvolvimento larval e essa informação nutricional será transportada pela via de sinalização da insulina (Lensky e Rakover 1983, Wheeler et al. 2006, Kamakura 2011, Fujita et al. 2013). A rainha mantém uma dieta de geleia ao longo de toda sua vida, sobrevivendo por anos, enquanto as operárias vivem alguns dias ou meses, dependendo da época do ano (Detienne et al. 2014).

A geleia real é composta entre 60-70% de água e 12-15% de proteínas, além de conter açúcares (frutose, sacarose, glicose), ácidos graxos (10-hidroxidecanóico e 10-hidroxi-2-decanóico), minerais, entre outros (Šimúth 2001, Kausar e More 2019). A geleia real é produzida nas glândulas mandibulares e hipofaríngeas de abelhas com uma idade entre 5-14 dias (Lensky e Rakover 1983). As glândulas mandibulares secretam uma substância branca leitosa e as hipofaríngeas uma substância transparente, as quais estão numa

proporção de 1:1, e juntas se caracterizam pela cor branco-creme, com uma textura viscosa, odor azedo e gosto doce (Haydak 1970, Lensky e Rakover 1983, Kausar e More 2019).

De maneira natural, a atividade das glândulas diminui com a idade e, na medida que a abelha se torna mais velha, ela passa a produzir invertase, uma enzima utilizada na produção de mel, isso se dá devido à mudança do trabalho da operária de nutriz para forrageira (Huang e Otis 1989). A exposição da colônia aos agrotóxicos, parasitas e disponibilidade de alimento afetam o tamanho das glândulas hipofaríngeas e a composição da geleia real (Huang e Otis 1989, Desevin e Billen 2005, Ji et al. 2014, Yousef et al. 2014, Ayoub et al. 2015, Wu et al. 2015, Smet et al. 2017, Dobritsch et al. 2019). O principal fator da síntese da geleia real são as proteínas ribossômicas, que regulam a atividade secretora das glândulas hipofaríngeas (Han et al. 2019).

Por outro lado, a espécie de abelha também interfere nas características das glândulas hipofaríngeas, devido à adaptação de subespécies de abelhas ao ambiente em que vivem, o que inclui mudanças nas exigências nutricionais de cada uma delas (Albert et al. 1999, Qu et al. 2008). Essas mudanças causam uma variação na capacidade de produção da geleia, relacionada ao desenvolvimento de melhores estruturas no citoesqueleto e na morfologia dos ácinos das células das glândulas hipofaríngeas (Baitala et al. 2010, Parpinelli et al. 2014, Han et al. 2019). O que mostra a diferença é a identificação da expressão de alelos da proteína de maior produção de geleia real (MRJP3), os quais podem variar em algumas subespécies (Ostroverkhova et al. 2018).

Dentre as proteínas produzidas pelas abelhas, e que estão na geleia real, pode-se destacar dois tipos: as proteínas menores e peptídeos e o grupo das proteínas principais da geleia real conhecidas como MRJPs (*Major Royal Jelly Proteins*), as quais estão presentes em maior quantidade e apresentam uma massa molecular entre 49 e 87 kDa (Fujiwara et al. 1990, Bíliková et al. 2002). Em conjunto, as abelhas utilizam essas proteínas em processos enzimáticos, nutritivos, atividades fisiológicas e como proteção sanitária da colônia (Šimúth et al. 2004, Cruz et al. 2011).

Os peptídeos são pequenas sequências de aminoácidos com alta atividade antibacteriana, e três deles já foram identificados: Royalisina, Jelleinas e Apisimina (Fujiwara et al. 1990, Bíliková et al. 2002, Fontana et al. 2004). As Jelleinas são divididas em quatro peptídeos, os quais apresentam algumas sequências hidrofóbicas e possuem

função antibacteriana, com exceção da Jelleina IV e, em conjunto com a Royalisina, esses são utilizados nas colônias para a proteção contra microrganismos (Fontana et al. 2004). Por sua vez, dos 54 aminoácidos que compõem o Apisimina, os mais abundantes são a serina e a valina. No total, o peso molecular é de 5540,4 Da, dentro dos quais está presente a albumina, a qual, possivelmente, ajuda no processo de diferenciação celular (Bíliková et al. 2002).

Ademais, as MRJPs são um grupo de proteínas que se dividem em nove, nomeadas MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5, MRJP6, MRJP7, MRJP8 e MRJP9 (Schmitzová et al 1998). Variedade que se deve a quantidade de aminoácidos que varia entre 39,3 e 51,4%, com peso molecular entre 45,06 e 420 kDa (Ramanathan et al. 2018). As MRJPs são expressas, principalmente, na cabeça dos indivíduos da colônia, sendo os zangões e as rainhas com menor expressão pela ausência das glândulas que produzem a geleia real (Buttstedt et al. 2013).

A MRJP3 é utilizada para a seleção de colônias visando a melhora na produção, isso porque ela está com um aumento na produtividade de geleia real (Baitala et al. 2010, Ostroverkhova et al. 2018a, Ostroverkhova et al. 2018b). Sua característica de ampla variedade de regiões repetitivas permite usá-la como marcador molecular em *Apis mellifera* (Schmitzová et al, 1998; Baitala et al 2010).

A massa molecular aparente da MRJP3 é entre 60 e 70 kDa, contêm 20 aminoácidos essenciais, principalmente, Asparagina:15,9%, ácido aspártico:7,5% e glutamina:7,1% (Schmitzová et al 1998). A MRJP3 possui uma alta variabilidade de comprimento, apresentado pelo polimorfismo de uma região com um número variável de repetição em tandem (VNTR), localizada na parte terminal C da região de codificação da MRJP3 (Schmitzová et al 1998).

Baitala et al. (2010), trabalhando microssatélite de MRJP3 como marcador molecular em abelhas africanizadas (*A. mellifera*) identificaram sete alelos: A (410 bp), B (460 bp), C (480 bp), D (510 bp), E (530 bp), F (580 bp) e G (610 bp). Desses alelos, o C, D e E, estão relacionados a colônias com maior produção de geleia real, alelos que são mantidos e apresentam-se com alta frequência ao longo do tempo nas colônias que produzem maior quantidade de geleia real (Parpinelli et al 2014). No entanto, Niel et al. (2017) identificaram

a relação entre a alta produtividade de geleia e 369 genes de expressão diferenciada, que estão envolvidos em 46 rotas metabólicas para a síntese da geleia real.

A MRJP3 apresenta uma atividade anti alérgica, anti-inflamatória e acelera a resposta imune, e nas regiões repetitivas de sua sequência genética, tem variação entre subespécies de *Apis* (Sano et al. 2004, Qu et al. 2008, Shinkhede 2009). Em *Apis dorsata*, sua sequência é maior do que em *Apis mellifera* (Shinkhede 2009). Entre abelhas chinesas (*A. cerana*), europeias (*A. mellifera*) e africanizadas, a expressão das proteínas varia, sendo essas mais heterogêneas nas abelhas europeias, enquanto as africanizadas e as chinesas apresentam menos polimorfismos (Sano et al. 2004, Qu et al. 2008). Outra diferença é o número de alelos que se apresentam, no caso das *A. mellifera* a expressão é cinco e as *A. cerana*, de dois a três (Qu et al. 2008, Shinkhede 2009).

Devido as características que possui, a geleia real é um produto de grande uso na indústria farmacêutica e na cosmetologia (Ramanathan et al. 2018), o que faz com que ela se torne um objetivo de pesquisa para o desenvolvimento de medicamentos, dado suas características anti patógenos, microbianos e bactericidas, como antioxidante, modulador da resposta imune, que pode diminuir os níveis de colesterol, e auxiliar no tratamento da hipertensão (Cemek et al. 2010, Kashima et al. 2014, Fan et al. 2016, Fratini et al. 2016, Vezetu et al. 2017).

Assim sendo, para atingir a demanda gerada a partir da descoberta das suas propriedades, o melhoramento genético de colônias de *Apis mellifera* é um passo importante para incrementar a produtividade das colônias, visando atingir as necessidades do mercado (Ruvolo-Takasusuki et al. 2016, Altaye et al. 2019, Cao et al. 2016). A China, o atual primeiro exportador de geleia real, é um exemplo disso. Com o desenvolvimento de programas de melhoramento genético de *Apis mellifera ligustica* desde os anos 80, a China conseguiu fazer com que sua produção de geleia real passasse de 200 toneladas/ano para mais de 3500 toneladas/ano (Chen et al. 2002, Cao et al. 2016). Isso enfatiza que o investimento em pesquisa e desenvolvimento de tecnologias é a chave, também, para o progresso econômico de um país.

Referências

- Akasaka, S., K. Sasaki, K. ichi Harano, e T. Nagao. 2010.** Dopamine enhances locomotor activity for mating in male honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 56: 1160–1166.
- Albert, Š., J. Kludiny, e J. Šimúth. 1999.** Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 427–434.
- Altaye, S. Z., L. Meng, e J. Li. 2019.** Molecular insights into the enhanced performance of royal jelly secretion by a stock of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) selected for increasing royal jelly production. *Apidologie.* 50: 436–453.
- Andere, C. I., C. Montevario, M. A. Palacio, M. Catena, E. M. Rodríguez, e A. M. Collins. 2011.** *Apis mellifera* semen: Bacterial contamination and susceptibility to antibiotics. *Apidologie.* 42: 551–559.
- Ayoub, Z. N., D. S. Ahmed, M. Abdulla, e M. H. Mosa. 2015.** Impact of varroa mite infestation on the mandibular and hypopharyngeal glands of honey bee workers. *Acarina.* 23: 92–97.
- Baccetti, B. 1972.** Insect Sperm Cells. *Adv. In Insect Phys.* 9: 315–397.
- Baitala, T. V., P. Faquinello, V. D. A. A. De Toledo, C. A. Mangolin, E. N. Martins, e M. C. C. Ruvolo-Takasusuki. 2010.** Potential use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies. *Apidologie.* 41: 160–168.
- Bastin, F., A. Couto, V. Larcher, M. Phiancharoen, G. Koeniger, N. Koeniger, e J. C. Sandoz. 2018.** Marked interspecific differences in the neuroanatomy of the male olfactory system of honey bees (genus *Apis*). *J. Comp. Neurol.* 526: 3020–3034.
- Bieńkowska, M., B. Panasiuk, P. Wegrzynowicz, e D. Gerula. 2011.** The effect of different thermal conditions on drone semen quality and number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee. *J. Apic. Sci.* 55: 161–168.
- Bíliková, K., J. Hanes, E. Nordhoff, W. Saenger, J. Kludiny, e J. Šimúth. 2002.** Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: Purification and molecular characterization. *FEBS Lett.* 528: 125–129.
- Boes, K. E. 2010.** Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: An interplay of queen and worker decisions. *Insectes Soc.* 57: 1–9.
- Brockmann, A., e D. Brückner. 2001.** Structural differences in the drone olfactory system of two phylogenetically distant *Apis* species, *A. florea* and *A. mellifera*. *Naturwissenschaften.* 88: 78–81.
- Buttstedt, A., R. F. A. Moritz, e S. Erler. 2013.** More than royal food - major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. *Front. Zool.* 10: 1–10.
- Cao, L. F., H. Q. Zheng, C. W. W. Pirk, F. L. Hu, e Z. W. Xu. 2016.** High royal jelly-producing honeybees (*Apis mellifera ligustica*) (Hymenoptera: Apidae) in China. *J. Econ. Entomol.* 109: 510–514.
- CBRA. 2013.** Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal, p. 20–25, 85 e 90. Colégio Brasileiro de Reprodução animal (org.), 3 ed. Belo Horizonte.

- Cemek, M., F. Aymelek, M. E. Büyükokuroğlu, T. Karaca, A. Büyükben, e F. Yilmaz. 2010.** Protective potential of royal jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels. *Food Chem. Toxicol.* 48: 2827–2832.
- Chen, S., S. Su, e X. Lin. 2002.** An introduction to high-yielding royal jelly production methods in China. *Bee World.* 83: 69–77.
- Chenoweth, J., e P. Lorton. 2014.** Animal andrology: Theories and applications., p. 3–7. *In* Chenoweth, P.J., Lorton, S.P. (orgs.), . Boston.
- Collins, A. M. 2004.** Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination. *Invertebr. Reprod. Dev.* 45: 231–237.
- Collins, A. M., T. J. Caperna, V. Williams, W. M. Garrett, e J. D. Evans. 2006.** Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insec. Mol. Biol.* 15: 541–549.
- Cruz, G. C. N., L. Garcia, A. J. Silva, J. A. R. G. Barbosa, C. A. O. Ricart, S. M. Freitas, e M. V. Sousa. 2011.** Calcium effect and pH-dependence on self-association and structural stability of the *Apis mellifera* major royal jelly protein 1. *Apidologie.* 42: 252–269.
- Curry, M. R., F. W. Kleinhans, e P. F. Watson. 2000.** Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram, and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology.* 41: 167–173.
- Czekońska, K., B. Chuda-Mickiewicz, e P. Chorbiński. 2013.** The influence of honey bee (*Apis mellifera*) drone age on volume of semen and viability of spermatozoa. *J. Apic. Sci.* 57: 61–65.
- Czekońska, K., B. Chuda-Mickiewicz, e J. Samborski. 2015.** Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidol.* 46: 1–9.
- Deseyin, J., e J. Billen. 2005.** Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidol.* 36: 49–57.
- Detienne, G., W. De Haes, U. R. Ernst, L. Schoofs, e L. Temmerman. 2014.** Royalactin extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* through epidermal growth factor signaling. *Exp. Gerontol.* 60: 129–135.
- Dobritsch, D., D. Aumer, M. Fuszard, S. Erler, e A. Buttstedt. 2019.** The rise and fall of major royal jelly proteins during a honeybee (*Apis mellifera*) workers' life. *Ecol. Evol.* 9: 8771–8782.
- Duay, P., D. De Jong, e W. Engels. 2002.** Decreased flight performance and sperm production in drones of the honeybee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupaldevelopment. *Genet. Mol. Res.* 1: 227–232.
- Fan, P., B. Han, M. Feng, Y. Fang, L. Zhang, H. Hu, Y. Hao, Y. Qi, X. Zhang, e J. Li. 2016.** Functional and proteomic investigations reveal major royal jelly protein 1 associated with anti-hypertension activity in mouse vascular smooth muscle cells. *Sci. Rep.* 6: 1–13.
- Fisher, A., K. Harrison, C. Love, D. Varner, e J. Rangel. 2018.** Spatio-temporal variation in viability of spermatozoa of honey Bee, *Apis mellifera*, drones in Central Texas Apiaries. *Southwest. Entomol.* 43: 343–356.

