



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LUCAS DA SILVA MORAIS

**EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NA CONSERVAÇÃO DO SÊMEN  
DE ZANGÕES DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS (Hymenoptera:  
Apidae)**

MOSSORÓ  
2023

LUCAS DA SILVA MORAIS

**EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NA CONSERVAÇÃO DO SÊMEN  
DE ZANGÕES DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS (Hymenoptera:  
Apidae)**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

**Linha de Pesquisa:** Produção e Conservação Animal.

**Orientadora:** Profa. Dra. Débora Andrea Evangelista Façanha.

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Katia Peres Gramacho.

MOSSORÓ

2023

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M827e Moraes, Lucas da Silva.  
EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NA CONSERVAÇÃO  
DO SÊMEN DE ZANGÕES DE ABELHAS *Apis mellifera*  
AFRICANIZADAS (Hymenoptera: Apidae) / Lucas da  
Silva Moraes. - 2023.  
96 f. : il.

Orientadora: Débora Andréa Evangelista Façanha.  
Coorientadora: Kátia Peres Gramacho.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural  
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal, 2023.

1. Parâmetros espermáticos. 2. Preservação de  
sêmen. 3. Abelhas. 4. Diluentes. 5. Conservação.  
I. Façanha, Débora Andréa Evangelista , orient.  
II. Gramacho, Kátia Peres, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade  
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência  
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva  
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

# EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NA CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE ZANGÕES DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS (Hymenoptera: Apidae)

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

**Linha de Pesquisa:** Produção e Conservação Animal.

Defendida em: 24 / 02 / 2023

## BANCA EXAMINADORA

Débora Andréa  
Evangelista  
Façanha

Assinado de forma digital  
por Débora Andréa  
Evangelista Façanha  
Dados: 2023.02.28 12:04:10  
-03'00'

Profa. Dra. Débora Andrea Evangelista Façanha. (UNILAB)  
Presidenta

MOACIR FRANCO DE  
OLIVEIRA:32594950  
459

Assinado de forma digital por  
MOACIR FRANCO DE  
OLIVEIRA:32594950459  
Dados: 2023.03.01 11:48:30  
-03'00'

Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)  
Membro Examinador

gov.br MARCELO BARBOSA BEZERRA  
Data: 28/02/2023 14:05:53-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra (UFERSA)  
Membro Examinador

gov.br FABIANA MARTINS COSTA MAIA  
Data: 01/03/2023 00:44:14-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Fabiana Martins Costa Maia (UTFPR)  
Membro Examinador

Andréia Maria da  
Silva

Assinado de forma digital por Andréia Maria da Silva  
Dados: 2023.02.28 22:23:24 -03'00'

Prof. Dra. Andréia Maria da Silva (IFRN)  
Membro Examinador

## **DEDICO**

Ao meu tio Adilson Rodrigues (*In Memoriam*) e minha querida tia Maria Acácia da Silva Rodrigues.

Aos meus avós, Roberto Morais, Maria Adelaide Morais, Maria Auxiliadora da Silva – “Dora” e Valmir Menezes (*In Memoriam*).

Aos meus pais, Ricardo Morais e Marylin Menezes.

A minha mãe científica e grande amiga Kátia Peres Gramacho.

Aos demais familiares e amigos que fizeram parte dessa conquista.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha amiga, co-orientadora, mãe científica **Katia Peres Gramacho**, faltam palavras para agradecer tudo o que você fez e faz por mim. Obrigado pela pessoa maravilhosa que é. Serei eternamente grato, **Katinha**.

À minha orientadora **Débora Andréa Evangelista Façanha** por abraçar a causa das abelhas. Agradeço por ter acreditado em mim, pela confiança e paciência. Obrigado por tudo!

Ao **Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva**, por sua parceria e ter acreditado no nosso trabalho e depositado sua confiança.

Às minhas mães **Maria Acácia da Silva Rodrigues** e **Marylin da Silva Menezes**, por todo amor e carinho que depositaram em mim. Apesar das dificultades, nunca deixaram faltar nada e sempre acreditaram em mim. Em especial agradeço à minha mãe **Maria Acácia**, pela educação que me deu e lutou para que eu chegassem até esse momento. Amo vocês.

Ao meu Pai **Ricardo Silva Moraes**, por todo apoio e confiança. Em especial ao meu Tio **Adilson Rodrigues (In memoriam)** que foi uma pessoa excepcional que junto a minha Tia Acácia, nunca me deixaram faltar nada.

À minha namorada e amiga **Ana Flávia Santos da Cunha**, não tenho palavras para agradecer a pessoa incrível que você é na minha vida. Muito obrigado por tudo, te amo.

Ao meu grande amigo irmão **Edgar Rodrigues de Araujo Neto**, só você sabe o que passamos para chegar até aqui. Gratidão por todo carinho e amizade. Conte sempre comigo. E não posso deixar de agradecer aqui uma das melhores pessoas que conheci, **Gleide Selma Araujo Oliveira** (*In memoriam*), pode ter certeza que ela está no céu torcendo por nós.

À minha amiga **Andréia Maria da Silva**, pois acho que não teria conseguido esse título sem o seu apoio. Sou imensamente grato pelos seus conselhos, ideias, auxílios.... Tudo.

Aos meus avós **Roberto Morais, Adelaide Morais, Maria Auxiliadora da Silva (Dôra)** e **Valmir Menezes** (*In memoriam*), por todo o apoio, carinho. E claro a minha querida Bisavó **Berenice da Glória Silva (Beré)**, pelas nossas conversas e risadas.

Aos meus irmãos, **Kênia Rodrigues, Kramer Rodrigues, Letícia Morais, João Victor da Silva, Roberta Morais, Ricardo Morais, Theo Morais e Sarinha (Carrapicha)** obrigado por tudo. Amo vocês.

A todos os familiares que acreditaram nessa conquista. Em especial ao meu tio, Roberto (Beto), pelos conselhos e ensinamentos. E minhas tias **Adelaide Morais (Adinha), Keyse Menezes, Valdete da Silva, Luiza da Silva, Jaqueline Morais (Keke) e Marina Morais**. E aos meus primos **Felipe Morais (Gordinho), Pedro Morais, Wenderson da Silva, Mário Braga, Luizinho, Daniela Rodrigues, Adelaide Santos (Adelaidinha), Maria Tereza (Teka), Helena**

**Ribeiro, Cindy Carvalho, Luísa Moraes.** E a minha querida sobrinha **Laura Melo**. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos que sempre torceram por mim do **Durval Tavares, Gabriel Fontes, Eduardo Burle, Nailton Chagas, Leandro Alves, Arthur Scardini, Raul Carlos, Assis Jr, Henrique Ismail, Mateus Castro, André Felipe (Manoshadow), JV Macário, Anderson Dias (Balinha), Emanuel Rocha, Idalia Ribeiro, Jéssica Valença (Keka), Iasmim Schenfert, Marina Freitas, Marina Schenfert, Victória Moraes, Leticia Caetano, Heloisa Carlos, Kaynara Torquato, Tuanny Daniele (rsrs), Paula Ferreira, Mirelly Deda**. Não tenho como descrever o que cada um representa para mim, pois seriam inúmeras páginas, mas podem ter certeza de que vocês são especiais, amo vocês.

As pessoas que me ajudaram ao longo desses quatro anos, em especial a **Dona Delma Maria Castro, Ana Vitória, Rodolfo Lucena, Carlla Larissa (Caca), André Costa, Enzo Costa, Carlos Alfredo (Carlinhos), Danivan Francisco** e aos demais que aqui não foram citados, meu muito obrigado

A todos os integrantes do NCTA e abelhudos, especialmente **Andriano Santos, Filipe Lima, Ewerton Figueiredo, Jefferson Roosevelt, Samuel Castro, Hérica Domingos e Ana Clara**, agradeço pela amizade e pelos momentos de muita alegria e diversão.

Ao **Prof. Dr. Genevile Carife Bergamo** por ter abraçado a causa e acreditado no potencial das abelhas.

À equipe do Laboratório de Conservação e Germoplasma Animal (LCGA), em especial a **Luana Grasiele Pereira Bezerra, João Batista Freira de Souza Júnior e Ana Glória Pereira**, saibam que vocês foram fundamentais para a realização dessa conquista. Muito obrigado!

À CAPES e CNPq pelo fornecimento da bolsa e financiamento do projeto. À UFERSA e aos professores do PPGCA pelo ensino e toda estrutura necessária para execução de todos os experimentos que originaram essa tese.

*“Não devemos ter medo das novas ideias! Elas podem significar a diferença entre o triunfo e o fracasso”.*

*Napoleon Hill*

## RESUMO

É sabido que o conhecimento acerca da biologia e importância das abelhas para o homem e para o mundo esteja em expansão, entretanto ainda são escassas as informações acerca da fisiologia reprodutiva dos zangões, bem como sobre ferramentas para conservação do seu sêmen, principalmente com as abelhas africanizadas. Com isso, estabelecer um protocolo de refrigeração e criopreservação de espermatozoides de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) foi o objetivo desse trabalho. Para tanto, o estudo foi dividido em dois experimentos, os quais utilizaram-se zangões adultos de abelhas africanizadas oriundos do Núcleo de Capacitação Tecnológica em Apicultura – NCTA. O primeiro experimento descrito no capítulo I, traz informações sobre efeito de diferentes diluentes na preservação de sêmen refrigerado de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) a temperatura de  $t = 16 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob os parâmetros espermáticos de pH, motilidade, viabilidade, HOST e morfologia. Para tanto, os diluentes utilizados foram o Tris, Tris + EY, Collins e Ringer. As amostras foram refrigeradas em incubadora de demanda biológica de oxigênio à  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  durante um período máximo de 96 horas. Já o segundo experimento descrito no capítulo II, traz informações sobre o efeito de diferentes diluentes na criopreservação do sêmen abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), sob os parâmetros espermáticos de motilidade, viabilidade, HOST e morfologia. Sendo os diluentes Tris, Tris + EY e Collins utilizado nesse experimento. Para a criopreservação, as amostras foram refrigeradas a  $15^\circ\text{C}$  por 40 min em caixas isotérmicas e estabilizadas a  $5^\circ\text{C}$  por 10 min em incubadora biológica. Em seguida foram colocadas em contato com o vapor de nitrogênio por 10 minutos e finalmente armazenadas em um recipiente criobiológico a  $-196^\circ\text{C}$ . Após 1 semana, as palhetas foram descongeladas individualmente em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por 30 segundos. Nos dois experimentos as amostras foram diluídas na proporção de diluição 12:1 (diluente: sêmen). Os parâmetros espermáticos sofreram alterações significativas após o processo de refriegeração e criopreservação. Estes estudos foram pioneiros a que se refere, na utilização de diferentes diluentes, com o propósito de desenvolver um diluente comercial para conservação do sêmen de zangões de abelhas africanizadas.

**Palavras-chave:** Parâmetros espermáticos. Preservação de sêmen. Abelhas. Diluentes. Conservação.

## ABSTRACT

It is known that knowledge about the biology and importance of bees to humans and the world is expanding. However, information about the reproductive physiology of drones and tools for preserving their semen, especially with Africanized bees, is still scarce. Therefore, the objective of this study was to establish a protocol for the refrigeration and cryopreservation of semen from Africanized honeybee drones (*Apis mellifera*). The study was divided into two experiments using adult drones from the Technological Training Center for Beekeeping - NCTA. The first experiment, described in chapter I, provides information on the effect of different extenders on the preservation of refrigerated semen of Africanized bees at a temperature of  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ , under sperm parameters such as pH, motility, viability, HOST, and morphology. The extenders used were Tris, Tris + EY, Collins and Ringer. The samples were refrigerated in a biological oxygen demand incubator at  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  for a maximum period of 96 hours. The second experiment, described in chapter II, provides information on the effect of different extenders on the cryopreservation of semen from Africanized bees, under sperm parameters such as motility, viability, HOST, and morphology. The extenders used were Tris, Tris + EY, and Collins. For cryopreservation, the samples were cooled to  $15^\circ\text{C}$  for 40 minutes in isothermal boxes and stabilized at  $5^\circ\text{C}$  for 10 minutes in a biological incubator. Then they were exposed to nitrogen vapor for 10 minutes and finally stored in a cryobiological container at  $-196^\circ\text{C}$ . After one week, the straws were individually thawed in a water bath at  $37^\circ\text{C}$  for 30 seconds. In both experiments, the samples were diluted in a dilution ratio of 12:1 (extender: semen). The sperm parameters underwent significant changes after the refrigeration and cryopreservation process. These studies were pioneers in the use of different extenders to develop a commercial extender for the preservation of semen from Africanized honeybee drones.

**Keywords:** Sperm parameters. Semen preservation. Bees. Diluents. Conservation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Zangão de abelha <i>Apis (Apis mellifera)</i> adulto.....	22
<b>Figura 2</b> – Sistema reprodutivo do zangão.....	24

### **CAPÍTULO I – THE EFFECTS OF FOUR EXTENDERS ON REFRIGERATED AFRICANIZED HONEY BEE SEMEN**

<b>Figure 1.</b> Average percentages ( $\pm$ SEM) of motility (A), viability (B), and the HOST (C) in samples refrigerated at 16°C, over the storage time. Means followed by different uppercase letters indicate significant differences between the refrigeration times within each diluent, and means followed by lowercase letters indicate a significant difference between the experimental groups (Tukey test; $P < 0.05$ ).....	60
---	----

### **CAPÍTULO II – CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM AFRICANIZED HONEY BEES (*Apis mellifera*) IN DIFFERENTS EXTENDERS**

<b>Figure 1.</b> The effect of different semen extenders on fresh sample sperm viability (mean $\pm$ SEM). Letters in lowercase indicate a significant difference between diluents (Tukey test; $P < 0.05$ ).....	80
---	----

<b>Figure 2.</b> The effect of different semen extenders on fresh sample normal sperm morphology (mean $\pm$ SEM). Letters in lowercase indicate a significant difference between diluents (Tukey test; $P < 0.05$ ).....	81
---	----

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I – THE EFFECTS OF FOUR EXTENDERS ON REFRIGERATED AFRICANIZED HONEY BEE SEMEN**

<b>Table 1.</b> Composition and characteristics of the diluents tested in the collection and sperm parameters of Africanized honey bees ( <i>A. mellifera</i> ).....	56
<b>Table 2.</b> Mean values ( $\pm$ SEM) of the motility patterns, viability, hypo-osmotic swelling test (HOST), pH, normal sperm, and abnormal sperm with coiled tail, broken tail, and double tail in fresh and refrigerated semen at 16°C in different semen extenders.....	59
<b>Table 3.</b> Mean values ( $\pm$ SEM) for normal sperm of Africanized honey bee drones submitted to refrigerated at 16°C in differents semen extenders and storage period.....	61
<b>Table 4.</b> Mean values ( $\pm$ SEM) of abnormal sperm with tail coiling defect submitted to refrigerated at 16°C in different semen extenders and storage periods.....	62

### **CAPÍTULO II – CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM AFRICANIZED HONEY BEES (*Apis mellifera*) IN IN DIFFERENTS EXTENDERS**

<b>Table 1.</b> Composition and characteristics of the semen extenders tested in the collection and sperm parameters of Africanized honey bee ( <i>A. mellifera</i> ).....	75
<b>Table 2.</b> Mean values ( $\pm$ SEM) of motility, viability, HOST) normal spermatozoa and abnormal spermatozoa with curled tail, broken tail and double tail in fresh semen and after 5 minutes of exposure to three types of semen extenders.....	79
<b>Tabela 3.</b> Sperm morphology of post-thawed bees using different semen extenders (mean $\pm$ SEM).....	81