- Fontana, R., M. A. Mendes, B. M. De Souza, K. Konno, L. M. M. César, O. Malaspina, e M. S. Palma. 2004.** Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*. 25: 919–928.
- Fratini, F., G. Cilia, S. Mancini, e A. Felicioli. 2016.** Royal jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiol. Res.* 192: 130–141.
- Free, J. B., e I. H. Williams. 1975.** Factors determining the rearing and rejection of drones by the honeybee colony. *Anim. Behav.* 23: 650–675.
- Fujita, T., H. Kozuka-Hata, H. Ao-Kondo, T. Kunieda, M. Oyama, e T. Kubo. 2013.** Proteomic analysis of the royal jelly and characterization of the functions of its derivation glands in the honeybee. *J. Proteome Res.* 12: 404–411.
- Fujiwara, S., J. Imai, M. Fujiwara, T. Yaeshima, T. Kawashima, K. Kobayashi, M. Milk, e I. Company. 1990.** A potent antibacterial in royal jelly. *J. Biol. Chem.* 265: 11333–11337.
- Gençer, H., e Y. Kahya. 2011.** Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *J. Apic. Res.* 50: 130–137.
- Gessner, B., e K. Gessner. 1976.** Inorganic ions in spermathecal fluid and their transport across the spermathecal membrane of the queen bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 22: 1469–1474.
- Goins, A., e S. S. Schneider. 2013.** Drone “quality” and caste interactions in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Insectes Soc.* 60: 453–461.
- Gontarz, A., D. Banaszewska, M. Gryzinska, e K. Andraszek. 2016.** Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 40: 598–602.
- Han Hu, Gebreamlak Bezabih, Mao Feng, Qiaohong Wei, Xufeng Zhang, Fan Wu, Lifeng Meng, Yu Fang, Bin Han, C. M. and J. L. 2019.** In-depth proteome of the hypopharyngeal glands of honeybee workers reveals highly activated protein and energy metabolism in priming the secretion of royal jelly. *Mol. Cell. Proteomics.* 18: 606–621.
- Hayashi, M., J. Nakamura, K. Sasaki, e K. ichi Harano. 2016.** Honeybee males use highly concentrated nectar as fuel for mating flights. *J. Insect Physiol.* 93–94: 50–55.
- Haydak, M. 1970.** Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* 15: 143–156.
- Hrassnigg, N., e K. Crailsheim. 2005.** Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie.* 36: 255–277.
- Huang, Z. Y., e G. W. Otis. 1989.** Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Soc.* 36: 264–276.
- Ji, T., Z. Liu, J. Shen, F. Shen, Q. Liang, L. Wu, G. Chen, e M. Corona. 2014.** Proteomics analysis reveals protein expression differences for hypopharyngeal gland activity in the honeybee, *Apis mellifera carnica* Pollmann. *BMC Genomics.* 15: 1–14.
- Kamakura, M. 2011.** Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature.* 473: 478–483.
- Kashima, Y., S. Kanematsu, S. Asai, M. Kusada, S. Watanabe, T. Kawashima, T. Nakamura, M. Shimada, T. Goto, e S. Nagaoka. 2014.** Identification of a novel hypocholesterolemic protein, major royal jelly protein 1, derived from royal jelly. *PLoS One.* 9(8): e105073.
- Kausar, S. H., e V. R. More. 2019.** Royal jelly: organoleptic characteristics and physicochemical properties. *Phar. Chem. J.* 6(2): 20–24.

- Kelber, C., W. Rössler, e C. J. Kleineidam. 2006.** Multiple olfactory receptor neurons and their axonal projections in the antennal lobe of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 496: 395–405.
- King, M., H. Eubel, A. H. Millar, e B. Baer. 2011.** Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 57: 409–414.
- Klenk, M.;Koeniger, G.;Koeniger, N.; Fasold, H. 2004.** Proteins in spermathecal gland secretion and spermathecal fluid and the properties of a 29 kDa protein in queens of *Apis mellifera*. *Apidologie.* 35: 371–381.
- Koeniger, G., N. Koeniger, J. Ellis e L. Connor. 2014.** Mating behaviour: How honey bees avoid inbreeding. p. 29-30. *In* Mating biology of honey bees (*Apis mellifera*).Wicwas press. Michigan.
- Kraft, L. A.; C.W. Foley, B. Jr. Howart, M.S. Blum e A.D. Jonhson. 1978.** Radiorespirometric studies of carbohydrate metabolism by washed spermatozoa of various species. *Comp. Biochem. Physiol.* 60: 233–238.
- Lee, P. C., e M. L. Winston. 1987.** Effects of reproductive timing and colony size on the survival, offspring colony size and drone production in the honey bee *Apis mellifera*. *Ecol. Entomol.* 12: 187–195.
- Lensky, Y., e Y. Rakover. 1983.** Separate protein body compartments of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem.* 75: 607–615.
- Lino-Neto, J., S. N. Bao, e H. Dolder. 2000.** Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell.* 32: 322–327.
- Locke, S. J., e Y. Peng. 1993.** The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiol. Entomol.* 18: 144–148.
- Mandla, R., e N. R. Kumar. 2016.** Comparison of carbohydrates in the worker, drone and queen brood food of *Apis mellifera* during spring. *J. Glob. Biosci.* 5: 3765–3768.
- Matsushima, K., T. Watanabe, e K. Sasaki. 2019.** Functional gene expression of dopamine receptors in the male reproductive organ during sexual maturation in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 112: 9–14.
- Mazeed, A. M., e K. M. Mohanny. 2010.** Some reproductive characteristics of honeybee drones in relation to their ages. *Entomol. Res.* 40: 245–250.
- Metz, B. N., e D. R. Tarpy. 2019.** Reproductive senescence in drones of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insects.* 10.
- Mezawa, R., S. Akasaka, T. Nagao, e K. Sasaki. 2013.** Neuroendocrine mechanisms underlying regulation of mating flight behaviors in male honey bees (*Apis mellifera* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 186: 108–115.
- Niel, H., X. Liu, J. Pan, W. Li, Z. Li, S. Zhang, S. Chen, X. Miao, N. Zheng, e S. Su. 2017.** Identification of genes related to high royal jelly production in the honey bee (*Apis mellifera*) using microarray analysis. *Genet. Mol. Biol.* 40: 781–789.
- Novak, A. F., M. S. Blum, S. Taber, e J. A. Liuzzo. 1960.** Separation and determination of seminal plasma and sperm amino acids of the honey bee, *Apis Mellifera*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 53: 841–843.
- Ochieng, S. A., K. C. Park, J. W. Zhu, e T. C. Baker. 2000.** Functional morphology of antennal chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Arthropod Struct. Dev.* 29: 231–240.

- Ostroverkhova, N. V., A. N. Kucher, N. P. Babushkina, e O. L. Konusova. 2018a.** Sequence of the *mrjp3* microsatellite locus in honeybees of different origin. *Russ. J. Genet.* 54: 322–327.
- Ostroverkhova, N. V., A. N. Kucher, O. L. Konusova, e I. V. Sharakhov. 2018b.** Honeybee subspecies or / and royal jelly productivity. *Far. East Entomol.* 353 : 24–28.
- Page, R. E. 1981.** Protandrous reproduction in honey bees. *Environ. Entomol.* 10: 359–362.
- Parpinelli, R. S., M. C. C. Ruvolo-Takasusuki, e V. A. A. Toledo. 2014.** MRJP microsatellite markers in Africanized *Apis mellifera* colonies selected on the basis of royal jelly production. *Genet. Mol. Res.* 13: 6724–6733.
- Pen, C. Y., C. Yin, e R. S. Yin, Kucy. 1993.** Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol. Entomol.* 18: 93–101.
- Pintado, B., J. De La Fuente, e E. R. S. Roldan. 2000.** Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: Accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.* 118: 145–152.
- Qu, N., J. Jiang, L. Sun, C. Lai, L. Sun, e X. Wu. 2008.** Proteomic characterization of royal jelly proteins in Chinese (*Apis cerana cerana*) and European (*Apis mellifera*) honeybees. *Biochem.* 73: 676–680.
- Ramanathan, A. N. K. G., A. J. Nair, e V. S. Sugunan. 2018.** A review on royal jelly proteins and peptides. *J. Funct. Foods.* 44: 255–264.
- Rangel, J., e A. Fisher. 2019.** Factors affecting the reproductive health of honey bee (*Apis mellifera*) drones—a review. *Apidologie.* 50: 759–778.
- Rinderer, T. E., B. P. Oldroyd, S. Wongsiri, H. A. Sylvester, L. I. D. Guzman, S. Potichot, W. S. Sheppard, e S. L. Buchmann. 1993.** Time of drone flight in four honey bee species in south-eastern Thailand. *J. Apic. Res.* 32: 27–33.
- Rousseau, A., V. Fournier, e P. Giovenazzo. 2015.** *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *Can. Entomol.* 147: 702–711.
- Rousseau, A., e P. Giovenazzo. 2016.** Optimizing drone fertility with spring nutritional supplements to honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Econ. Entomol.* 109: 1009–1014.
- Rowland, C. M., e A. R. McLellan. 1987.** Seasonal changes of drone numbers in a colony of the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecol. Modell.* 37: 155–166.
- Rueppell, O., M. K. Fondrk, e R. E. Page. 2005.** Biodemographic analysis of male honey bee mortality. *Aging Cell.* 4: 13–19.
- Ruvolo-Takasusuki, M. C. C., A. P. B. C. Pozza, A. P. N. Z. Oliveira, R. S. Parpinelli, F. M. Costa-Maia, P. Faquinello, e V. de A. A. de Toledo. 2016.** Improvement and selection of honeybees assisted by molecular markers, p. 63–75. *In* Chambó, E. (org.), *Beekeep. Bee Conserv. - Adv. Res.* London.
- Sano, O., T. Kunikata, K. Kohno, K. Iwaki, M. Ikeda, e M. Kurimoto. 2004.** Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 52: 15–20.

- Sasaki, K., S. Akasaka, R. Mezawa, K. Shimada, e K. Maekawa. 2012.** Regulation of the brain dopaminergic system by juvenile hormone in honey bee males (*Apis mellifera* L.). *Insect Mol. Biol.* 21: 502–509.
- Sasaki, K. 2016.** Nutrition and dopamine: An intake of tyrosine in royal jelly can affect the brain levels of dopamine in male honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 87: 45–52.
- Setchell, B. 2014.** Semen and its constituents, p. 3–10. *In* CABI (org.), *Anim. andrology*, Theor. Appl. Boston.
- Schmitzová, J., J. Kludiny, S. Albert, W. Schröder, W. Schreckengost, J. Hanes, J., J. Júdová, e J. Šimúth. 1998.** A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1020–1030.
- Shinkhede, M. M. D. B. 2009.** Royal jelly protein and lipid composition in *Apis cerana indica* F. *Int. J. Ind. Entomol.* 18: 139–142.
- Šimúth, J. 2001.** Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie.* 32: 69–80.
- Šimúth, J., K. Bíliková, e E. Kováčová. 2004.** Royal jelly proteins as a tool for development of functional ingredients for health. Standing Commission of Apitherapy.
- Smet, L., F. Hatjina, P. Ioannidis, A. Hamamtzoglou, K. Schoonvaere, F. Francis, I. Meeus, G. Smaghe, e D. C. De Graaf. 2017.** Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *PLoS One.* 12: 1–18.
- Snodgrass, R. E., E. H. Erickson, S. E. Fahrbach. 2015a.** The Anatomy of the honey bee. p.121. *In* The hive and the honey bee. Dadant & Sons, Ins. Illinois
- Snodgrass, R. E., E. H. Erickson, S. E. Fahrbach. 2015b.** The Anatomy of the honey bee. p.159-160. *In* The hive and the honey bee. Dadant & Sons, Ins. Illinois
- Szentgyörgyi, H., K. Czekońska, e A. Tofilski. 2017.** The effects of starvation of honey bee larvae on reproductive quality and wing asymmetry of honey bee drones. *J. Apic. Sci.* 61: 233–243.
- Taylor, M. A., E. Guzmán-Novoa, N. Morfin, e M. M. Buhr. 2009.** Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology.* 72: 149–159.
- Valcárcel, A., M. A. De Las Heras, L. Pérez, D. F. Moses, e H. Baldassarre. 1997.** Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 299–309.
- Verma, L. R. 1978.** Biology of honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. 1. Effect of different diluents on motility and survival. *Apidologie.* 9: 167–174.
- Vezetu, T. V., O. Bobiş, R. F. A. Moritz, e A. Buttstedt. 2017.** Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. *Microbiologyopen.* 6: 1–7.
- Wegener, J., M. W. Lorenz, e K. Bienefeld. 2010.** Differences between queen- and worker-laid male eggs of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie.* 41: 116–126.
- Wegener, J., T. May, U. Knollmann, G. Kamp, K. Müller, e K. Bienefeld. 2012.** In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology.* 65: 126–131.

- Wharton, K. E., F. C. Dyer, e T. Getty. 2008.** Male elimination in the honeybee. *Behav. Ecol.* 19: 1075–1079.
- Wheeler, D. E., N. Buck, e J. D. Evans. 2006.** Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15: 597–602.
- Wolf, D. E., V. M. Maynard, C. A. McKinnon, e D. L. Melchior. 1990.** Lipid domains in the ram sperm plasma membrane demonstrated by differential scanning calorimetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 6893–6896.
- Woyke, J. 1978.** Comparative biometrical investigation on diploid drones of the honeybee III. The abdomen, and weight. *J. Apic. Res.* 17: 206–217.
- Woyke, J. 2010.** Three substances ejected by *Apis mellifera* drones from everted endophallus and during natural matings with queen bees. *Apidologie.* 41: 613–621.
- Woyke, J. 2011.** The mating sign of queen bees originates from two drones and the process of multiple mating in honey bees. *J. Apic. Res.* 50: 272–283.
- Woyke, J., e F. Ruttner. 1958.** An anatomical study of the mating process in the honeybee. *Bee World.* 39: 3–18.
- Wu, L., Y. Wei, B. Du, L. Chen, Y. Wang, Y. Li, J. Zhao, e X. F. Xue. 2015.** Freshness determination of royal jelly by analyzing decomposition products of adenosine triphosphate. *LWT - Food Sci. Technol.* 63: 504–510.
- Yousef, S. I., Z. M. El Basheir, S. S. Teleb, e E. E. N. Ibraheem. 2014.** Effect of varroa infestation on the morphological and histological structure of the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* workers. *J. Am. Sci.* 10: 69–78.

II - QUALIDADE ESPERMÁTICA DE ZANGÕES DE *Apis mellifera* L. SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO DE GELEIA REAL.

Resumo

A geleia real é de ampla importância dentro da colônia para a alimentação da rainha e as larvas e, em zangões, ajuda na regulação de hormônios sexuais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características reprodutivas dos zangões de colônias que apresentam alelos D e E, para maior produção de geleia real, em relação a colônias com pelo menos um alelo F ou G, de menor produção. Foram criados zangões de seis colônias selecionadas, três com presença de alelos de maior produção de geleia real (D e E), e três com um alelo de menor produção (F e G), e foi conduzida uma avaliação da qualidade do sêmen e do peso de cada um deles. As colônias que apresentaram os alelos para maior produção de geleia real tiveram uma maior produção de zangões, porém, com pesos menores em relação as colônias que apresentaram alelos de menor produção. No entanto, não foi observada interferência dos alelos sobre a qualidade espermática do zangão, em que a média das variáveis foram: sobrevivência 88,38%, volume 1,2 μ L, turbilhonamento em massa cinco, e as principais anormalidades dos espermatozoides foram cauda dobrada, cabeça solta, cauda solta e cauda bifurcada. Os alelos de maior produção de geleia real influenciaram o peso e a quantidade de zangões criados nas colônias de *Apis mellifera* L., mas não a qualidade espermática.

Palavras chaves: Anormalidades espermáticas, Brasil, genética, *MRJP3*, sêmen, turbilhonamento.