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA	Análise de Variância
LSD	Least Significant Difference
DF	Graus de liberdade
SEM	Erro padrão
EY	Egg yolk
HOST	Teste Hiposmótico
DMSO	Dimetilsulfóxido
PI	Iodeto de propídio
g	Gramas
h	Hora
$\mu$ L	Microlitro
mOsm/L	Milosmol por litro
g/100 mL	Gramas por cem mililitros
H <sub>2</sub> O	Água
pH	Potencial hidrogeniônico
LCGA	Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
NCTA	Núcleo de Capacitação Tecnológica em Apicultura

## **LISTA DE SIMBOLOS**

+	Soma
×	Multiplicação
>	Maior que
<	Menor que
±	Mais ou menos
=	Igual
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
®	Marca Registrada
P	Nível de significância

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1.	Biologia e reprodução dos zangões de <i>Apis mellifera</i> .....	21
2.2.	Métodos de obtenção dos espermatozoides .....	25
2.3	Conservação de espermatozoides em zangões de abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	26
2.3.1.	Diluentes.....	28
2.3.2.	Crioprotetores.....	29
2.4	Avaliação dos parâmetros espermáticos.....	32
2.4.1.	Motilidade espermática.....	32
2.4.2.	Viabilidade espermática.....	34
2.4.3.	Funcionalidade da membrana plasmática.....	35
2.4.4.	Morfologia espermática.....	36
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
5.1.	Objetivo geral .....	40
5.2.	Objetivos específicos.....	40
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO I – THE EFFECTS OF FOUR EXTENDERS ON REFRIGERATED AFRICANIZED HONEY BEE SEMEN.....</b>		<b>51</b>
<b>CAPÍTULO II – CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM AFRICANIZED HONEY BEES (<i>Apis mellifera</i>) IN IN DIFFERENTS EXTENDERS.....</b>		<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>93</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

As abelhas melíferas (*Apis mellifera*) são as principais responsáveis da produção de alimentos agrícolas, pois representam a grande maioria dos serviços de polinização por insetos (PETTIS *et al.*, 2016). No entanto, na última década, houve um declínio dramático em todo o mundo das abelhas, causado pela destruição do habitat natural, parasitas, exposição a pesticidas, suprimento insuficiente de alimentos, estresse de transporte associado à importação e exportação de colônias e má saúde das rainhas (PIRES *et al.*, 2016; VANENGELSDORP *et al.*, 2017). O declínio desses polinizadores na natureza, são uma grande ameaça à diversidade genética das abelhas (PAILLARD *et al.*, 2017). Além disso, tem o fômeno do CCD que se trata da perda de colônias por vários fatores interativos além de doenças e ácaros, gerando uma crise mundial por falta de polinizadores (MAINI; MEDRZYCKI; PORRINI, 2010; VANENGELSDORP *et al.*, 2017). Neste contexto a preservação do semen de abelhas, seja eficaz para a proteção do material genético e contribuição em programas de reprodução seletiva de interesse comercial (COLLINS, 2000), principalmente para inseminação instrumental torna-se uma estratégia importante.

No Brasil, a atividade apícola é dada pela abelha africanizada ou Africanized Honey Bee (*Apis mellifera*). Esta por sua vez é um poli-híbrido formado em decorrência de cruzamentos ocorridos entre a abelha africana (*Apis mellifera scutellata*), com abelhas europeias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera linguística*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) (KERR; BUENO, 1970; KENT, 1988; GONÇALVES, 2006) . No entanto, um dos maiores problemas que a atividade apícola brasileira vem enfrentando, é devido à utilização indiscriminada de agrotóxicos, mudanças climáticas que provocam o abandono das colônias e a presença de pragas e parasitas (PIRES *et al.*, 2016; CASTILHOS *et al.*, 2019). Assim a reprodução desses animais na

natureza se torna mais difícil, sendo importante o desenvolvimento e aprimoramento de protocolos e ferramentas de conservação.

O sêmen das abelhas pode ser preservado em temperaturas acima ou abaixo de 0 °C (PAILLARD *et al.*, 2017). Foi visto por Cobey (2007) e Cobey *et al.* (2013) que, o sêmen fresco de zangões pode ser armazenados em temperaturas acima de zero por algumas semanas sem perder características espermáticas. Contudo, o sêmen após 39 semanas preservado em temperatura de 12 °C, só pode ser utilizado na inseminação instrumental se apresentar uma viabilidade espermática > 65% (COLLINS, 2000). Sendo assim, existe a possibilidade de transporte de sêmen em recipientes com temperaturas acima de zero para fins de conservação ou de interesse produtivo.

Como para muitas espécies de mamíferos, a criopreservação é outra ferramenta de armazenamento de sêmen a longo prazo. Ter acesso a sêmen criopreservado, permite a inseminação em qualquer época do ano, principalmente em regiões onde a abundância de zangões é pequena (WEGENER *et al.*, 2014). Assim, para a produção de abelhas, é mais fácil transportar o sêmen criopreservado em vez de zangões vivos para a inseminação instrumental, o auxilia na redução do risco de disseminação de patógenos via organismos vivos (MACKENSEN, 1955; COBEY, 2007).

Considerando a importância da preservação do sêmen de zangões de abelhas, destacam-se que vários fatores podem afetar esse processo. Entre eles, incluem-se a técnica de coleta utilizada, os crioprotetores selecionados, a rampa de congelação empregada e a temperatura de refrigeração adotada (MACKENSEN, 1955; LOCKE; PENG, 1993; COLLINS, 2000; TAYLOR *et al.*, 2009; WEGENER *et al.*, 2014). Ademais, é fundamental escolher o diluente padronizado, cuja finalidade inclui o aumento do volume, a proteção da célula contra o choque térmico, o fornecimento de nutrientes essenciais para o metabolismo espermático, a estabilização do pH, a inibição do

crescimento bacteriano e a manutenção da viabilidade do espermatozoide até o momento da inseminação (TAYLOR et al., 2009; GÜL et al., 2017).

Para tanto, informações científicas sobre fatores que podem afetar a fertilidade dos espermatozoides dos zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), bem como sobre a biologia, fisiologia reprodutiva e ferramentas de conservação do seu gameta, ainda são escassos. Um dos motivos, podendo ser até o principal, é que seu estudo tem certa complexidade devido ao fato de que zangões são encontrados apenas em períodos com abundância de néctar e pólen e apicultores terem o hábito de eliminá-los durante o período de produção de mel (FREE; WILLIAMS, 1975; MORAIS, 2019). Devido a essas dificuldades há uma necessidade de se aprofundar nos estudos voltados sobre este tema em abelhas africanizadas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Biologia e reprodução dos zangões de *Apis mellifera***

As abelhas eussociais de modo geral, pertencem a uma sociedade matriarcal, na qual a abelha rainha é a fêmea dominante na colônia de *Apis mellifera*, sendo responsável pelo controle da colônia e postura dos ovos (KRAUS *et al.*, 2003; POTTS *et al.*, 2010). As rainhas só acasalam no início de suas vidas geralmente até seu quinto dia de vida, através cópula com múltiplos machos, que imediatamente depois morrem, pois perdem parte do abdome e aparelho genital no trato reprodutivo das fêmeas. No entanto, os zangões além da função reprodutiva, atuam no controle de temperatura da colmeia. (WINSTON, 1991; KOVAC; STABENTHEINER; BRODSCHNEIDER, 2009; BRUTSCHER; BAER; NIÑO, 2019).

Os zangões (Figura 1) são provenientes de células chamadas zanganeiras, nas quais a rainha deposita um ovo não fecundado, em um alvéolo maior, que favorece a paternogênese (FERREE *et al.*, 2006). Eles são os únicos machos da colônia e realizam a função da fecundação e termorregulação (KOVAC; STABENTHEINER; BRODSCHNEIDER, 2009). Eles necessitam de um cuidado maior, devido a necessidade de serem alimentados no início da vida adulta, em média são necessárias duas operárias para um único zangão. Na falta de alimento, principalmente ao final das floradas, geralmente eles são mortos pelas operárias como forma de melhorar a eficiência da utilização dos alimentos (WINSTON, 1991; CARVALHO; MOREIRA, 2010).



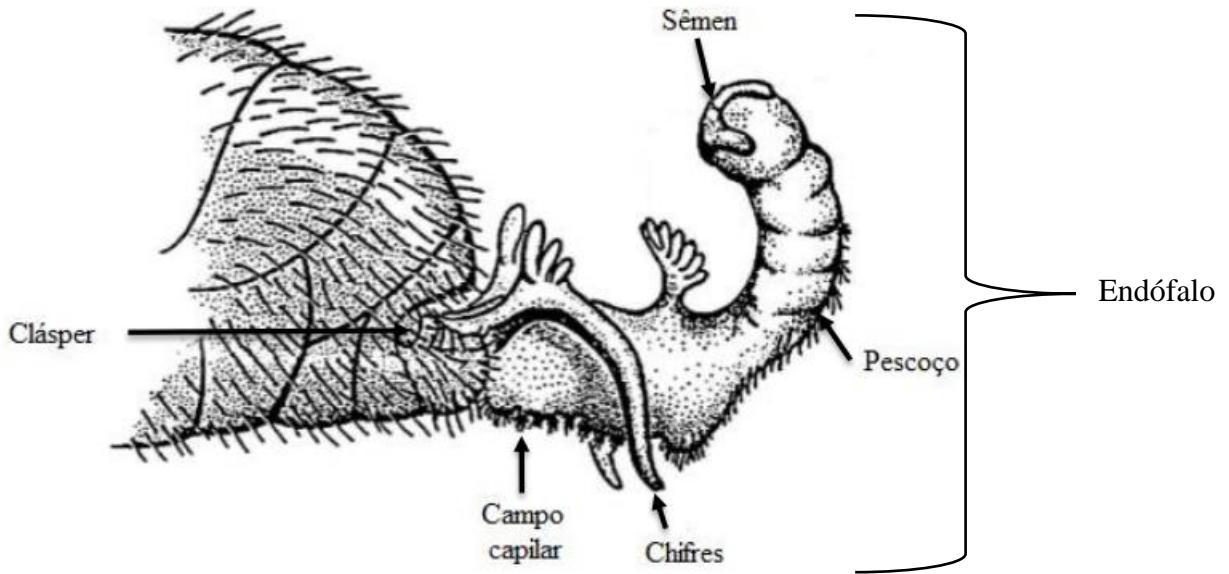
**Figura 1.** Zangão de abelha *Apis (Apis mellifera)* adulto. Fonte: Wikipédia.

Apesar de existir uma grande quantidade de informações científicas sobre a reprodução de abelhas rainhas, ainda são escassos os métodos de seleção, criação e manutenção dos zangões, tanto em pesquisas de melhoramento quanto em empresas especializadas em produção de abelhas rainhas (RHODES, 2011; ABDELKADER *et al.*, 2014). Certas empresas levam em conta características relacionadas à capacidade produtiva das operárias, e não os atributos importantes para o acasalamento bem-sucedido em condições adversas. A título de exemplo, a criação de um grande número de zangões, independente das condições sazonais e nutricionais do ambiente, de sua conservação e manutenção; é possível conseguir maior tempo de vida útil , assim como sua

seleção tomando como critério o volume de sêmen, o qual permitirá selecionar zangões com maior conteúdo seminal, portanto contendo mais espermatozoides, com alta viabilidade e a motilidade (RHODES, 2011; GONTARZ *et al.*, 2016; MORAIS *et al.*, 2022);

As colônias tendem a produzir zangões em épocas que coincidem com a produção de rainhas virgens, geralmente em épocas associadas à presença de alimento na natureza (LASHARI *et al.*, 2022). Fato esse elucidado por Free e Williams (1975) em países temperados em que os ovos de zangões normalmente aparecem na primavera e atingem seu auge no início do verão, já no início do outono deixam de serem ovipositados, quando as flores começam diminuir a produção de néctar e pólen. No semiárido nordestino foi constatado por Araujo-Neto (2019) que o período que ocorrência de zangões é durante os meses de junho e julho, sendo este o período de safra da região. No entanto esses picos de ocorrência podem variar em função dos períodos de floradas e chuvas.

Os órgãos reprodutivos dos zangões são compostos por um endófalo, testículos pareados, vesículas seminais e glândulas mucosas. O endófalo é o órgão copulatório, sendo um ducto membranoso longo e macio que fica dentro do abdome dos machos e só é liberado apenas uma vez em toda sua vida (LOCKE; PENG, 1993) (Figura 2). Os espermatozoides são produzidos nos testículos e migram para as vesículas seminais até o processo de maturação, processo fisiológico que funciona em conjunto com as glândulas mucosas, que ao serem esvaziadas liberam espermatozoides juntamente com um muco branco pelo ducto seminal, o qual é secretado por zangões adultos (WINSTON, 1991; KAULENAS, 2012).



**Figura 2.** Sistema reprodutivo do zangão. Fonte: Ontario Beekeeping Manual, 1993 (Adaptado)

O sêmen consiste em uma mistura de várias substâncias e células, principalmente de espermatozoides produzidos nos testículos. Outra substância que forma parte dela é o muco, produzido por grandes glândulas mucosas. A produção de espermatozoides é considerada completa pelo tempo que os zangões atingem a maturidade sexual, ou quando têm em média de 9 a 12 dias de idade e já conseguem realizar voos de reconhecimento (COBEY, 2007). Cada zangão ejacula cerca de 6 a 12 milhões de espermatozoides, sendo que o sêmen de cada acasalamento se acumula nos ovidutos da rainha (COBEY, 2007; PAILLARD *et al.*, 2017). A maioria deste sêmen é expulso da rainha posteriormente, mas cerca de 5 a 6 milhões migram para a espermateca onde são armazenados até serem liberados em pequenas quantidades quando a rainha começa a ovipositar (PAGE, 1986; HARBO, 1990).

O acasalamento é a função mais significante de um zangão adulto. Durante o acasalamento o sêmen do zangão é transferido para o órgão genital de uma rainha virgem, através do endófalo, durante a cópula (WOYKE; RUTTNER, 1958; RANGEL; FISHER, 2019). Após a cópula, as secreções e partes dos órgãos reprodutivos dos zangões permanecem no trato genital da rainha e significam um sinal de acasalamento, o que estimula outros machos para a cópula (WOYKE, 1962). Segundo Woyke (1964), isto pode evitar que o sêmen saia do trato reprodutor da rainha.

## **2.2. Métodos de obtenção dos espermatozoides**

Duas técnicas principais de coleta de sêmen em zangões encontram-se na literatura, baseadas na dissecção das vesículas seminais e na indução da ejaculação. Na década de 50, quando surgiram os primeiros estudos sobre sêmen de zangões, a técnica utilizada era a dissecção das vesículas seminais, que consistia em um corte no lado dorsal do abdômen, onde as vesículas eram cuidadosamente cortadas na junção com as glândulas mucosas (MACKENSEN, 1955). No entanto em processos de criopreservação essa técnica não é eficiente, devido a excesso de células secundárias além dos espermatozoides e qualidade espermática (LOCKE; PENG, 1993; COLLINS; DONOGHUE, 1999).

A coleta do sêmen de zangões para a conservação é usualmente efetuada pela técnica proposta por Collins e Donoghue (1999), na qual o zangão fica preso na região da cabeça e tórax e seu abdômen é pressionado suavemente resultando na eversão do endófalo e o sêmen se torna presente em machos maduros. Outra técnica descrita é através da remoção do endófalo com uma pinça e posteriormente realizado um macerado (MORAIS *et al.*, 2022), sendo esse método

eficiente apenas para avaliação espermática, impossibilitando a criopreservação e/ou inseminação instrumental.