Abstract

Sperm quality of *Apis mellifera* L. drones selected for royal jelly production

Royal jelly is of great importance within the colony to feed the queen and as larvae, and in drones, it helps in the regulation of sex hormones. This research was carried out to evaluate as reproductive resources of colony drones that presented two alleles (D, E) for greater production of royal jelly concerning colonies with less than one lesser allele (F, G). Drones were reared from six selected colonies, three with alleles D, E of higher production of royal

jelly and three with an allele of lower production F or G, and the semen quality and the weight of each one was evaluated. As the colonies that exhibited alleles for greater production of royal jelly, there was a greater production of drones, but with lower weights about the colonies that presented alleles of lower production. However, no allele interference was observed on the sperm quality of the drone, with an average of the following variables: 88.38%, volume 1.2 μ L, swirling mass in five and main sperm abnormalities were bent tail, headless sperm, tailless sperm, and bifurcated tail. The alleles of greater production of royal jelly influence the weight and number of drones reared in the colonies of *Apis mellifera* L., but not in the sperm quality.

Key words: Brazil, genetics, mass motility, *MRJP3*, semen, sperm abnormalities.

Introdução

A reprodução partenogênica arrenótoca é característica dos hymenoptera, os quais agrupam as *Apis mellifera* L. Esse tipo de reprodução se caracteriza por fêmeas com capacidade de gerar cria sem serem fecundadas, contudo, isso condiciona o sexo da prole em machos haploides (Michener 2007, Gardner et al. 2012). Para a produção de fêmeas, a reprodutora, neste caso, a rainha, precisará se acasalar para acrescentar o material genético do macho e dar origem a um indivíduo diploide, e esse processo é conhecido como haplodiploidia, e ocorre na maioria das subespécies de *A. mellifera*, com exceção da *Apis mellifera capensis* (Anderson 1963, Oldroyd et al. 2008).

O entendimento desse comportamento é importante em programas de melhoramento genético, nos quais determinadas características dos indivíduos são selecionadas dependendo do objetivo de estudo. Na *A. mellifera*, muitos produtos das colônias podem ser explorados comercialmente e ser classificados como: de coleta e transformação (pólen, mel e própolis), produzidos pelas abelhas (apitoxina, cera e geleia real) e outros, como pacotes de abelhas, e ar da colônia e polinização (FAO 2015). Porém, para adquirir um alto nível de desenvolvimento da colônia deve-se considerar fatores que afetam o fenótipo, por exemplo, o ambiente e a genética.

O ambiente é um fator de difícil controle, mas a genética representa o ponto-chave no desenvolvimento de um programa de melhoramento (Echevarría e Miazzi 2002). Ao selecionar uma rainha de alta qualidade, ela irá transmitir essa informação genética à sua

prole, seja fêmea ou macho. No entanto, o macho também se torna um fator decisivo dentro do sucesso da colônia, uma vez que transmite todo seu genótipo para a prole. Uma rainha se acasala com, no mínimo, 10 machos, portanto, cada um deles terá características diferentes que permitem uma ampla variedade de indivíduos dentro da colônia (Woyke 2011, Czekońska et al. 2013).

Esses machos se localizam em áreas específicas do ambiente denominadas zonas de congregação nas quais a rainha virgem atrai os zangões por meio de feromônios sexuais secretado pelas glândulas mandibulares (Butler 1971, Collet et al. 2009). Se a rainha é selecionada, mas os machos do ambiente não, o processo seletivo vai demorar mais. Isso ocorre em programas de melhoramento, nos quais a inseminação instrumental de rainhas ainda não está bem estabelecida, visto que ela permite controlar a genética tanto da fêmea quanto do macho (Polkovnikova e Pershina 2017).

Somada a essas características, a diversidade geográfica do Brasil e a estação ambiental do ano, influenciam diretamente o desenvolvimento das colônias (Maleszka et al. 2009, Amiri et al. 2020). Portanto, pesquisas que determinem a qualidade espermática dos zangões são de ampla importância para identificar as características dela em cada um dos ambientes. Entretanto, a maioria das pesquisas que envolvem qualidade espermática estão relacionadas a subespécies europeias em ambientes temperados, diferentes aos presentes no Brasil (Michener 2007, Czekońska et al. 2013).

Igualmente, fatores como suplementação, sanidade, agrotóxicos, idade e tamanho dos zangões, afetam a qualidade do sêmen, além do ambiente (Cobey 2007, Rousseau et al. 2015, Rousseau e Giovenazzo 2016). Quando são desenvolvidos programas de seleção de machos, é possível obter melhor qualidade do sêmen, comparado com colônias sem nenhum tipo de seleção, permitindo controlar eficientemente características desejáveis das colônias (Acassio dos Reis e Comastri Filho 2003).

Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade espermática de zangões de colônias que apresentam os alelos DE, EE, EF, e EG relacionados à produção de geleia real, partindo do pressuposto que colônias de maior produção de geleia real (DE, EE) conseguem alimentar melhor os zangões, incrementando a qualidade do sêmen.

Materiais e métodos

Local do experimento

O experimento foi desenvolvido no setor de Apicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá – UEM, localizado no município de Maringá, PR, Brasil, no período entre abril a outubro de 2019. As análises moleculares foram realizadas nos laboratórios de Genética Animal, Cultura de tecidos e Eletroforese de vegetais e no de Métodos Quantitativos Aplicados à Zootecnia.

A pesquisa baseou-se na identificação de dois grupos por meio de marcador microssatélite de MRJP3, sendo eles: colônias com presença de dois alelos para maior produção de geleia real (C, D e E); colônias com pelo menos um alelo de menor produção de geleia real (A, B, F e G), para ambas as análises, foram utilizados os dados de Baitala et al. (2010).

Seleção genética das colônias

Para a realização das análises foram coletadas 10 abelhas operárias pertencentes a 18 colônias do matrizeiro, no setor de apicultura da FEI, próximas a emergir. Os alvéolos foram desoperculados com a ajuda de pinças para assegurar que os indivíduos coletados tivessem o material genético da rainha da colônia, evitando, assim, a coleta de espécimes de outras colônias que por deriva estivessem nos favos. As abelhas coletadas foram armazenadas em tubos falcon contendo álcool 70%, devidamente rotulados com o número da colônia e armazenados em freezer a -20 °C, por 24 horas. Posteriormente, o álcool de 70% foi substituído por álcool 100%; as amostras continuaram no freezer a -20 °C até o momento da extração.

A extração do DNA total foi feita seguindo o protocolo para *A. mellifera* delineado por Bardakci e Skibinski (1994), e adaptado por Baitala (2007). Para confirmar a quantidade do DNA, foi utilizado *NanoDrop Lite spectrophotometer* e, posteriormente, foi realizada eletroforese com géis de agarose 0,8% para avaliar a integridade do DNA. Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta; a imagem foi capturada pelo sistema *Ultraviolet Transilluminador High Performance - Edas 290*, utilizando o programa *Kodak 1 D Image Analysis 3.5*.

Para a determinação da presença dos alelos da MRJP3 utilizou-se os primers de Albert et al. (1999): forward: ATG TAA TTT TGA AGA ATG AAC TTG; reverse: TGT AGA TGA

CTT AAT GAG AAA CAC. A amplificação do DNA extraído foi feita por Reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o protocolo de Baitala 2010. Por sua vez, com os produtos da PCR, foram realizados géis de electroforese 1,7 % agarose (50% agarose puro e 50% agarose MetaPhor), corrida a 60V durante 5 horas e, posteriormente, corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta. A imagem foi capturada pelo sistema *Ultraviolet Transilluminador High Performance* - Edas 290, utilizando o programa *Kodak 1 D Image Analysis 3.5*.

Para confirmar os alelos em algumas das amostras, realizou-se gel de poliacrilamida 12 %: 14,4 g de ureia, 12,5 mL de poliacrilamida (29:1), 3 mL de TBE 10X, 30 µL de temed, 500 µL de PSA. As amostras foram previamente desnaturadas no programa AFLP1 durante 15 minutos a 94 °C e a 4 °C ao final. Antes de colocar as amostras no gel, foi feita uma pré-corrida durante 30 minutos a 180 V em solução tampão TBE 1X. Posteriormente, a corrida foi realizada a 150 V até o *front* de azul de bromofenol sair do gel. A revelação foi feita por nitrato de prata.

Na figura 1, podem ser observados os resultados preliminares dos genótipos das rainhas que foram analisadas para a criação de zangões. Dentre as 18 colônias, nenhuma apresentou unicamente alelos de baixa produção: A, B, F e G, verificou-se, então, que todas tinham, pelo menos, um alelo de alta produção: C, D e E (Figura 1).

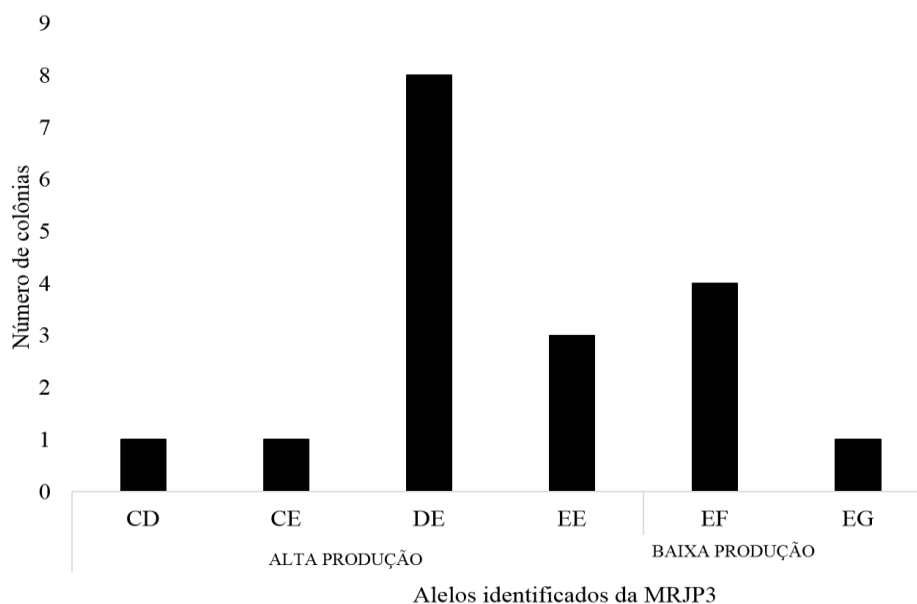


Figura 1. Alelos de produção de geleia real identificados nas colônias matrizes da FEI.

Com base nessa análise genética foram selecionadas três colônias como tratamento um: duas com alelos EF e uma com alelos EG que tinham pelo menos um alelo de baixa produção de geleia real (F e G), e três colônias com alelos D e E: duas homozigotas (EE) e uma heterozigota (DE) como tratamento dois, que apresentaram dois alelos para maior produção de geleia real.

Criação de zangões

Um favo de zangão foi deixado numa gaiola constituída de madeira e de uma tela excludora para rainhas, e a gaiola foi colocada centralmente nas colônias selecionadas. A rainha foi deixada engaiolada por 48 horas para fazer a postura de zangões. Em seguida, a gaiola foi retirada, a rainha liberada, e o favo com postura foi deixado na mesma posição. Posteriormente, as colônias receberam semanalmente 2400mL de suplemento energético (xarope de sacarose e água, em relação 1:1) e 80g de ração proteica (feita de mel e pólen na proporção de 1:1).

Para os zangões utilizados na coleta de sêmen, foi feito um acompanhamento diário para ter uma idade conhecida com variação de ± 24 horas de data de emergência. Diariamente, marcaram-se os zangões que emergiram e todos eram introduzidos novamente nas colônias, e após um prazo entre 15 e 18 dias, sêmen foi coletado para análises.

Peso dos zangões e qualidade do sêmen

Para a análise da qualidade do sêmen, os zangões previamente marcados em cada colônia foram coletados em uma caixa térmica de isopor para que fossem isolados da temperatura ambiente e transportados ao laboratório. Em seguida, foram pesados em balança analítica de precisão 0,001g e deixados numa armação de tecido *voil*, e, com o auxílio de um algodão, os zangões foram alimentados com xarope de sacarose (água: açúcar em proporção 1:1) para auxiliá-los a manter sua atividade, e em um dos extremos da armação foi colocada uma lâmpada para que a luz vermelha pudesse estimular o voo de limpeza. Ao todo, 30 zangões de cada colônia foram utilizados para as análises, dos quais foi avaliado volume (n=6), anormalidades morfológicas (n:10) e sobrevivência (n=14) - apenas em duas colônias

não foi possível analisar 30 zangões devido a mortalidade e a ausência de sêmen, dessas duas colônias foram analisados entre 12 a 15 zangões.

Todas as análises foram avaliadas individualmente, e para coletar o sêmen foi realizada a eversão manual do endofalo do zangão (Cobey et al. 2013). O volume de sêmen foi coletado usando uma micropipeta de 10 μ L, com precisão de 0,1 μ L, em que a ponteira foi previamente hidratada com água de coco, para melhorar a coleta.

Para o turbilhonamento foram adotados os métodos do CBRA (2013), desta forma, a sobrevivência espermática foi verificada com uma coloração eosina-nigrosina (5 e 10% respectivamente) em lâminas a 37 °C, utilizando o método descrito por Swanson e Berden (1951), e para a análise de anormalidades na morfologia espermática, foi utilizado o método de Oberlender et al. (2012), já a coloração e classificação das mesmas deu-se segundo o CBRA (2013).

Análises estatísticas

Em todos os dados utilizou-se a análise descritiva por meio de tabelas e Box-Plot para extrair as informações iniciais. Em relação à análise diagnóstica do modelo, para cada variável utilizou-se o gráfico normal de probabilidades com envelope simulado. Devido a diversidade das variáveis das respostas foram utilizadas análises estatísticas diferentes para cada uma delas, conforme veremos a seguir.

Peso e volume: quanto a suposição de normalidade da variável resposta, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, considerando o nível de significância a 5%. Para verificar a suposição de homogeneidade de variâncias no volume utilizou-se o teste de Bartlett com nível de significância a 5%. A fim de verificar se existem efeitos significativos do tratamento nas variáveis respostas, utilizou-se o modelo de efeitos (1), no qual os blocos correspondem a três semanas nas quais o experimento foi conduzido. A análise diagnóstica do modelo foi realizada por meio do gráfico semi-normal de probabilidades com envelope simulado e QQ-Plot.

Modelo de efeitos:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_k + \epsilon_{ij} \begin{cases} i = 1,2 \\ j = 1 \dots n \\ k = 1,2,3 \end{cases} \quad (1)$$

- y_{ijk} o efeito do i -ésimo tratamento, a j -ésima repetição e o k -ésimo bloco;
- μ a média geral;
- τ_i efeito do i -ésimo tratamento (alelos DE, EE e alelos EF, EG);
- β_k efeito do k -ésimo bloco (os blocos foram semana um, dois e três);
- ϵ_{ijk} componente do erro aleatório.

Turbilhonamento: para avaliar a escala de motilidade dos espermatozoides considerando o efeito da genética destes indivíduos, utilizou-se a regressão multinomial, pela qual foi ajustado o modelo logitos de categoria de referência. Em relação à análise diagnóstica do modelo, utilizou-se o gráfico dos resíduos de Pearson.