O sêmen pode ser coletado diretamente da ponta do endófalo, evertido em um tubo capilar de vidro conectado a uma seringa (HARBO, 1983; COBEY; TARPY; WOYKE, 2013; PAILLARD *et al.*, 2017), e em consideração o muco no momento da coleta, pois o mesmo pode causar entupimento do capilar. Estudos indicam uma maior taxa de sucesso na coleta de sêmen coletado em zangões mais velhos do que em mais jovens (ROUSSEAU; FOURNIER; GIOVENAZZO, 2015; YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020), entretanto esses resultados podem variar de acordo com a linhagem genética, condições ambientais e condições de criação (RHODES, 2011; MORAIS *et al.*, 2022). Após a coleta, o sêmen dos zangões deve ser avaliado de acordo com parâmetro macro e microscópicos (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008). O volume do sêmen pode ser avaliado com a ajuda de uma pipeta de precisão ou medição do comprimento preenchido do tubo capilar (0,1 a 2,4  $\mu$ L, média de 1,0  $\mu$ L por zangão) (YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020). Esse parâmetro pode apresentar diferença entre animais, influenciados por indivíduo, efeitos da idade, peso corporal, estação do ano e linhagem genética (GENÇER; KAHYA, 2011; RHODES, 2011).

### **2.3. Conservação de espermatozoides em zangões de abelhas *Apis mellifera***

A criopreservação a temperatura de -196°C em nitrogênio líquido é comumente utilizada, devido à capacidade em manter as células espermáticas férteis por um período indefinido, entretanto grande proporção destas, não conseguem sobreviver ao processo de congelação e descongelação (WATSON, 2000; FICKEL; WAGENER; LUDWIG, 2007). Em zangões a

criopreservação pode ser utilizada para manter e aumentar a variabilidade genética dentro das populações, impactando diretamente na diversidade genética por aumentar a resistência a doenças de abelhas (MATTILA; SEELEY, 2007; ALCAY *et al.*, 2019).

Os primeiros estudos de criopreservação do sêmen de zangões foram realizados durante as décadas de 70 e 80 (HARBO, 1977; 1983; KAFTANOGLU; PENG, 1984). Kaftanoglu e Peng (1984), conseguiram preservar com considerável motilidade após o descongelamento, no entanto a fertilidade permaneceu baixa. Na última década, assuntos sobre criopreservação do sêmen de zangões de abelhas melíferas voltaram à tona (WEGENER; BIENEFELD, 2012; ALCAY *et al.*, 2015; 2019; DADKHAH *et al.*, 2016; PAILLARD *et al.*, 2017; RAJAMOHAN *et al.*, 2020;), dada sua importância na conservação do material genético, com fins de conservação da espécie e melhoramento genético com interesse produtivo.

O método de criopreservação de sêmen de zangões de abelhas melíferas ainda não foi padronizado. No entanto devido ao sucesso de congelação e descongelação, alguns trabalhos estão sendo utilizados como modelo, passando por adaptações de acordo as necessidades (DADKHAH *et al.*, 2016; PAILLARD *et al.*, 2017). Além disso, a utilização de métodos e técnicas de criopreservação de espermatozoides de mamíferos para a preservação dos espermatozoides das abelhas estão sendo utilizado devido a melhoria na qualidade espermática (TAYLOR *et al.*, 2009). A diluição do sêmen em tris acrescido de gema de ovo e DMSO, tem sido comumente usada na criopreservação de espermatozoides de zangões, no entanto as proporções podem variar (COLLINS, 2000; TAYLOR *et al.*, 2009; DADKHAH *et al.*, 2016; PAILLARD *et al.*, 2017). Inúmeros trabalhos vêm mostrando diversas curvas de congelação (TAYLOR *et al.*, 2009; PAILLARD *et al.*, 2017; ALCAY *et al.*, 2019; LOEZA-CONCHA *et al.*, 2019). Taylor *et al.* (2009), mantiveram as amostras em um ciclo de resfriamento e congelação programado por

computador, levando-as de 25 a -80°C em 62 minutos. Em seguida, esses autores transferiram as amostras para um botijão criogênico a -196°C, na qual as amostras ficaram armazenadas até o momento de avaliação, os quais obtiveram resultados com viabilidade > 60% pós descongelação.

Além da criopreservação outra forma de conservar os espermatozoides vem sendo utilizada, com temperaturas cima de 0°C (HARBO; WILLIAMS, 1987; LOCKE; PENG, 1993; COLLINS, 2000; PAILLARD *et al.*, 2017). Paillard *et al.* (2017), compararam a criopreservação a -196°C com o sêmen preservado a 16°C, com 180 dias, ambos os descongelados apresentaram uma viabilidade acima de 60%, já após 330 dias, apenas os espermatozoides criopreservados continuavam com viabilidade superior a 60%. Diante disso, esses resultados demonstram que a criopreservação é o meio mais eficiente de conservação a longo prazo.

### *2.3.1. Diluentes*

Um bom diluente deve conter características essenciais para a nutrição e manutenção das células espermáticas, além de servir como tampão, ajustando as alterações do pH, atuar na manutenção da pressão osmótica, proteger as células contra o choque térmico durante o resfriamento, possuir crioprotetores que atuem na proteção das células aos danos durante a congelação e posterior descongelação e atividade antimicrobiana, através da adição de antibióticos (ALCAY *et al.*, 2019; YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020; AUTH; HOPKINS, 2021). De acordo com Rajamohan *et al.* (2020), um diluente para ser utilizado na criopreservação de zangões deve ser constituído por tampão Tris ((Tris-hidroximetil-aminometano -  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ), contendo concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  semelhantes às encontradas na espermateca da abelha rainha, ajustado a um pH de 7.19.

O Tris ((Tris-hidroximetil-aminometano - H<sub>2</sub>NC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) é a substância mais comumente utilizada nos diluentes de sêmen de zangões (KAFTANOGLU; PENG, 1984; TAYLOR *et al.*, 2009; QUARTUCCIO *et al.*, 2020). Ela é solúvel em água, sendo disponível comercialmente em um grau de pureza elevado (SILVA, 2007). De acordo com McPhail e Goodman (1984), o Tris permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses, atuando como um tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0. Além do Tris, outras substâncias também entram na composição do diluente como glicose e frutose (fontes energéticas), gema de ovo (crioprotetor externo), Dimetilssufóxido – DMSO (crioprotetor interno) e antibióticos como amoxicilina (TAYLOR *et al.*, 2009; ALÇAY *et al.*, 2022).

No decorrer dos anos, trabalhos com diferentes substâncias para diluentes estão sendo desenvolvidos, assim como a tentativa de utilização de diluentes comerciais devido a praticidade e por serem mais baratos. Uma delas é a utilização de diluentes a base de água de coco, na qual em mamíferos estão demonstrando similaridade nos resultados em comparação a diluentes a base de Tris (SILVA; CARDOSO; SILVA, 2006). Almeida e Soares (2002) utilizaram diluentes a base de água de coco para o armazenamento de sêmen de zangões de abelha, onde obtiveram a manutenção de motilidade em 15 dias de estoque.

### *2.3.2. Crioprotetores*

Durante a congelação e descongelação, ocorrem flutuações no volume celular que contribuem para danos celulares quando ultrapassam os limites de tolerância das membranas (CASTELO; FROTA; SILVA, 2008). Um dos principais problemas dos espermatozoides submetidos a esta técnica é devido a formação de cristais de gelo no seu interior, levando-os a

injúrias e morte (WEGENER *et al.*, 2014). Diante disso, a adição de crioprotetores melhora a sobrevivência celular após os processos de congelação e descongelação (SILVA, 2007).

Os agentes crioprotetores são substâncias hidrossolúveis, que baixam o ponto eutético de uma solução. Esses agentes pertencem a três tipos: álcoois, açúcares e dimetilsulfóxido (ÁVILA-PORRILLO *et al.*, 2006). Especificando ainda mais, eles podem ser divididos em dois grupos: os que penetram nas células, como o dimetilsulfóxido, metanol, glicerol e o etileno-glicol, daqueles que permanecem no meio extracelular, como as proteínas, os açúcares e o polivinil-pirrolidona (SILVA, 2007).

De acordo com Silva e Guerra (2011) o sucesso da criopreservação depende, entre outros fatores, da natureza do crioprotetor, da concentração do mesmo e da composição do diluente, no mais dos processos de congelação e descongelação. Os crioprotetores tem uma importância primordial, pois são encarregados de minimizar o estresse físico e químico que os espermatozoides sofrem durante os processos de criopreservação (ALCAY *et al.*, 2015).