Sobrevivência espermática: o teste Kruskal-Wallis foi utilizado com o intuito de verificar se há diferenças na mortalidade de espermatozoides de acordo com o tratamento, considerando o nível de significância de 5%. Para a qualidade do ajuste do modelo utilizou-se a *deviance* e, para verificar se o efeito do tratamento na mortalidade de espermatozoides é significativo, utilizou-se o modelo de regressão logístico.

Anomalias morfológicas: com o objetivo de identificar se há diferenças na morfologia dos zangões de acordo com o caráter genético, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis considerando o nível de significância de 5%. As variáveis consideradas foram: CS – Cabeça Solta, FS – Cauda Solta, FD – Cauda bifurcada e FE – Cauda Dobrada. Todos os dados foram analisados no software R versão 3.6.0. (Kleinbaum e Klein 2002, Paula 2004, R development Core Team 2014, Montgomery 2017).

Resultados

Peso

Observou-se que a variabilidade do peso dos zangões quanto a genética foi similar, porém, a média do peso foi maior no tratamento com alelos EF e EG de baixa produção de geleia real (**Figura 2**). Realizou-se a análise de variância do modelo ajustado a um nível de 5% de significância, na qual os resultados obtidos determinaram uma diferença significativa, tanto do bloco quanto da genética ($F=13,46$, valor- $p= 0,008$ e $F=4,193$, valor- $p= 0,016$, respectivamente).

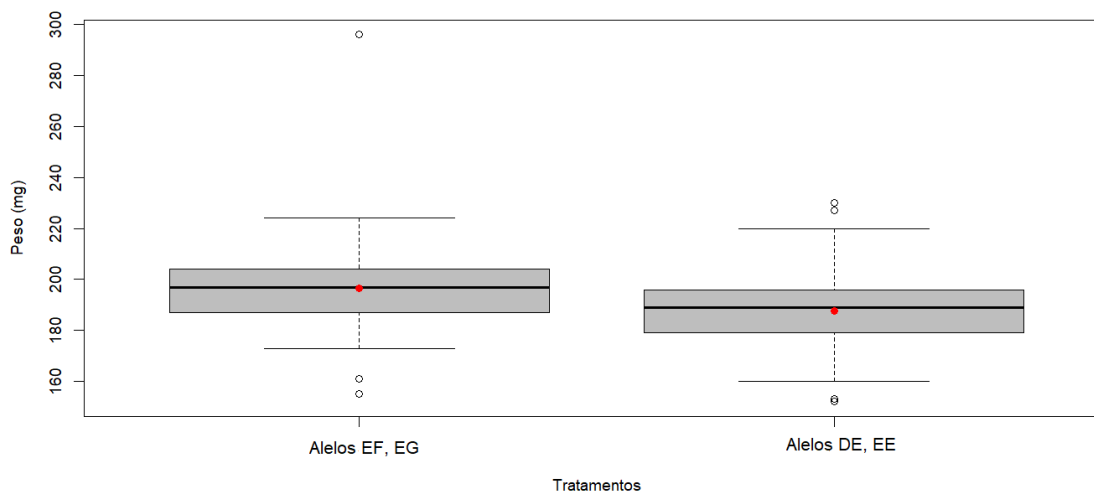


Figura 2. Peso em mg dos zangões maduros, com média de 196,6 e 187,8 mg para alelos EF e EG (baixa produção de geleia real) e para alelos DE e EE (alta produção de geleia real), respectivamente, valor-p= 0,016.

Para verificação final, o teste de hipótese para normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado e o valor obtido foi (valor-p = 0,26), não rejeitando a hipótese de normalidade. Quanto a homogeneidade, não se rejeita a hipótese de homogeneidade pelo teste de Bartlett (valor-p= 0,14).

Volume do sêmen

A variabilidade, quanto a quantidade de sêmen produzido por zangão, foi maior no tratamento com alelos EF e EG (de baixa produção de geleia real), assim como a média da quantidade de sêmen produzida (**Figura 3**). Com base no teste Shapiro-Wilk, a variável volume segue uma distribuição normal (valor-p= 0,68).

Realizou-se a análise de variância do modelo ajustado a um nível de 5% de significância, em que os resultados obtidos não foram significativos para o tratamento ($F=0$; valor-p= 0,96), porém, houve efeito para o bloco ($F=8$; valor-p= 0,008). Para verificar, o teste de hipótese para normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado e o resultado foi de (valor-p = 0,44), sendo assim, a hipótese de normalidade não foi rejeitada. Quanto a homogeneidade, rejeitou-se a hipótese de homogeneidade pelo teste de Bartlett (valor-p= 0,64).

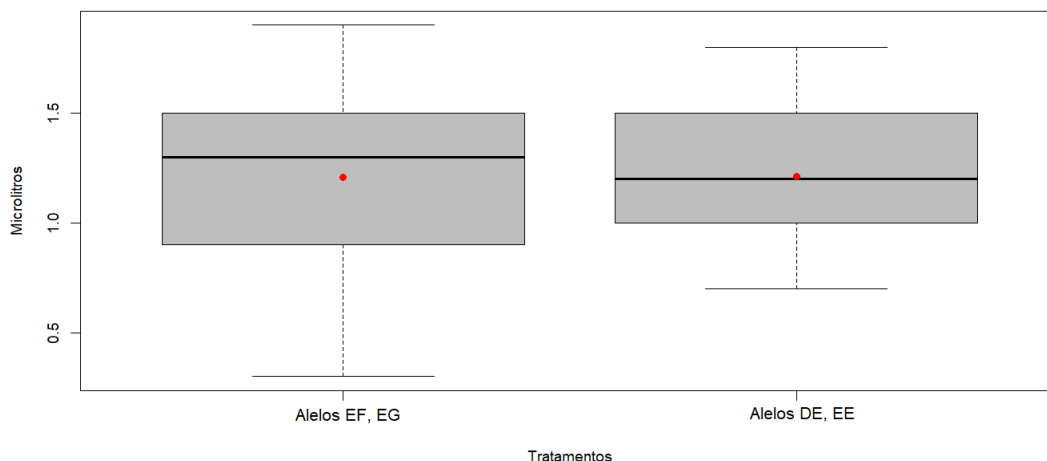


Figura 3. Volume de sêmen produzido por zangões, média de 1,21 μ L para alelos EF e EG de baixa produção de geleia real, e de 1,20 μ L para alelos DE e EE para alta produção de geleia real, valor- $p=0,96$.

Turbilhonamento ou movimento em massa

O turbilhonamento caracteriza a movimentação do sêmen ocasionada pelo vigor espermático, e categorizado de um a cinco, avaliando o tamanho da onda (base e altura). Quando menos de 10% do sêmen exibe ondas altas com base estreita, caracteriza-se como categoria um, entre 20 e 40%, categoria dois, entre 45 e 75%, categoria três, entre 75 e 85%, categoria quatro e a categoria cinco quando 90% do sêmen apresenta essas características.

A variável resposta Y (grau de motilidade) é politômica e apresenta cinco categorias, sendo elas Motilidade massal-1, Motilidade massal-2, Motilidade massal-3, Motilidade massal-4, Motilidade massal-5, referentes à escala de movimentação em massa de sêmen de zangões. Observou-se que há uma proporção superior de zangões cujo sêmen exibe uma motilidade de ordem cinco em cada nível genético (**Figura 4**). Ou seja, há uma proporção significativa de sêmen cuja movimentação em forma de ondas é predominante as de tamanho alto e de base estreita.

No modelo ajustado ambos os efeitos foram significativos, o que indica que as covariáveis X_1 e X_2 (genética e tempo em semanas) devem permanecer no modelo valor- $p=0,002$; Critério de Informação de Akaike (AIC):82,54. Verificou-se que o ajuste do modelo foi satisfatório, uma vez que as probabilidades observadas estão próximas das probabilidades previstas pelo modelo, e mais, a estatística *deviance* resultou em 12,92 (valor- $p=0,11$, graus de liberdade (g.l)=8), indicando a não rejeição do modelo.

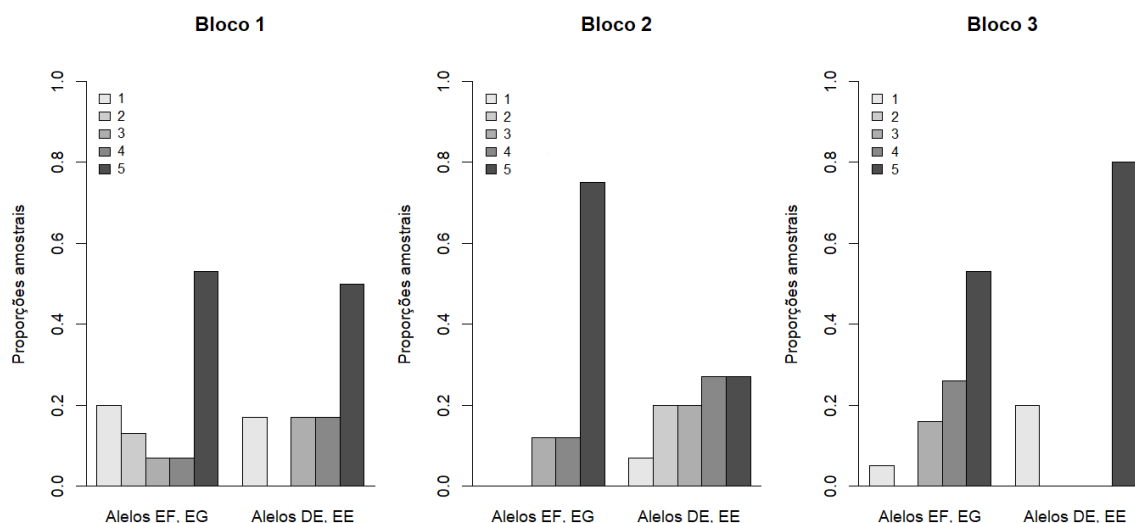


Figura 4. Grau de turbilhonamento considerando a genética dos zangões. A cor representa cada categoria de turbilhonamento, dada pela proporção exibida pelo sêmen de ondas altas com base estreita. 1:<10%; 2 entre 20 e 40%; 3: entre 45 e 75%; 4: entre 75 e 80% e 5: >90%.

A **Tabela 1** contém as estimativas dos parâmetros do modelo ajustado e a **Tabela 2** apresenta, para os logitos, as expressões e estimativas da chance de ocorrência da categoria de resposta j , $j = 1,2,3,4$ em relação a categoria $r = 5$ para um dado vetor $x = (x_1, x_2)$.

Tabela 1. Estimativas dos parâmetros do modelo ajustado

Parâmetros	Logito 1		Logito 2		Logito 3		Logito 3	
	Mot-1/Mot-5		Mot-2/Mot-5		Mot-3/Mot-5		Mot-4/Mot-5	
	Est.	E.P.	Est.	E.P.	Est.	E.P.	Est.	E.P.
β_{0j} intercepto	-1.25	0,67	-1.91	0,86	-1.79	0,80	-1,77	0,79
β_{1j} bloco 2	-1,59	1,25	0,23	1,09	0,65	1,02	0,90	0,98
β_{2j} bloco 3	-0,88	0,96	-1,95	0,92	0,18	1,00	0,69	0,93
β_{3j} Genética	0,79	0,91	0,70	1,07	0,34	0,84	0,28	0,76

Est: Estimativa; E.P.: Erro padrão

Tabela 2. Expressões e estimativas da chance de ocorrência da categoria de resposta j em relação à categoria r, $p_{_j}(x)/p_{_r}(x)$, $j=1,2,3,4$ e $r = 5$

Bl	Tr.	Mot-1/Mot-5		Mot-2/Mot-5		Mot-3/Mot-5		Mot-4/Mot-5	
		$p_1(x)/p_5(x)$	Est	$p_2(x)/p_5(x)$	Est	$p_3(x)/p_5(x)$	Est	$p_4(x)/p_5(x)$	Est
1	1	$e^{\beta_{01} + \beta_{s1}}$	0,62	$e^{\beta_{02} + \beta_{s2}}$	0,29	$e^{\beta_{03} + \beta_{s3}}$	0,23	$e^{\beta_{04} + \beta_{s4}}$	0,22
1	2	$e^{\beta_{01}}$	0,28	$e^{\beta_{02}}$	0,14	$e^{\beta_{03}}$	0,16	$e^{\beta_{04}}$	0,16
2	1	$e^{\beta_{01} + \beta_{11} + \beta_{s1}}$	0,12	$e^{\beta_{02} + \beta_{12} + \beta_{s2}}$	0,37	$e^{\beta_{03} + \beta_{13} + \beta_{s3}}$	0,45	$e^{\beta_{04} + \beta_{14} + \beta_{s4}}$	0,55
2	2	$e^{\beta_{01} + \beta_{11}}$	0,05	$e^{\beta_{02} + \beta_{12}}$	0,18	$e^{\beta_{03} + \beta_{13}}$	0,32	$e^{\beta_{04} + \beta_{14}}$	0,41
3	1	$e^{\beta_{01} + \beta_{21} + \beta_{s1}}$	0,25	$e^{\beta_{02} + \beta_{22} + \beta_{s2}}$	0,00	$e^{\beta_{03} + \beta_{23} + \beta_{s3}}$	0,28	$e^{\beta_{04} + \beta_{24} + \beta_{s4}}$	0,44
3	2	$e^{\beta_{01} + \beta_{21}}$	0,11	$e^{\beta_{02} + \beta_{22}}$	0,00	$e^{\beta_{03} + \beta_{23}}$	0,19	$e^{\beta_{04} + \beta_{24}}$	0,33

Bl: Bloco; Tr: Tratamento; Est.: Estimativas

A partir das estimativas mostradas na Tabela 2, existe a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-5 quando alocado no bloco 1 (semana um do experimento) cuja genética é de alelos EF e EG (baixa produção de geleia real) foi $= 1/0,62 = 1,6$ vezes a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-1. Quando considerada a genética de alelos DE e EE (de maior produção de geleia real), a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-5 foi de $1/0,28 = 3,57$ vezes a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-1.

No bloco 2 (semana dois do experimento), a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-5, cuja genética é de alelos EF e EG (baixa produção de geleia real) foi $1/0,12 = 8,3$ vezes a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-1. Na genética de alelos DE e EE (maior produção de geleia real), a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-5 foi de $1/0,05 = 20$ vezes a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-1.

Nos espermatozoides do bloco 3 (semana três do experimento), a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-5, cuja genética é de alelos EF e EG (menor produção de geleia real) foi $1/0,25 = 4$ vezes a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-1. Para a genética de alelos DE e EE (maior produção de geleia real), a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-5 foi de $1/0,11 = 9$ vezes a chance de o sêmen ter grau de motilidade massal-1.

Quanto à comparação dos demais graus de motilidade, as estimativas contidas na **Tabela 2** mostram predominância de sêmen com escala de motilidade massal-5. Nota-se que esses resultados estão de acordo com o apresentado na **Figura 4**, que evidenciam uma alta proporção de sêmen com grau de motilidade massal-5, em particular para o bloco 2 e 3.

Sobrevivência espermática

Observou-se que a variabilidade e a sobrevivência de espermatozoides foram maiores no tratamento de alelos DE e EE (maior produção de geleia real), em relação à média, a qual apresenta-se de maneira similar em ambos os tratamentos - alelo EF e EG de baixa produção de geleia real: 176,10 espermatozoides vivos equivalente a 88,05% e alelos DE e EE de maior produção de geleia real: 177,40 espermatozoides vivos, equivalente a 88,7% (**Figura 5**).

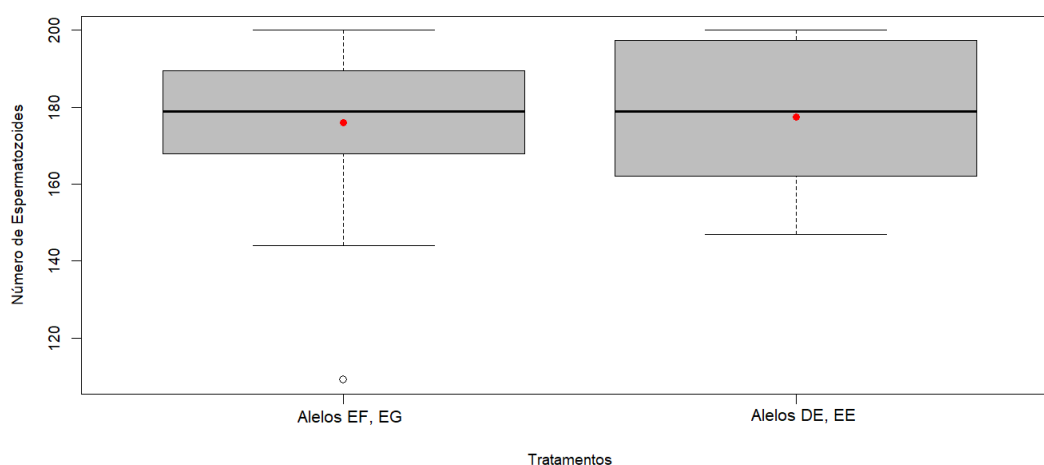


Figura 5. Número de espermatozoides vivos para cada tratamento, alelos EF e EG (menor produção de geleia real) com média de 176, 10 e alelos DE e EE (alta produção de geleia real) com média 177, 40, valor-p= 0,79.

O teste Kruskal-Wallis evidenciou que não houve diferenças significativas quanto a mortalidade de espermatozoides nem quanto a sobrevivência de espermatozoides por zangões de acordo com os tratamentos (p-valor = 0,88, p-valor = 0,79). Observa-se que o tratamento se apresenta não significativo, enquanto o bloco foi significativo (**Tabela 3**).

Tabela 3. Estimativas do modelo de regressão logística

Efeito	Estimativa	valor-z	valor-p
Constante	2,45	10,80	<0,05
T2	-0,02	-0,12	0,90
Bloco 2	-0,52	-1,94	0,05
Bloco 3	-0,97	-3,73	<0,05

T2: Tratamento de dois alelos de maior produção de geleia real.

Em termos de mortalidade, observa-se que a variável de tratamento se apresenta não significativa, mas que houve efeito do bloco (**Tabela 4**). A violação da pressuposição da falta de ajuste do modelo, tem-se que a hipótese não foi violada, mostrando que o modelo foi adequado para tal situação (p-valor = 0,74).

Tabela 4. Estimativas do modelo de regressão logística quanto a mortalidade

Efeito	Estimativa	valor-z	valor-p
Constante	-2,45	-10,80	<0,05
T2	0,02	0,12	0,90
Bloco 2	0,52	1,94	<0,05
Bloco 3	0,97	3,73	<0,05

T2: Tratamento de dois alelos de maior produção de geleia real.

Anormalidades morfológicas dos espermatozoides

A **Tabela 5** contém os resumos das medidas em geral, como das variáveis anormalidades presentes nos espermatozoides: cabeça solta (CS), cauda solta (FS); cauda bifurcada (FB) e cauda dobrada (FE), verificando-se que, em média, há um número superior de espermatozoides com cauda dobrada (FE).

A **Tabela 6** contém os valores médios das variáveis para cada tratamento, verificando-se que a maior média registrada para CS e FS foi no tratamento de um alelo de menor produção de geleia real, enquanto para FD e FE foram registradas no tratamento com dois alelos de alta produção. O teste Kruskal-Wallis evidenciou que não houve diferenças significativas quanto às anormalidades morfológicas CS, FS, FD e FE de acordo com o caráter genético (valor-p=0,48; valor-p=0,41; valor-p=0,16 e valor-p=0,24, respectivamente).

Tabela 5. Valores médios das variáveis em geral em estudo

Variáveis	Mínimo	1ºQuartil	Mediana	Média	3ºQuartil	Máximo
CS	0,00	1,00	2,00	2,98	4,00	12,00
FS	0,00	0,00	1,00	1,65	2,00	7,00
FB	0,00	1,00	3,00	4,67	6,25	20,00
FE	0,00	3,00	5,00	5,67	8,00	14,00

CS: Cabeça solta; FS: Cauda solta; FB: Cauda bifurcada; FE: Cauda enrolada

Tabela 6. Valores médios das variáveis por tratamento

	CS		FS		FB		FE	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1ºQuartil	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	2,00	2,00	4,50
Mediana	3,00	2,00	1,00	1,00	2,00	4,00	4,00	5,00
Média	3,40	2,60	1,76	1,55	4,40	4,92	5,12	6,18
3ºQuartil	5,00	4,00	2,00	2,00	5,00	7,00	8,00	7,50
Máximo	12,00	8,00	7,00	6,00	20,00	20,00	12,00	14,00

CS: Cabeça solta; FS: Cauda solta; FB: Cauda bifurcada; FE: Cauda enrolada

Em relação a análise descritiva uni variada, observou-se que para as variáveis cauda dobrada e cauda bifurcada em média, estas admitem uma maior quantidade de espermatozoides com estas anormalidades no caráter genético de alelos DE e EE de alta produção de geleia real. Já as variáveis cabeça solta e cauda solta em média, admitem uma maior quantidade de espermatozoides essas anormalidades no caráter genético de alelos EF e EG de baixa produção de geleia real. Na **Figura 6**, pode-se observar graficamente as anormalidades encontradas.

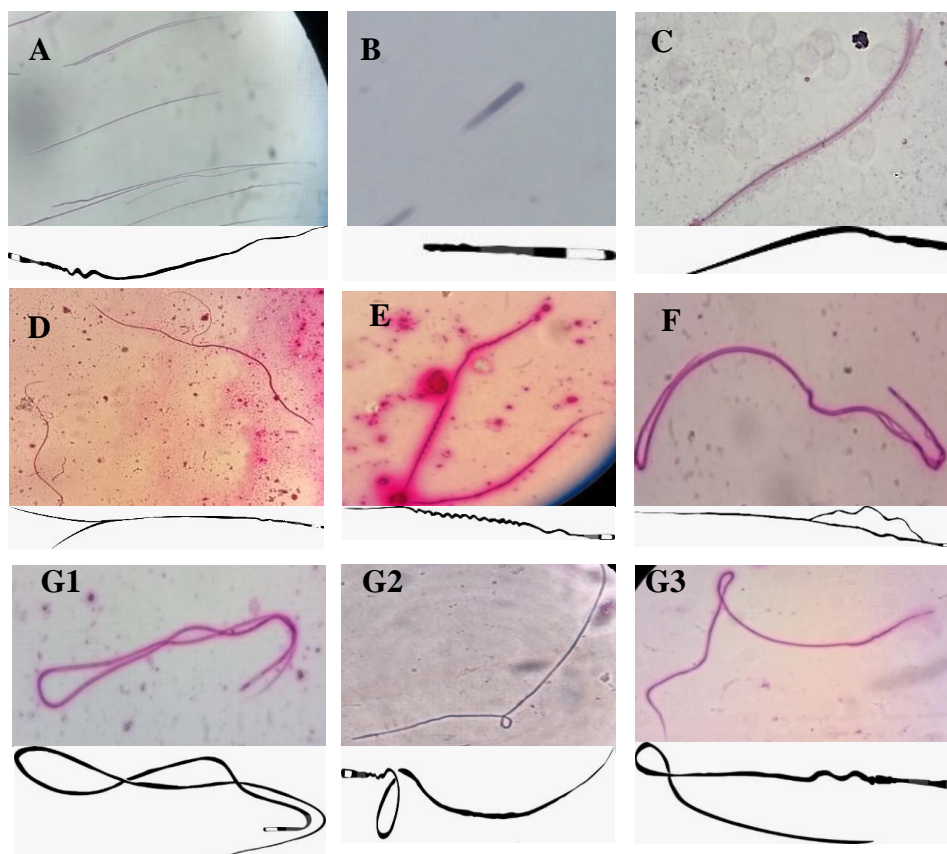


Figura 6. Anormalidades dos espermatozoides de *Apis mellifera* L. **A:** Padrão mais comum; **B:** Cabeça solta; **C:** Cauda solta; **D:** Cauda bifurcada; **E:** Cauda com estrutura alterada; **F:** Cauda em saca-rolha; **G1-G2-G3:** Caudas enroladas.

Discussão

Os resultados do volume do sêmen por zangão estão dentro do apresentado por outros autores (0,88 μ L até 1,8 μ L), este é inversamente proporcional com a idade de zangão, sendo de 1,02 μ L aos 15 dias e 0,88 μ L aos 30, quantidade que está relacionada a origem do zangão (operária ou rainha) e a suplementação da colônia (Czekońska et al. 2013, Gençer et al., 2014, Rousseau et al., 2015, Rousseau e Giovenazzo, 2016). Os fatores anteriores (idade e suplementação) foram homogêneos nos dois grupos testados, assim a ausência de diferença significativa entre os resultados confirma que a genética selecionada para produção de geleia real não influencia o volume do sêmen produzido por zangão.

A sobrevivência dos espermatozoides foi avaliada com eosina-nigrosina, a qual penetra nas membranas plasmáticas dos espermatozoides mortos, deixando sem corar os vivos, contudo, nem todos os vivos são viáveis. Para determinar a viabilidade é utilizado

o iodeto de propídeo (Blom 1950, Harry e Madden 1993, Valczircel et al. 1994) e, em zangões, as avaliações de viabilidade ou vitalidade variam entre 60 e 98% (Taylor et al. 2009, Gençer e Kahya 2011, Czekońska et al. 2013, Rousseau et al. 2015, Metz e Tarpay 2019).

Em pesquisa desenvolvida por Pintado et al. (2000) e Brito et al. (2003) avaliando sêmen bovino, observaram uma alta correlação ($r=0,83$; $P=0,009$ e $r=0,89$; $P<0,01$, respectivamente) entre a eosina/nigrosina (vivo/morto) e iodeto de propídeo (viável /inviável). Deve-se ponderar que as amostras com o uso de eosina é muito menor e não requer microscópio de fluorescência como no iodeto de propídeo (Williams e Pollak 1950).

O turbilhonamento espermático e as anormalidades morfológicas dos espermatozoides não foram muito relatadas anteriormente. A movimentação em massa é determinada pela quantidade de espermatozoides vivos e seu vigor, avaliada em espécies de maior concentração espermática (CBRA 2013). No presente estudo, os dados obtidos para o tratamento de alelos DE e EE de maior produção de geleia real têm uma maior chance de ter o máximo de movimento em massa do que o tratamento de alelos EF e EG de baixa produção de geleia real. O que representa espermatozoides com maior vigor e movimento que vão ter uma melhor possibilidade de migrar para a espermateca. Provavelmente, dentro do tratamento com dois alelos de produção de geleia real haja uma relação entre os alelos e o turbilhonamento.

As anormalidades que foram encontradas, evidenciaram que não houve diferença entre os tratamentos pelas mesmas condições anteriormente relatadas (não houve influência da genética, e a idade e suplementação foram homogêneas nos dois tratamentos). Por não existirem critérios oficiais para análises do sêmen de zangões, foram adaptados os critérios do manual de exame andrológico para mamíferos e peixes (CBRA 2013). No entanto, há uma diferença morfológica entre o espermatozoide do zangão e dos mamíferos, principalmente, no tamanho da cabeça, por isso, algumas anomalias das mesmas não podem ser identificadas. As anormalidades mais comuns foram cauda dobrada, cauda solta, cabeça solta e cauda bifurcada, mas também foram observados espermatozoides com cauda com estrutura alterada e cauda em espiral (**Figura 6**).

Finalmente, colônias com presença de alelos DE e EE de maior produção de geleia real, criaram zangões com um peso menor, fator que está relacionado com a baixa

qualidade espermática, e que é uma desvantagem para o voo nupcial (Szentgyörgyi et al., 2017). Contudo, neste estudo os resultados não apresentaram diferença significativa na qualidade do sêmen. Faz-se importante, no entanto, para que os zangões tenham um peso maior, que a colônia invista mais em coleta de alimento e trabalho das nutrizes para suprir a demanda do mesmo (Rortais et al. 2005, Mandla e Kumar 2016).

Observou-se que colônias com zangões mais leves conseguem criar mais zangões – em média, 1010 indivíduos - do que as de zangões mais pesados – em média, 840 indivíduos. Os valores foram tomados só para uma parte do total, o que poderia favorecer programas de melhoramento genético que utilizam inseminação instrumental, uma vez que seria possível obter-se uma maior quantidade de indivíduos que, mesmo sendo leves, apresentariam qualidade seminal similar à de zangões mais pesados.

Como a oferta da geleia pode variar entre os diferentes tipos de prole (rainha, operárias, zangões), embora a maior parte seja ofertada para a rainha (Haydak, 1970, Matsuka et al., 1973), nos resultados obtidos neste estudo, em cada um dos tratamentos as colônias possuíam o alelo E de maior produção de geleia real e, como a expressão deles nas abelhas nutrizes e a produção de geleia real das colônias não foram avaliadas, não é possível saber a quantidade de alimento fornecida as larvas de zangão. Fator esse que poderia explicar o motivo de não terem sido encontradas diferenças significativas na qualidade espermática, uma vez que as larvas de ambos os tratamentos podem ter sido alimentadas com quantidades similares de geleia real.

Como o desenvolvimento espermático acontece durante a fase de pré-pupa (Cruz-Landim et al., 1980), o mesmo é influenciado pela quantidade de alimento oferecido e pela temperatura do ambiente (Boes, 2010, Bienkowska et al., 2011, Wegener et al., 2012), dando suporte na influência dos blocos no tratamento, os quais foram o tempo, a variação de temperatura entre uma semana e outra, fatores esses que podem explicar sua influência nos resultados (dados não coletados). Por outro lado, o experimento foi desenvolvido no final do inverno e início da primavera, época que ofereceu uma boa disponibilidade de alimento, apresentado nos favos de pólen dentro das colônias e, assim, houve recurso suficiente para o desenvolvimento dos zangões dentro da colônia em condições semelhantes nos dois tratamentos.

O genótipo (com alelos EF e EG de baixa produção de geleia real e alelos DE e EE de maior produção de geleia real) não influenciou significativamente na qualidade do sêmen dos zangões de abelhas africanizadas. No entanto, está relacionado ao peso dos

zangões, isso porque as colônias com seleção para geleia real investem em criar uma maior quantidade de zangões com um peso menor. A maior produção de zangões pode ser uma vantagem, porque os zangões leves utilizam menos energia e, no meio-ambiente, existiriam em um maior número disponível para acasalar. Assim, em programas de melhoramento genético, usando inseminação instrumental, a maior disponibilidade de zangões com alelos desejáveis poderia ser usada para inseminar mais rainhas para seleção de colônias visando aumentar a produção de geleia real.