O DMSO é utilizado frequentemente na criopreservação de sêmen de abelhas, evitando o acúmulo excessivo de eletrólitos, pois se liga a eles durante o processo de congelação, assim evitando a formação de cristais de gelo que danificam a estrutura da membrana (GRÖTTER *et al.*, 2019). Em comparação com o glicerol, sua ação é mais rápida, sendo mais efetivo e menos tóxico (ÁVILA-PORRILLO *et al.*, 2006). A toxicidade dos crioprotetores é um dos fatores mais importantes a serem avaliados no desenvolvimento de protocolos de criopreservação (WEGENER; BIENEFELD, 2012).

No sêmen dos zangões, as primeiras tentativas para remoção dos crioprotetores do sêmen descongelado antes da inseminação foram realizadas por Wegener e Bienefeld (2012) na tentativa de reduzir os efeitos tóxicos através da combinação de crioprotetores e por Paillard *et al.* (2017)

que utilizaram a centrifugação para remoção antes da inseminação instrumental. Harbo (1977) descobriu que até 10% de DMSO na diluição do sêmen usada para inseminação não tinha efeito sobre a espermateca da rainha, além de ter levado a uma maior sobrevida pós descongelamento (TAYLOR *et al.*, 2009; GÜL *et al.*, 2022). Com isso o DMSO se tornou o crioprotetor de escolha para os estudos sobre preservação de sêmen de zangões.

Além do DMSO, a gema de ovo de galinha tem sido adicionada aos diluentes de sêmen por proteger a membrana plasmática, como crioprotetor extracelular, restaurando os fosfolipídios perdidos oriundos do choque térmico que ocorre durante o resfriamento inicial (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; DADKHAH *et al.*, 2016;). Segundo Bouchard *et al.* (1990) a proteção que a gema de ovo promove, pode ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina, a qual propicia a proteção durante o choque térmico devido a sua interação com a estrutura lipídica da membrana plasmática, além da prevenção de hialuronidase pela célula espermática (FOULKES, 1977). Apesar dos seus efeitos benéficos para a célula espermática, a gema apresenta alguns inconvenientes, como a possibilidade de transmissão de doenças (LOEZA-CONCHA *et al.*, 2019).

A associação do DMSO com a gema de ovo já foi estudada, demonstrando resultados positivos na criopreservação do sêmen de zangões, demonstrando motilidade superior a 40% no sêmen descongelado (DADKHAH *et al.*, 2016; LOEZA-CONCHA *et al.*, 2019). Além da associação de outras substâncias como lecitina de soja 0,5% e 2% e geleia real nas concentrações de 1%, 2%, 4% e 8%, obtendo resultados relevantes para substituição ou aprimoramento de uma solução para criopreservação ( DADKHAH *et al.*, 2016; ALCAY *et al.*, 2019). Assim, estudos envolvendo a toxicidade e o efeito protetivos dos crioprotetores em sêmen de zangões, principalmente de abelhas africanizadas, não necessários.

## **2.4. Avaliação dos parâmetros espermáticos**

A avaliação da qualidade espermática está ligada à necessidade de qualificar a fertilidade dos machos reprodutores na fecundação das rainhas (MORAIS, 2019). O estudo dos parâmetros espermáticos vem sendo utilizado como ferramenta de avaliação da qualidade dos animais para reprodução no processo de fertilização (CBRA, 1998; COLLINS, 2004; COBEY; TARPY; WOYKE, 2013).

O sêmen pode ser avaliado através dos seus aspectos físicos tais como volume, coloração, motilidade, integridade da membrana, concentração de espermatozoides, entre outros e aspectos morfológicos principalmente as anormalidades no acrossoma, cabeça e cauda (MORAIS, 2019; YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020; MORAIS *et al.*, 2022).

### *2.4.1. Motilidade espermática*

A motilidade espermática é fundamental para determinar a qualidade do sêmen, sendo de grande importância no momento da fertilização devido a sua mobilidade como indicador de funcionamento do metabolismo espermático (YÁNIZ; PALACÍN; SANTOLARIA, 2019; MURRAY *et al.*, 2022). Este parâmetro está fortemente relacionado à viabilidade espermática (integridade da membrana plasmática), ou seja, a porcentagem de células móveis é altamente correlacionada com a quantidade de espermatozoides viáveis, apesar de que nem sempre representa correlação significativa com a fertilidade (WATSON, 2000; BORTOLOZZO; WENTZ; DALLANORA, 2005).

Além disso, este parâmetro é utilizado para estabelecer o limite aceitável para o uso do sêmen na produção apícola para inseminação das rainhas, sendo frequentemente considerado o valor mínimo de 60% de motilidade espermática, que pelo aspecto emaranhado do sêmen de zangão, é mais complexa a avaliação da motilidade por porcentagem de células móveis no campo de visão no microscópio, por isso utiliza-se o escore muitas vezes (MORAIS et al., 2022). Em mamíferos, a utilização de valores abaixo de 60% de motilidade espermática afeta negativamente a taxa fertilização dos espermatozoides (JOHNSON *et al.*, 2000; FLOWERS, 2002; BORTOLOZZO *et al.*, 2005; GADEA, 2005; UMESIOBI, 2010).

O método mais utilizado para avaliação da motilidade espermática é realizado através da avaliação visual, pois é um teste rápido e de baixo custo; no entanto é um método subjetivo e pode ser influenciado pelo avaliado (VARNER, 2008). Essa avaliação é fundamental para averiguar a capacidade de fertilização dos espermatozoides de um ejaculado (JOHNSON *et al.*, 2000).

As soluções usadas para avaliação desempenham um importante papel nas taxas de motilidade dos espermatozoides, visto que em soluções hipotônicas os espermatozoides não apresentam nenhuma motilidade (KAFTANOGLU; PENG, 1984). O tempo de armazenamento dos espermatozoides após a coleta também pode alterar as taxas de motilidade dos espermatozoides, assim como um baixo número de espermatozoides móveis pode ser compensado pelo aumento dos espermatozoides totais no ejaculado (FOXCROFT *et al.*, 2008; PAILLARD *et al.*, 2017). Além desses fatores, as condições ambientais, como calor ou frio excessivo, luz, osmolaridade e pH do diluente, tem influência na motilidade espermática, tornando assim necessário proteger o sêmen de agentes ou condições prejudiciais antes da análise (MORAIS *et al.*, 2022).

#### *2.4.2. Viabilidade espermática*

A membrana plasmática dos espermatozoides apresenta um importante papel na capacidade de fertilização, que se modifica ao longo do processo de espermatogênese, armazenamento, ejaculação e capacidade de penetração no ovócito (HOLT, 2000; YESTE, 2016). Diante disso, é necessário que esta estrutura se apresente íntegra e funcional, permitindo a viabilidade e capacidade de fertilização do espermatozoide (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Um dos métodos mais comuns para avaliação da viabilidade espermática se dá através de sondas fluorescentes, devido à capacidade de fixar-se em estruturas específicas da membrana, capaz de detectar integridade estrutural, possibilitando assim a avaliação de várias estruturas celulares (CELEGHINI *et al.*, 2007; FORERO-GONZALEZ *et al.*, 2012).

A utilização de sondas fluorescentes foi descrita por Garner *et al.* (1986), testando essas sondas em espermatozoides de vários mamíferos. Já em zangões se deu a partir do desenvolvimento da inseminação instrumental de abelhas, onde se incrementou o interesse na avaliação e armazenamento *in vitro* do sêmen de zangões em programas de seleção e melhora genética (COLLINS; DONOGHUE, 1999). O iodeto de propídeo é um corante impermeável à membrana plasmática que se liga e cora o DNA, ele consegue penetrar apenas em células lesadas, sendo demonstrado em microscópio de fluorescência pela cor vermelho (HARRISON; VICKERS, 1990; HOLT, 2000). Outro corante é o Hoechst, de característica permeável à membrana plasmática que é hidrolisado dentro da célula resultando em um composto fluorescente e impermeável a membrana plasmática intacta, susceptível de ser observado em microscópio de fluorescência pela cor azul (PORTUGAL; WARING, 1988). A viabilidade espermática de abelhas

africanizadas foi observada através da associação de iodeto de propídeo e Hoechst 33342 (MORAIS *et al.*, 2022).

#### *2.4.3. Funcionalidade da membrana plasmática*

O processo de fertilização envolve eventos bioquímicos e fisiológicos complexos que não são completamente refletidos nas avaliações dos parâmetros tradicionais de concentração, motilidade e morfologia (NUR *et al.*, 2012). Como a atividade funcional da membrana plasmática é crucial para a viabilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides, é importante avaliar a atividade estrutural e funcional da membrana espermática (HAFEZ, 1993). Por isso Jeyendran *et al.* (1984) desenvolveram o teste hiposmótico (HOST) para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides, baseado no transporte de fluídos através da membrana intacta sob condições hiposmóticas.

O inchaço da cauda decorrente da exposição de espermatozóides com membranas plasmáticas intactas a uma solução hiposmótica indica que o transporte de água através das membranas está ocorrendo normalmente e a integridade funcional da membrana foi preservada (JEYENDRAN *et al.*, 1984). Outro teste desenvolvido para a avaliar a integridade funcional do esperma, é realizado através da utilização de água destilada como solução hiposmótica, sendo mais simples e rápido do que o HOST convencional (NUR *et al.*, 2012).

Os testes hiposmóticos têm sido efetivamente usados para avaliar a integridade funcional de espermatozoides de mamíferos (JEYENDRAN *et al.*, 1984; LOMELO; GIAMBERSIO, 1991; KUMI-DIAKA, 1993), mas até onde sabemos, estudos envolvendo HOST ou testes de água para investigar o sêmen de abelhas ainda são escassos. Nur *et al.* (2012) com sêmen de abelhas,

analisaram o teste de água e do inchaço hiposmótico, o qual observaram que ambos são medidas adequadas e simples para a avaliação da integridade funcional das membranas plasmáticas de espermatozoides de abelhas.

#### *2.4.4. Morfologia espermática*

A avaliação da morfologia espermática pode indicar o potencial de fertilidade do espermatozoide na presença de altas porcentagens de anormalidade de primeiro e segundo grau. As de primeiro grau ocorrem durante o processo de espermatogênese e as de segundo grau ocorrem durante o percurso dos espermatozoides pelos ductos seminíferos e ejaculados (DOWSETT; OSBORNE; PATTIE, 1984; CHENOWETH, 2005). Células com defeito na cabeça e acrossoma estão associadas com infertilidade, assim como a concentração de espermatozoides anormais (LOVE, 2011; GULOV; BRAGINA, 2022).

Segundo Collins e Donoghue (1999), são necessárias a utilização de várias técnicas para a coloração de espermatozoides de acordo com a sua morfologia, porque cada técnica pode revelar diferentes detalhes ou defeitos nas estruturas dos espermatozoides. Em mamíferos a avaliação da morfologia espermática pode ser feita com uso do corante Rosa de Bengala, pois permite uma melhor diferenciação das estruturas espermáticas, especialmente o acrossoma (ZAMBELLI; CUNTO, 2006; MORAIS *et al.*, 2022).

As características morfológicas em espermatozoides nos zangões estão associadas ao seu genótipo e, em menor grau, a idade e a estação do ano (RHODES *et al.*, 2011). Segundo Gontarz *et al.* (2016), as características morfológicas dos espermatozoides são, até certo ponto, dependentes

de fatores ambientais, no entanto, tem se observado que os espermatozoides apresentam mais anormalidades ao final da estação reprodutiva, principalmente em sua cauda.

### **3. JUSTIFICATIVA**

As abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), possuem um importante papel econômico e ecológico, sendo responsável pela polinização de inúmeras espécies vegetais, as quais são utilizadas na alimentação dos seres vivos, assim como fonte de renda através dos seus subprodutos para agricultores familiares e, médios e grandes empresários. Contudo os machos dessas abelhas, os zangões, geralmente são desprezados pelos criadores, sendo eles, fundamentais nos aspectos reprodutivos para a perpetuação da espécie, assim como seus processos de produção, sendo estes fatores limitantes dos programas de desenvolvimento genético em abelhas. Apesar de ter uma população estável, nos últimos anos vem decrescendo devido a destruição do seu habitat, doenças, ação de agrotóxicos, fome e ao fenômeno CCD (singla em inglês Colony Collapse Disorder) que é conhecido como o distúrbio do colapso das colônias, o qual leva a perda das colônias. Diante disso, é de extrema importância o conhecimento acerca da sua biologia reprodutiva e pesquisas sobre as aplicações reprodutivas e de conservação, as quais poderão auxiliar na preservação da espécie. Além de proporcionar material biológico de qualidade para o setor produtivo, pois carecem de materiais selecionados afim de melhorar seus plantéis com abelhas mais produtivas e resistente a doenças.

Atualmente informações sobre os aspectos biológicos das abelhas operárias e rainha são abundantes, no entanto quando se fala em zangões, são escassas. Desse modo, o presente estudo proporciona informações que poderão contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva dos zangões de abelhas africanizadas, bem como novos protocolos de avaliação espermática, além da criopreservação dos espermatozoides como meio de conservação, devido a sua importância ambiental e contribuição para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Contudo, essas informações serão fundamentais na formação de bancos de germoplasma masculino.

#### **4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

O uso de diferentes diluentes promovem diferenças na qualidade do sêmen sob condições de refrigeração a 16°C.

O uso de diferentes diluentes promovem diferenças na qualidade do sêmen sob condições de criopreservação a -196°C.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo geral**

- Estabelecer um protocolo de refrigeração e criopreservação do sêmen de zangões de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*).

### **5.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito de diferentes diluentes na preservação de sêmen refrigerado de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) a uma temperatura de 16 °C.
- Avaliar o efeito de diferentes diluentes na criopreservação do sêmen de abelhas africanizadas (*A. mellifera*).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELKADER, F.; KAIRO, G.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; SENECHAL, J.; CRAUSER, D.; VERMANDERE, J.; ALAUX, C.; CONTE, Y.; BELZUNCES, L.; BARBOUCHE, N.; BRUNET, J.-L. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 215–223, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0240-7>
- ALCAY, S.; USTUNER, B.; CAKMAK, I.; CAKMAK, S.; NUR, Z. Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 21, p. 31-35, 2015. <https://doi.org/10.9775/KVFD.2014.11515>.
- ALCAY, S.; CAKMAK, S.; CAKMAK, I.; MULKPINAR, E.; GOKCE, E.; USTUNER, B.; SEN, H.; NUR, Z. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. **Cryobiology**, v. 87, p. 28–31, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.005>
- ALÇAY, S.; ÇAKMAK, S.; ÇAKMAK, İ.; AKTAR, A.; YILMAZ, M.; ÜSTÜNER, B.; DUMAN, M.; ÖZKAN, H.; AKKAYA, Y.; SAĞIRKAYA, H.; NUR, Z.. Honey bee drone (*Apis mellifera*) sperm cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented extenders. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 1, n. 73, 2022.
- ALMEIDA, R.; SOARES, E. E. A. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apoidea). **Interciencia**, v. 27, n. 6, p. 317-321, 2002.
- ARAUJO NETO, Edgar Rodrigues de *et al.* **Produção de zangões de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. no semiárido nordestino do Brasil**. Orientador: Dejair Message. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2019.
- AUTH, C. A.; HOPKINS, B. K. Nitrogen vapor immersion: An accessible alternative for honey bee (*Apis mellifera* L.) semen cryopreservation. **Cryobiology**, v. 100, p. 12–18, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.04.006>
- ÁVILA-PORTILLO, L. M.; MADERO, J. I.; LÓPEZ, C.; LEÓN, M. F.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L. G.; GÓMEZ, C. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología**, v. 57, n. 4, p. 291–300, 2005.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 17–32, 2005. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.14429>

BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D.; YOUNGQUIST, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 147–157, 1990. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90586-I](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90586-I)

BRUTSCHER, L. M.; BAER, B.; NIÑO, E. L. Putative Drone Copulation Factors Regulating Honey Bee (*Apis mellifera*) Queen Reproduction and Health: A Review. **Insects**, v. 10, n. 1, p. 8, 2019. <https://doi.org/10.3390/insects10010008>

CARVALHO, R. G. *Apis mellifera: reprodução, polinização e produção de mel*. Orientador: Wellington Marcelo Queixa Moreira. 2010. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Faculdades Integradas Fafibe, Bebedouro/SP, 2010.