Referências

- Acassio dos Reis, V. D., e J. . Comastri Filho. 2003.** Importância da apicultura no pantanal sul-mato-grossense.
(<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81133/1/DOC56.pdf>).
- Amiri, E., K. Le, C. V. Melendez, M. K. Strand, D. R. Tarpy, e O. Rueppell. 2020.** Egg-size plasticity in *Apis mellifera*: honey bee queens alter egg size in response to both genetic. *J. Evol. Biol.* *In press*.
- Anderson, R. H. 1963.** The laying worker in the cape honeybee, *Apis mellifera capensis*. *J. Apic. Res.* 2: 85–92.
- Baitala, T. V., P. Faquinello, V. D. A. A. De Toledo, C. A. Mangolin, E. N. Martins, e M. C. C. Ruvolo-Takasusuki. 2010.** Potential use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies. *Apidologie.* 41: 160–168.
- Bieńkowska, M., B. Panasiuk, P. Wegrzynowicz, e D. Gerula. 2011.** The effect of different thermal conditions on drone semen quality and number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee. *J. Apic. Sci.* 55: 161–168.
- Blom, E. 1950.** A One-Minute Live-Dead Sperm Stain by Means of Eosin-Nigrosin. *Fertil. Steril.* 1: 176–177.
- Boes, K. E. 2010.** Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: An interplay of queen and worker decisions. *Insectes Soc.* 57: 1–9.
- Brito, L. F. C., A. D. Barth, S. Bilodeau-Goeseels, P. L. Panich, e J. P. Kastelic. 2003.** Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology.* 60: 1539–1551.
- CBRA. 2013.** Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal, p. 20–25, 85 e 90. Colégio Brasileiro de Reprodução animal (org.) 3 Ed. Belo Horizonte.
- Cobey, S. W. 2007.** Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie.* 38: 390–410.
- Cobey, S. W., D. R. Tarpy, e J. Woyke. 2013.** Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.* 52.
- Cruz-Landim, C., D. Beig, e R. L. M. S. De Moraes. 1980.** The process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, apidae). *Caryologia.* 33: 1–15.

- Czekońska, K., B. Chuda-Mickiewicz, e P. Chorbiński. 2013.** The influence of honey bee (*Apis mellifera*) drone age on volume of semen and viability of spermatozoa. *J. Apic. Sci.* 57: 61–65.
- Echevarría, A. I. e Miazza, R. 2002.** El ambiente en la producción animal. (http://www.produccionanimal.com.ar/clima_y_ambientacion/01el_ambiente_en_la_produccion_animal.pdf).
- FAO. 2015.** Bee products: providing nutrition and generating income- Honeybees, beekeeping and bee products in our daily lives. (<http://www.fao.org/fsnforum/activities/discussions/beekeeping%3E>).
- Gardner, A., J. Alpedrinha, e S. A. West. 2012.** Haplodiploidy and the evolution of eusociality: Split sex ratios. *Am. Nat.* 179: 240–256.
- Gençer, H. V., Y. Kahya, e J. Woyke. 2014.** Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. *Apidologie.* 45: 757–770.
- Harry August Herman, e F. W. Madden. 1993.** Evaluation of semen-live-dead(Vital)stainig, p. 81–83. *In* Interstate publishers (org.), *Artif. Insemin. embryo Transf. dairy beef cattle.* Danville.
- Haydak, M. 1970.** Honey Bee Nutrition1. *Annu. Rev. Entomol.*15: 143-156.
- Kleinbaum, D. G., e M. Klein. 2002.** Logistic regression. p. 701. *In* Springer-Verlag New York.
- Maleszka, J., A. B. Barron, P. G. Helliwell, e R. Maleszka. 2009.** Effect of age , behaviour and social environment on honey bee brain plasticity. *J. Comp. Physiol. A.* 195: 733–740.
- Mandla, R., e N. R. Kumar. 2016.** Comparison of carbohydrates in the worker, drone and queen brood food of *Apis mellifera* during spring. *J. Glob. Biosci.* 5: 3765–3768.
- Matsuka, M., N. Watabe, e K. Takeuchi. 1973.** Analysis of the food of larval drone honeybees. *J. Apic. Res.* 12: 3–7.
- Metz, B. N., e D. R. Tarpy. 2019.** Reproductive senescence in drones of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insects.* 10. pii:E11.
- Michener, C. 2007.** Development and reproduction, p. 6–8. *In* Press, T. Johns H. university (org.), *Bees world.* Baltimore.
- Montgomery, D. C. 2017.** Design and analysis of experiments. p. 717. *In:* John Wiley & Sons, Hoboken.
- Oberlander, G., L. D. S. Murgas, M. G. Zangeronimo, A. C. Silva, L. J. Pereira, e R. A. L. Muzzi. 2012.** Comparison of two different methods for evaluating boar semen morphology. *Arch Med Vet.* 205: 201–205.
- Oldroyd, B. P., M. H. Allsopp, R. S. Gloag, J. Lim, L. A. Jordan, e M. Beekman. 2008.** Thelytokous parthenogenesis in unmated queen honeybees (*Apis mellifera capensis*): Central fusion and high recombination rates. *Genetics.* 180: 359–366.
- Paula, G. A. 2004.** Modelos de regressão: com apoio computacional. p. 428. *In:* IME-USP, São Paulo.
- Pintado, B., J. De La Fuente, e E. R. S. Roldan. 2000.** Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: Accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.* 118: 145–152.
- Polkovnikova, V. I., e N. S. Pershina. 2017.** Efficiency of instrumental insemination use of bee queens. *Agriculture.* 4(58): 160-163.
- R development Core Team. 2014.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna.

- Rortais, A., G. Arnold, M.-P. Halm, e F. Touffet-Briens. 2005.** Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*. 36: 71–83.
- Rousseau, A., V. Fournier, e P. Giovenazzo. 2015.** *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *Can. Entomol.* 147: 702–711.
- Rousseau, A., e P. Giovenazzo. 2016.** Optimizing drone fertility with spring nutritional supplements to honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Econ. Entomol.* 109: 1009–1014.
- Swanson, E. W., e H. J. Bearden. 1951.** An Eosin-Nigrosin stain for differentiating Live and dead bovine spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 10: 981–987.
- Szentgyörgyi, H., K. Czekońska, e A. Tofilski. 2017.** The effects of starvation of honey bee larvae on reproductive quality and wing asymmetry of honey bee drones. *J. Apic. Sci.* 61: 233–243.
- Taylor, M. A., E. Guzmán-Novoa, N. Morfin, e M. M. Buhr. 2009.** Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*. 72: 149–159.
- Valczircel, M. A., de las Heras, L. Perez, D. F. Moses, e H. Baldassarre. 1994.** Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*. 41: 483–488.
- Gençer, V. H., e Y. Kahya. 2011.** Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *J. Apic. Res.* 50: 130–137.
- Wegener, J., T. May, U. Knollmann, G. Kamp, K. Müller, e K. Bienefeld. 2012.** In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology*. 65: 126–131.
- Williams, W. W., e O. J. Pollak. 1950.** Study of sperm vitality with the aid of Eosin-Nigrosin stain. *Fertil. Steril.* 1: 178–181.

APÊNDICE

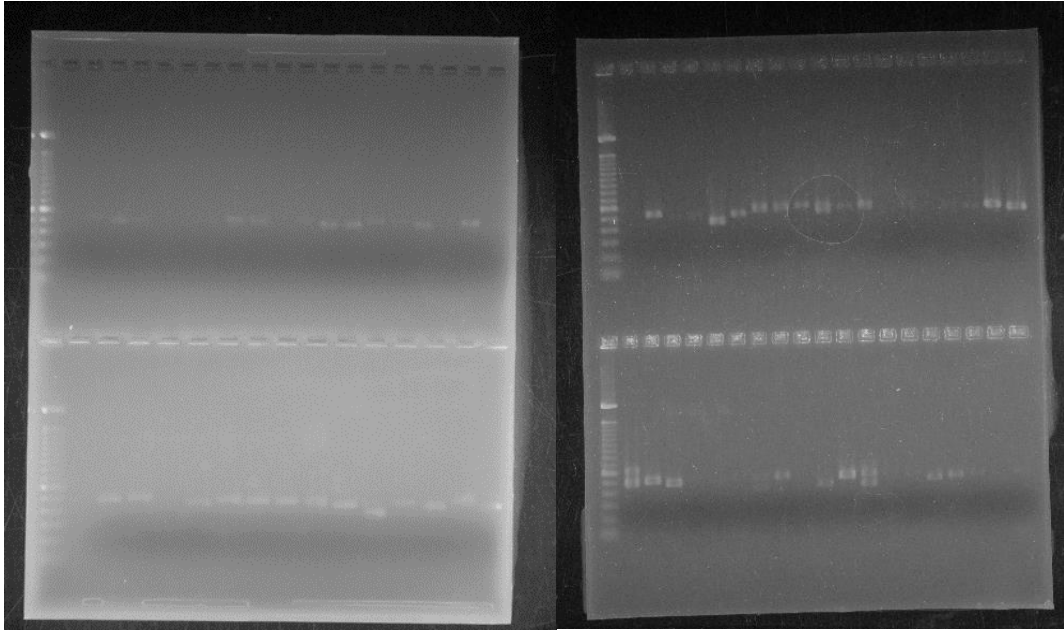


Figura 1. Géis de eletroforese para identificar alelos da MRJP3 presentes em colônias matrizes de *Apis mellifera* L.

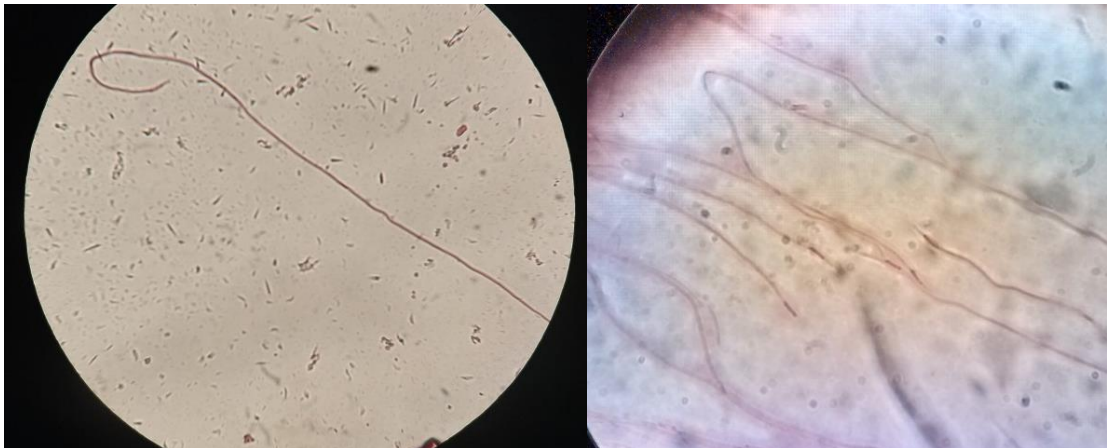


Figura 2. Espermatozoides mortos corados com eosina-nigrosina.

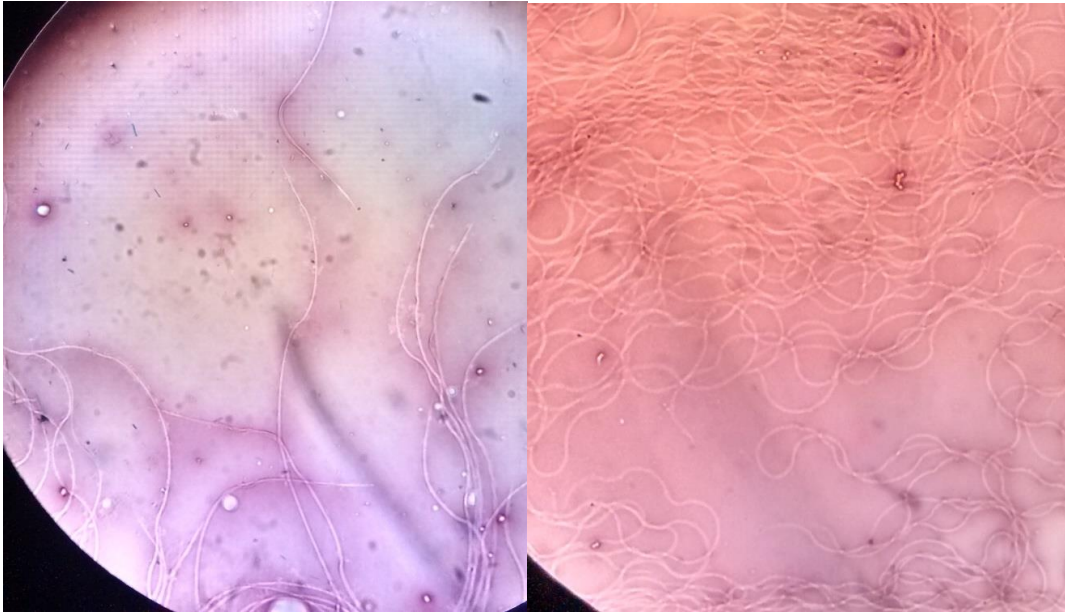


Figura 3. Espermatozoides vivos sem corar com eosina-nigrosina.



Figura 4. Espermatozoides corados com Rosa de Bengala 3%, para identificar anomalias.

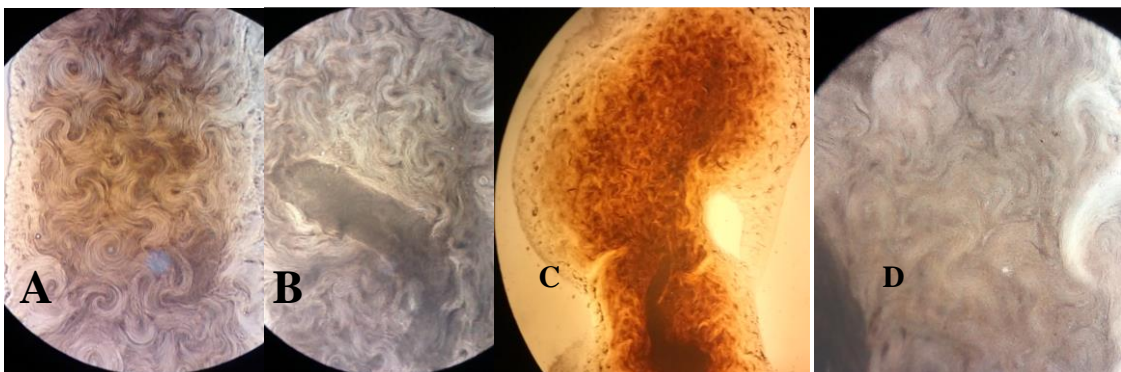


Figura 5. Turbilhonamento do sêmen de zangão (A: Categoria 5; B: Categoria 4; C: Categoria 3 e D: Categoria 1).

Protocolo de extração de DNA de *Apis mellifera* L.

Coleta do material biológico

Coletar abelhas próximas a emergir utilizando pinças para desocpercular os alvéolos onde as abelhas estarão alocadas. Armazená-las em tubos falcon devidamente rotulados com o número da colônia contendo álcool 70%, armazenar no freezer a -20 °C imediatamente após a coleta e deixar durante 24 horas. Posteriormente, trocar o álcool de 70% para 100%, deixando as amostras no freezer a -20 °C até o momento da extração.

Extração e quantificação do DNA genômico

Retirar as amostras do freezer e, com ajuda de tesoura de íris, preparar o material a usar (o tórax da abelha sem estruturas anexas como asas e pernas), posteriormente, tirar o excesso de álcool com água destilada e macerar em Eppendorf contendo 300 µL do tampão de lise (200 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA pH 8,0, 250 mM de NaCl e 0,5 % de SDS) e 8 µL de proteinase K (40 µg/µL).

As amostras se mantêm no banho Maria em torno de 59 °C durante uma hora, sendo misturadas gentilmente a cada 10 minutos. Passado o tempo, centrifugar as amostras por 15 minutos a 12000 RPM e 24 °C. Coletar o sobrenadante em novo tubo de Eppendorf devidamente marcado e realizar a purificação do DNA através de dos ciclos de lavagens com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) 300 µL/amostra, centrifugando cada ciclo a 12000 RPM durante 15 minutos a 24 °C, utilizando só o sobrenadante em cada um deles. Posteriormente, precipitar os ácidos nucléicos utilizando acetato de sódio (3M) e etanol absoluto gelado na proporção de 0,25:2,5 em relação ao volume recuperado, deixando a -20 °C da noite para o dia.

Para a separação do DNA precipitado, centrifugar a solução a 12000 RMP por 15 minutos a 4 °C, utilizar uma solução tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para ressuspender o DNA e posteriormente tratar com 3 µL de RNase (10 µg/mL. Para quantificar o DNA realizar uma estimativa através da comparação de concentrações conhecidas e graduadas de DNA-padrão (phago λ), feito no *NanoDrop Lite spectrophotometer*). Para determinar a integridade DNA as amostras se avaliaram em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA, pH 8,0).

Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta; a imagem foi capturada pelo sistema *Ultraviolet*

Transilluminador High Performance - Edas 290, utilizando o programa *Kodak 1 D Image Analysis 3.5*.

Amplificações de PCR

As reações de PCR se realizam usando o primer específico sintetizado para amplificar as regiões repetitivas do loci *mrjp3* (forward: ATG TAA TTT TGA AGA ATG AAC TTG; reverse: TGT AGA TGA CTT AAT GAG AAA CAC) (Albert et al., 1999b). Para cada amostra preparar 20 μ L de tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 0,5 μ M do primer, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), uma unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) como volume de reação. No PCR, adotar as concentrações de MgCl₂ (1,7 mmol/L) e de DNA (10 ng/ μ L) determinadas em relação ao primer para a amplificação dos loci *mrjps* de abelhas *Apis mellifera* africanizadas.

As condições de amplificação para o primer MRJP3 foram feitas seguindo o método descrito por Albert e Schmitz (2002), utilizando um termociclador Techne TC-512, iniciou-se com uma desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, seguido de 30 ciclos de 30s na mesma temperatura, logo 30s a 54 °C e 60s a 72 °C. A reação foi completada com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. O produto do processo anterior se separou em gel de agarose 2%, preparado com tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). O gel foi feito com 50% de agarose comum e 50% de agarose MS-8 (BioAmerica-Inc). A separação foi realizada a 60 Volts por 5 horas, posteriormente, foi corado com banho de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e as bandas de DNA amplificadas foram visualizadas sob luz ultravioleta. A imagem foi capturada pelo sistema *Ultraviolet Transilluminador High Performance - Edas 290*, utilizando o programa *Kodak 1 D Image Analysis 3.5*. Para estimar o tamanho dos alelos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen).

Para determinar a presença dos alelos da MRJP3 nas colônias, as amostras se avaliaram em gel de agarose 1,7% feito com 50% de agarose comum e 50% de MetaPhor agarose. A separação foi feita a 60V com tampão TBE 1X (Tris, Ácido Bórico, EDTA 0,5mM pH 8,0).

Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e as bandas dos alelos de MRJP3 presentes no DNA visualizadas sob luz ultravioleta, foi também utilizado ladder de 100 bp para determinar o tamanho dos alelos amplificados; a imagem

foi capturada pelo sistema *Ultraviolet Transiluminador High Performance - Edas 290*, utilizando o programa *Kodak 1 D Image Analysis 3.5*.

Normas da revista

JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY

Entomological Society of America

Issues Advance articles Special Collections Submit ▼ Purchase About ▼

All Journal of Economic Entomology ▼ Advanced Search

Manuscript Preparation

- New Submissions
- Publication Ethics
- Experimental Ethics
- Article Types
- Title Page
- Body
- References
- Tables
- Figures
- Supplementary Material
- Species Authority, Order, Family, and Common Names
- Statistics
- Model Analysis, Guidelines, Equations, and Computer Code
- Gene Sequencing
- Datasets Deposited in Third-Party Repositories

Journal of Integrated Pest Management

First Impact Factor Announced: 2.333

LEARN MORE

Latest	Most Read	Most Cited
Artemisia frigida (Asterales: Asteraceae)		
Improves the Growth of Grasshopper		
Calliptamus abbreviatus and Increases		

About the journal

Journal of Economic Entomology the most-cited entomological journal – publishes articles on the economic significance of insects and other arthropods and includes sections on apiculture & social insects, insecticides, biological control, household & structural insects, crop protection, forest entomology, and more. In addition to research papers, *Journal of Economic Entomology* publishes Reviews, interpretive articles in a Forum section, Short Communications, and Letters to the Editor. The journal is published bimonthly in February, April, June, August, October, and December.

[Sign up for email alerts](#) to keep up with the latest content from *Journal of Economic Entomology*.

New Submissions

Formatting

For new submissions, our formatting requirements are simple—just make sure your paper has the following items:

- Continuous line numbers
- Double-spaced lines
- A title page and abstract in the main document

- A main document in a doc, docx, tex (converted to PDF for review), or rtf file type
- Tables in a Word document (we cannot accept Excel files, unless they are supplementary files)
- Figure and table legends in the main document
- All coauthors entered into the online review system (email addresses required)

Please note there are more formatting guidelines for revised versions, as those are closer to being accepted (see the Revised Versions section of these author instructions).

- References listed in alphabetical order, cited by author and year in the text (not numbered)
- Figures and tables at the end of the main document after the references or uploaded as separate files. Figure legends should be included at the end of the main text after the references, and table legends should be next to their corresponding tables
- Text is single-column

Article types and lengths

- Research article: No limit (under 7500 words recommended)
- Review: No limit
- Forum: No limit
- Short Communication: 2,000 words or less (not including abstract, references, or figure and table legends)
- Letter to the Editor: 2,000 words or less

For explanations of the different article types, please see the Article Types section of these author instructions.

Language

- English. A second abstract in a second language is permitted. Authors are responsible for the accuracy of non-English abstracts.
- Manuscripts with poor English that would not be understandable for reviewers will be withdrawn before review. Those authors are encouraged to pursue English-language assistance from a native speaker or editing service before resubmitting their paper. Having a paper in good English makes it easier for editors and reviewers to focus on the scientific merits of the paper. For more information on language editing, please see the Language Editing section of these author instructions.

Acceptable file type

- Main document: doc, docx, rtf
- Tables: Editable tables at the end of the main document. xls andxlsx files are not accepted (except as supplementary files)
- Figures: tif (preferred), eps (preferred), rtf, doc/docx, ppt/pptx, pdf, ps, psd, ai, gif, png
- Supplementary files: Most file types accessible to users. Extremely large files should be uploaded in a third-party repository.

Page charges

In order to publish in JEE, authors are required to pay page charges or an Open Access fee. ESA members are exempt from page charges and receive a discount on the Open Access fee. For more information, including pricing, please visit the [Charges and Licensing](#) page.

Plagiarism and text recycling

All submitted papers are evaluated for excessive direct copying through CrossRef's Ithenticate service. Papers should be written in the authors' own words. Direct copying of sentences or paragraphs, even if the original source is cited or if it is your own previous work, is unacceptable (although some overlap is expected in materials and methods). For more information, please see the Publication Ethics section of these author instructions.

Theses, dissertations, and pre-prints

If your paper (or a previous version of it) was posted on a pre-print server or is part of a thesis or dissertation that has been published online or in an institutional repository, please note this in your cover letter so that it won't be flagged for plagiarism.

CrossRef Funding Data Registry

In order to meet funder requirements, authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about CHORUS, visit the [CHORUS initiative](#).

Previous rejections

Papers that have been rejected from one ESA journal cannot be resubmitted to any other ESA journal. Papers that have been withdrawn can be resubmitted to the same journal or another ESA journal. Authors whose papers have been rejected are entitled to appeal their rejection to the journal's editorial board. More information on the appeals process can be found on the [Journal Policies](#) page.

Statistics and sample size

Statistics should be fully reported (i.e., F-value, both degrees of freedom [treatments and replicates], and exact P-value [unless it's less than 0.001]). Furthermore, the paper will be withdrawn if Duncan's Multiple Range Test is used for papers that do not deal with plant resistance. For more information on statistics, please see the Statistics section of these author instructions.

Papers that have insufficient sample sizes (e.g., only a single year of data collected at one location for either insect surveys, pesticide studies, or other field data) are immediately withdrawn. The duration and size of trials/sampling must be biologically significant.

Plant extract papers

For papers that test the efficacy of plant extracts or other compounds on control or behavior modification of insects, the concentrations of the chemical constituents must be listed.

Personal communications

Personal communication citations should be accompanied by a letter from the person being cited giving permission to use him or her as a citation and verifying the claim being cited. This letter should be uploaded as a supplementary file.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly. Standard abbreviations for measurements according to Scientific Style and Format, 8th edition, are acceptable, as well as common abbreviations that improve the readability of a manuscript (e.g., DNA, PCR). All other abbreviations used should be defined at the first use.

Publication Ethics

JEE is committed to ethical behavior in all aspects of scholarly publishing. Please ensure your paper meets the following ethical criteria:

- The author list is complete and correct. Please see the “[Journal Policies](#)” page for authorship information and policies.
- No portions of text are directly copied from other sources, including one’s own previous papers (although some overlap is tolerated in materials and methods). Direct quotes should be placed in quotation marks. All manuscripts undergo a plagiarism test before they are sent out for review.
- The data have not been published elsewhere. Data published in another paper, including in a paper in another language, may not be published again. If portions of data published previously are being used, the author must provide explicit written consent from the publisher of the previous paper to reuse the data.

Experimental Ethics

Research published in JEE must adhere to minimal ethical and compliance requirements for medical, veterinary, and wildlife conservation research. Medical entomology research may include human subjects and/or domestic and wild animals and therefore requires that authors reference compliance protocols to indicate adherence to federal, state, and local regulations, permits, and authorizations. International authors should reference similar compliance documents from their government and/or institution. Listed below is a minimal series of basic requirements requested from USA and international researchers to be included, as needed, within an ethical section positioned in the Materials and Methods section of each manuscript:

1. Biological Use Authorization (BUA). Surveillance, epidemiological, and experimental infection studies with pathogens require containment for diagnostics and culture depending upon the virulence of the organism and the risk of vectorborne, contact, and/or aerosol transmission. [Descriptions of appropriate containment for different biosafety levels.](#) A search engine and database to determine the Risk Group of the organism[s] concerned can be found [on this page.](#) Researchers should report their institution’s required compliance review and approved containment level BUA protocol for the pathogen(s) or arthropods used.

2. Institutional Review Board (IRB) compliance. Use of human subjects in research must be approved by IRB committees adhering to [US Department of Health and Human Services guidelines](#). Each organization may have different interpretations of guidelines required for human subject activities which may range from surveys, house entry for arthropod collection, use of humans to feed arthropods, use of humans as bait for sampling host-seeking insects, test subjects for candidate repellents, etc.¹
3. Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) compliance. Use of animals in research must adhere to protocols meeting minimal ethical requirements for collection, maintenance, and experimental procedures. Research done within the USA or funded by USA agencies must adhere to [requirements described by the US National Institutes of Health](#), and these protocols should be appropriately referenced.
4. Sampling wildlife. Most countries and states/provinces/districts require permits to collect vertebrate animals and some insects for research purposes. This is especially true for migratory species, such as birds, where international agreements are in place; for example, see [permitting requirements for collecting and banding birds in North America](#).
An example of state permits required for taking or trapping and release of wildlife within California can be found at [on this page](#). Additional permits may be required for sampling on wildlife refuges or nature conservatory properties. Reference to these permits should be required to ensure sampling was done in compliance with regional oversight, especially for endangered or threatened species.
5. Transport and release of organisms. With the increasing use of genetically modified arthropods for population or pathogen control, medical entomologists must adhere to correct oversight governing production and release. The US Department of Agriculture has [strict requirements](#) for the transport and/or release of organisms as well as experimental use permitting for applications of experimental compounds for arthropod control.
The Biotechnology Quality Management System (BQMS) Program within the USDA helps organizations, including small businesses and academic researchers, analyze the critical control points within their management systems to better maintain compliance with the APHIS regulations (7 CFR part 340) for the import, interstate movement, and field release of regulated genetically engineered (GE) organisms.

¹Aultman, K. S., E. D. Walker, F. Gifford, D. W. Severson, C. B. Beard, and T. W. Scott. 2000. Managing risks of arthropod vector research. *Science* 288: 2321-2322.

Conflicts of interest

Potential conflicts of interest include any relationships of a financial or personal nature between an author or coauthor and individuals or organizations which, in theory, could affect or bias an author's scientific judgment, or limit an author's freedom to publish, analyze, discuss, or interpret relevant data. Sources of financial support originating outside the coauthors' home institution(s) for any aspect of a study must be indicated in the Acknowledgments section of the paper. Financial support includes not only funding, but gratis provision of materials, services, or equipment. Any additional potential conflicts of interest, not covered in the acknowledgments of financial support, must be revealed to the editor at submission, and disclosed in a statement immediately following the Acknowledgments.

If an author or coauthor has entered into an agreement with any entity outside that authors' home institution, including the home institution of another coauthor, giving that entity veto power over publication of the study or over presentation, analysis, discussion, or interpretation of any results of the study, whether or not such veto power was exercised, this information must be disclosed in a statement immediately following the Acknowledgments.

Article Types

Research

Research articles report original observations and experiments, the results of the experiment, and a discussion of the significance of the results. There is no word limit for research articles.

Review

Review articles review and synthesize current information on a topic. Review articles can also contain historical threads of important ideas (i.e., are not confined to recent citations). There is no word limit for review articles.

Forum

Forum articles are authored by acknowledged leaders in the field, review a research area, and include a stimulating, thought-provoking discussion that focuses on important, and sometimes controversial, issues. They should provide an innovative approach to current thought and speculate about future research directions.

Short Communications

Short communications should be similar to a research article, but with briefer Materials and Methods and Discussion. Total length should be 2,000 words or less.

Letter to the Editor

JEE will consider submissions in the form of a letter to the editor in which the authors express their viewpoint on scientific issues. Appropriate content can include comments or criticisms in reference to a published paper, whether or not in an ESA journal, or comments and opinions unrelated to a specific published paper. A letter will be limited to 2,000 words, 10 references, and one table or figure. The Editor-in-Chief (EIC) will judge whether a submitted letter merits consideration for potential publication based on relevance, inherent interest, and coherence of the submission, but with a view to allowing a range of opinions to be expressed. If the EIC considers the submission to be suitable in principle, he/she will send it to at least one anonymous reviewer for comments and will edit it for style and appropriate language before returning it to the corresponding author for revisions. More information on letters to the editor can be found on our Journal Policies page.

Title Page

The title page should include:

1. Corresponding author: Include full name, mailing address, telephone number, and email address.
2. Title: Should be as short as possible. Only include common names that are listed in the ESA Common Names of Insects & Related Organisms. Do not include authors of scientific names. Insert “([Order]: [Family])” immediately after the name of the organism.
3. Author list: Include all authors in the order the names should be published.
4. Affiliation line: Include full addresses of all authors. If there are multiple affiliations, designate through numbered footnotes.
5. Abstract
 - a. 250 words or less.
 - b. Give scientific name and authority at first mention of each organism.
 - c. Do not cite references, figures, tables, probability levels, or results.
 - d. Refer to results only in the general sense.
 - e. A second abstract in a second language is permitted.
6. Keywords
 - a. Below the abstract, provide three to five keywords, separated by commas.
 - b. Do not use abbreviations, combined keywords, or species names.

[Sample title page.](#)

Body

Introduction

Clearly state the basis of your study along with background information and a statement of purpose.

Materials and Methods

Include a clear and concise description of the study design, experiment, materials, and method of statistical analysis.

Results

Clearly present the results. Do not include interpretation of results or interpretation of statistical analysis—simply present the results of the experiment and the results of the statistical analysis. Data listed in tables should not be listed in the results; instead, refer to the table.

Discussion

Interpret and discuss results of the study and their implications. Include suggestions for direction of future studies, if appropriate.

Acknowledgments

Place the acknowledgments after the text. Organize acknowledgments in paragraph form in the following order: persons, groups, granting institutions, grant numbers, and serial publication number.

Following the Acknowledgments, you may include a statement of author contribution outlining the specific contributions of each author to the article. A statement of author contribution is welcomed but not required.

References

- EndNote style is “Environmental Entomology,” and Reference Manager style is “Journal of Medical Entomology.”
- Only cite published or formally accepted (in press) articles, not submitted articles.
- References should be in alphabetical order. If multiple references from the same author are cited, those references should be in chronological order.
- Abbreviate journal titles according to the most recent issue of BIOSIS Serial Sources.
- For non-English titled journals that are cited in the references, the title of the journal should be spelled out.
- Systematics-related articles may specify that all serial titles be spelled out for final publication.
- **Sample reference styles**

Journal Articles

Evans, M. A. 2000. Article title: subtitle (begin with lowercase after colon or dash unless first word is a proper noun). J. Abbr. 00:000–000.
 Evans, M. A. 2001a. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.
 Evans, M. A., and R. Burns. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.
 Evans, M. A., and A. Tyler. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.
 Evans, M. A., A. Tyler, and H. H. Munro. 2000. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.
 Evans, M. A., R. Burns, and A. A. Dunn. 2001. Article title. J. Abbr. 00: 000–000.

In Press

Evans, M. A. 2002. Article title. J. Econ. Entomol. (in press).

Books

Burns, R. 2001. Title (initial cap only): subtitle (no initial cap after colon). Publisher, city, state abbreviation or country.
 Evans, M. A. 2001. Colorado potato beetle, 2nd ed. Publisher, city, state abbreviation or country.
 Tyler, A. 2001. Western corn rootworm, vol. 2. Publisher, city, state abbreviation or country.

Article/Chapter in Book

Tyler, A. 2001. Article or chapter title, pp. 000–000. In T.A.J. Royer and R. B. Burns (eds.), Book title. Publisher, city, state abbreviation or country.
 Tyler, A., R.S.T. Smith, and H. Brown. 2001. Onion thrips control, pp. 178–195. In R. S. Green and P. W. White (eds.), Book title, vol. 13. Entomological Society of America, Lanham, MD.

No Author Given

(USDA) U.S. Department of Agriculture. 2001. Title. USDA, Beltsville, MD.
 (IRRI) International Rice Research Institute. 2001. Title. IRRI, City, State or Country.

Patents

Harred, J. F., A. R. Knight, and J. S. McIntyre, inventors; Dow Chemical Company, assignee. 1972 Apr 4. Epoxidation process. U.S. patent 3,654,317.

Proceedings

Martin, P. D., J. Kuhlman, and S. Moore. 2001. Yield effects of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) feeding, pp. 345–356. In Proceedings, 19th Illinois Cooperative Extension Service Spray School, 24–27 June 1985, Chicago, IL. Publisher, City, State.
 Rossignol, P. A. 2001. Parasite modification of mosquito probing behavior, pp. 25–28. In T. W. Scott and J. Grumstrup-Scott (eds.), Proceedings, Symposium: the Role of Vector-Host Interactions in Disease Transmission. National Conference of the Entomological Society of America, 10 December 1985, Hollywood, FL. Miscellaneous Publication 68. Entomological Society of America, Lanham, MD.

Theses/Dissertations

James, H. 2001. Thesis or dissertation title. M.S. thesis or Ph.D. dissertation, University of Pennsylvania, Philadelphia.

Software

SAS Institute. 2001. PROC user's manual, version 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.

Online Citations

Reisen, W. 2001. Title. Complete URL (protocol://host.name/path/file.name) and/or DOI (Digital Object Identifier)

Tables

- Tables should be editable tables in a Word document.
- If a table continues on more than one page, repeat column headings on subsequent page(s).
- All columns must have headings.
- Leave no space between lowercase letters and their preceding values (e.g., 731.2ab).

- Do not footnote the title—use the unlettered first footnote to include general information necessary to understand the title (e.g., define terms, abbreviations, and statistical tests).
- Use approved abbreviations or abbreviations already defined in the text and define others in the general footnote.
- Use the following abbreviations in the body or column headings of tables only: amt (amount), avg (average), concn (concentration), diam (diameter), exp (experiment), ht (height), max (maximum), min (minimum), no. (number), prepn (preparation), temp (temperature), vs (versus), vol (volume), wt (weight) Jan (January), Feb (February), Mar (March), April, May, June, July, Aug (August), Sept (September), Oct (October), Nov (November), and Dec (December).

[Sample table](#)

Figures

- Figures should be at least 300 dpi, or 1200 dpi for line graphs.
- The quality in which figures are submitted is the quality in which they will print—please ensure figures are high quality.
- The following file types of figures are accepted: tif (preferred), eps (preferred), rtf, ppt/pptx, pdf, ps, psd, ai, gif, png. Figures should be in their native format for best quality.
- Figures should be prepared in CMYK color.
- Maximum height: 240 mm.
- Maximum width (one-column figure): 82 mm.
- Maximum width (two-column figure): 171 mm.
- All authors are required to pay additional charges for color figures. Authors may elect to publish in grayscale in print and in color online for no charge.
- For more information on preparing figures, see OUP's Author Resource Centre on [figures](#).

Authors are encouraged to submit a graphical abstract as part of the article, in addition to the text abstract. The graphical abstract should clearly summarize the focus and findings of the article, and will be published as part of the article online and in PDF. The graphical abstract should be submitted for peer review as a separate file, selecting the appropriate file-type designation in the journal's online submission system. The file should be clearly named, e.g. *graphical_abstract.tiff*. See [this page](#) for guidance on appropriate file format and resolution for graphics. Please ensure graphical abstracts are in landscape format.

Note that graphical abstracts will be subject to any print reproduction charges that the journal levies for colour figures.

Supplementary Material

Supplementary Material may be submitted in the form of one or more files to accompany the online version of an article. Such material often consists of large tables, data sets, or videos that are not possible or convenient to present in print media. Supplementary Material represents substantive information to be posted on the ESA journal website that enhances and enriches the information presented in the main body of a paper; however, the paper must stand on its own without the need for the reader to access the supplementary

information to understand and judge the merits of the paper. All Supplementary Material must be provided at the time of manuscript submission and will be distributed to reviewers as part of the normal peer-review process. It will not be edited during production and will be published as submitted.

Supplementary Material should be:

- Referenced in the body of the main paper (e.g., Supp. Table S1), where a link will take the online reader to the file.
- Be labeled with an appropriate title and caption.
- Citations for any literature referenced within a Supplementary Material file should be listed in a References Cited section at the end of the file, even when a citation is duplicated in the main body of the paper.
- Videos should be kept to a reasonable size to facilitate downloading by readers.

Species Authority, Order, Family, and Common Names

- Authors should provide the authority, order, and family for all organisms that are central to the paper (including plants, bacteria, and other non-arthropod organisms) at the first mention of the organism. It is the author's responsibility to provide accurate authority, order, and family information. Organisms mentioned in passing or whose importance to the paper is limited do not need to have full authority, order, and family listed, nor do mentions of common names of groups (e.g., mosquitoes, beetles, ticks, etc.).
- If a species name is included in the title of a paper, either the ESA-approved common name or the Latin name, the order and family should also be provided. If the order and family of an organism is provided in the title of the paper, it does not need to be provided again in the abstract and main text.
- If an organism is not listed in the title but is central to the paper, the order and family should be provided at first mention of the organism in both the abstract and the main text.
- The taxonomic authority of an organism that is central to the paper should be given the first time the organism is mentioned in both the abstract and the main text, but not in the title. For tables that include lists of species, authority should be given for each species if it is the first time it is being mentioned in the paper.
- If multiple organisms in the same genus are central to the paper, order and family only need to be provided for the first species mentioned in the genus. If multiple organisms are central to the paper, are in different genera, but are in the same order and family, order and family should be provided at first mention of each organism.
- If two organisms that share the same order and family are mentioned in the title or listed in the text of the paper together, the order and family should be placed after the first species listed and does not need to be repeated after the second species.
- A genus can be abbreviated after the first mention (except to start a sentence, in which case the genus should be spelled out). If two species belong to different genera but the genera start with the same letter, the first two letters can be used for abbreviations.
- Only [ESA approved common names](#) should be used. Common names are lower case, except for proper nouns and their derivations.

Statistics

All data reported (except for descriptive biology) must be subjected to statistical analysis. Results of statistical tests may be presented in the text, in tables, and in figures. Statistical methods should be described in Materials and Methods with appropriate references. Descriptions should include information such as sample sizes and number of replications. Only t-tests, Chi square, and analyses of variance require no citation. Cite the computer program user's manual in the References Cited.

Probit/logit

When presenting results of probit/logit analysis, the following columns should be included in tables in the following order (left to right); n, slope + SE, LD (or LC) (95% CL), and chi-square. When a ratio of one LD versus another is given, it should be given with its 95% CI. Statistical tests to show what model best fits data intended to estimate the 99.9986% level of effectiveness should be presented to justify use of any model, including the probit model. Thus, we do not recommend use of the Probit 9 without tests to show that the probit model fits the data.

Analysis of Variance or t-test

When presenting the results of analysis of variance or a t-test, specify F (or t) values, degrees of freedom, and P values. This information should be placed in parentheses in the text. Example: (F = 9.26; df = 4, 26; P < 0.001). If readability of the text is affected by the presence of repeated parenthetical statistical statements, place them in a table instead.

Regression

In regressions, specify the model, define all variables, and provide estimates of variances for parameters and the residual mean-square error. Italicize variables in equations and text.

Variance and sample size

Include an estimate of the variance (or standard error) and sample size for each mean regardless of the method chosen for unplanned multiple comparisons. The use of Duncan's Multiple Range Test (DMRT) is not acceptable as a mean separation test as it was designed to be a very liberal test intended to find even minor differences in resistance between plant lines used for breeding.

Model Analysis, Guidelines, Equations, and Computer Code

Model Analysis

At the beginning of the manuscript, authors should state clearly the goals of their model construction and analysis. Evaluation by reviewers depends upon these goals and the type of model. Authors should attempt to describe the main conclusions, limitations, and sensitivity of results to assumptions. For stochastic models, describe the variability in the results.

Modeling Guidelines

- The following guidelines pertain to any mathematical model calculated for purposes other than statistical analysis.
- Authors must adequately describe both model structure and model analysis.
- Authors must explain and justify original equations and computer programs or justify the selection of a published software package used in the computation of models.
- Model structure and steps in the analysis must be described in the Materials and Methods section.
- Without presenting extensive computer code, the text must permit an understanding of the model that would allow most mathematically inclined scientists to duplicate the work.
- Present all equations that represent the biology of the system being modeled.
- Unless their derivation is self-evident, show how the equations were derived and mention the underlying assumptions.
- Express how the equations are solved over time and space.
- Provide references for standard techniques (e.g., matrix manipulation, integration).
- Define all variables and parameters in each equation and describe their units (e.g., time, space, and mass).
- In the Materials and Methods or Results section, present the range of parameter values included in the model, and describe the uncertainty in or range of validity of these values.

Equations

Consult *Mathematics into Type* for correct formatting of equations and mathematical variables. Italicize all mathematical variables.

Validation or Testing of Model Results

Data used for validation must be independent of data used to build or calibrate the model. Authors must state why the model did not require testing (e.g., theoretical study), why it cannot be tested (e.g., lack of data), or how it was tested.

Structure of Computer Code

For models solved or simulated by computers, mention the programming language and computer used. Describe the important numerical methods used in calculating the model (e.g., integration and random number generation). Mention how the program's logic and algorithms were tested and verified. When published software is computed, provide a reference and state which procedures were used. Discuss in any section of the manuscript the limitations of the published software. Original computer programs should be made available at the request of reviewers and readers.

Gene Sequencing

- Inclusion of a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and amino acid sequence data is required.
- Sequences from new species and new genes must indicate the proportion of the gene sequenced and should include data from both strands.
- The accession number may be included in the original manuscript or the sequence may be provided for review and an accession number provided when the manuscript is revised.

Datasets Deposited in Third-Party Repositories

The Journal of Economic Entomology encourages authors to submit complete datasets behind the paper to a third-party repository. Datasets deposited in third-party repositories should be cited in the references of a paper. Dataset citations can be inserted into a paper at any point until the proofs have been returned. ESA journals are integrated with [Dryad](#), an online data repository. Upon submission, authors will be sent a link to easily deposit the full dataset(s) behind their research in Dryad. Datasets deposited in Dryad are given unique DOIs, linked to the corresponding paper, and are available to be reviewed by subject editors of the journal upon request. Depositing data in Dryad is optional. If you would like your paper to link to the dataset, data should be deposited prior to acceptance. Authors are required to pay Dryad for depositing data, but this fee is only charged if a paper is accepted. ESA members are eligible to request one of a limited number of waivers of the deposit fee. Please contact the ESA editorial office (pubs@entsoc.org) to request a waiver.

Language Editing

Many manuscripts are withdrawn without review because the English language is not good enough to be sent to reviewers. For authors whose primary language is not English, we suggest having the paper edited by an English-speaking colleague or professional editing service prior to submission. For a professional editing service, ESA journals have a partnership with the [Charlesworth Group](#), whereby ESA authors receive a 10% discount on editing services. The discount is automatically applied if authors follow the hyperlink above.

Immutable Advance Access

JEE publishes articles online ahead of inclusion in an issue via OUP's Advance Access. In order to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN) with regard to nomenclatural works, ALL articles published by ESA's journals, regardless of whether they include nomenclatural information, will be immutable; this means that no changes will be allowed to any article without the publication of an erratum clearly stating the changes that have been made. Therefore, it is the responsibility of the authors to carefully check their proofs for accuracy, and to notify the publisher of any changes that are necessary prior to Advance Access publication.