CASTELO, T. DE S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67–75, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.3.885>

CASTILHOS, D.; DOMBROSKI, J. L. D.; BERGAMO, G. C.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas. **Apidologie**, v. 50, n. 5, p. 657–668, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00676-x>

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (Ed.). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 1998.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 42, n. 5, p. 479–488, 2007.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, Proceedings of the 2005 Annual Conference of the Society for Theriogenology. v. 64, n. 3, p. 457–468, 1 ago. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.005>

COBEY, S. W. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. **Apidologie**, v. 38, n. 4, p. 390–410, 2007. <https://doi.org/10.1051/apido:2007029>

COBEY, S. W.; TARPY, D. R.; WOYKE, J. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, p. 1–18, 2013. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.09>

COLLINS, A. M.; DONOGHUE, A. M. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1513–1523, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00094-1)

COLLINS, A. M. Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Stored at Above-Freezing Temperatures. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 568–571, 2000. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.568>

COLLINS, A. M. Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 45, n. 3, p. 231–237, 2004. <https://doi.org/10.1080/07924259.2004.9652594>

DADKHAH, F.; NEHZATI-PAGHALEH, G.; ZHANDI, M.; EMAMVERDI, M.; HOPKINS, B. K. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 4, p. 279–283, 2016. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243292>

DOWSETT, K. F.; OSBORNE, H. G.; PATTIE, W. A. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 463–472, 1984. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90046-3)

FERREE, P. M.; McDONALD, K.; FASULO, B.; SULLIVAN, W. The Origin of Centrosomes in Parthenogenetic Hymenopteran Insects. **Current Biology**, v. 16, n. 8, p. 801–807, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.03.066>

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, n. 2, p. 81–89, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0089-z>

FLOWERS, W. L. Increasing fertilization rate of boars: influence of number and quality of spermatozoa inseminated. **Journal of Animal science**, v. 80, n. 1, p. 47-53, 2002.

FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44 Suppl 1, p. 154–159, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01154.x>

FOULKES, J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 49, n. 2, p. 277–284, 1977. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0490277>

FOXCROFT, G. R.; DYCK, M. K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W. T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, Proceedings of the VIth International Conference on Boar Semen Preservation. v. 70, n. 8, p. 1324–1336, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.015>

FREE, J. B.; WILLIAMS, I. H. Factors determining the rearing and rejection of drones by the honeybee colony. **Animal Behaviour**, v. 23, p. 650–675, 1975. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(75\)90143-8](https://doi.org/10.1016/0003-3472(75)90143-8)

GADEA, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 431–444, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.023>

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 127–138, 1986. <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.1.127>

GENÇER, H. V.; KAHYA, Y. Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? **Journal of Apicultural Research**, v. 50, n. 2, p. 130–137, 2011. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.2.04>

GONÇALVES, L. S. Meio século de apicultura com abelhas africanizadas no Brasil. **Mensagem Doce**, v. 87, n. 1, p. 21-26, 2006.

GONTARZ, A.; BANASZEWSKA, D.; GRYZINSKA, M.; ANDRASZEK, K. Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 40, p. 598–602, 2016. <https://doi.org/10.3906/vet-1511-6>

GRÖTTER, L. G.; CATTANEO, L.; MARINI, P. E.; KJELLAND, M. E.; FERRÉ, L. B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene**, v. 54, n. 4, p. 655–665, 2019. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>

GUIMARÃES, D. B.; BARROS, T. B.; VAN TILBURG, M. F.; MARTINS, J. A. M.; MOURA, A. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; TONIOLLI, R. Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 183, p. 27–38, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.005>

GÜL, A.; YILDIZ, C.; COŞKUN ÇETİN, N.; YALÇIN, O. K. Effect of Ascorbic Acid and Proline Amino Acid Supplementation on Cryosurvival and Fertility Rates of Cryopreserved Honey Bee (*Apis mellifera*) Semen. **Biopreservation and Biobanking**, 2022. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0077>

GULOV, A. N.; BRAGINA, Y. E. Morphofunctional Changes in Frozen-Thawed Sperm of *Apis mellifera* Linnaeus Drones. **Russian Agricultural Sciences**, v. 48, n. 6, p. 512–520, 2022. <https://doi.org/10.3103/S1068367422060040>

HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm animals. In: HAFEZ, E.S.E. (ed.) Semen evaluation, pp. 405–423. Lea and Febiger, Philadelphia. 1993.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73–88, 1990. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>

HARBO, John R. Survival of honey bee spermatozoa in liquid nitrogen. **Annals of the entomological society of America**, v. 70, n. 2, p. 257-258, 1977.

HARBO, J. R. Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa after Two Years in Liquid Nitrogen (-196°C). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 76, n. 5, p. 890–891, 1983. <https://doi.org/10.1093/aesa/76.5.890>

HARBO, J. R.; WILLIAMS, J. L. Effect of Above-Freezing Temperatures on Temporary Storage of Honeybee Spermatozoa. **Journal of Apicultural Research**, v. 26, n. 1, p. 53–55, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.1987.11100735>

HARBO, J. R. Artificial Mixing of Spermatozoa from Honeybees and Evidence for Sperm Competition. **Journal of Apicultural Research**, v. 29, n. 3, p. 151–158, 1990. <https://doi.org/10.1080/00218839.1990.11101212>

HARRISON, R. A.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343–352, 1990. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880343>

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 3–22, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00152-4)

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219–228, 1984.

JOHNSON, L. A. *et al.* Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 143–172, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00157-3)

KAFTANOGLU, O.; PENG, Y.-S. Preservation of Honeybee Spermatozoa in Liquid Nitrogen. **Journal of Apicultural Research**, v. 23, n. 3, p. 157–163, 1984. <https://doi.org/10.1080/00218839.1984.11100625>

KAULENAS, M. S. Insect accessory reproductive structures: function, structure, and development. **Springer Science & Business Media**, 2012.

KENT, R. B. The Introduction and Diffusion of the African Honeybee in South America. **Yearbook of the Association of Pacific Coast Geographers**, v. 50, p. 21–43, 1988.

KERR, W. E.; BUENO, D. Natural Crossing Between *Apis mellifera* Adansonii and *Apis mellifera* Ligustica. **Evolution**, v. 24, n. 1, p. 145–148, 1970. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1970.tb01747.x>

KOVAC, H.; STABENTHEINER, A.; BRODSCHNEIDER, R. Contribution of honeybee drones of different age to colonial thermoregulation. **Apidologie**, v. 40, n. 1, p. 82–95, 2009.

KRAUS, F. B.; NEUMANN, P.; SCHARPENBERG, H.; VAN PRAAGH, J.; MORITZ, R. F. A. Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 16, n. 5, p. 914–920, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00593.x>

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1279–1289, 1993. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90230-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90230-3)

LASHARI, A.; GHRAMH, H. A.; IQBAL, A.; RAFIQUE, M. K.; MAHMOOD, R.; AHMED, A. M.; KHOSO, F. N.; AHMAD, S.; AL-SHEHRI, B. M.; MOHAMMED, M. E. A.; KHAN, K. A. Instrumental insemination: a nontraditional technique to produce superior quality honey bee (*Apis mellifera*) queens. **Journal of King Saud University - Science**, p. 102077, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102077>

LOCKE, S.; PENG, Y. The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). **Physiological entomology**, v. 18, n. 2, p. 144–148, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00461.x>

LOEZA-CONCHA, H.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, Á.; COPAS-MEDINA, K.; VIVAS-RODRÍGUEZ, J.; ESCALERA-VALENTE, F.; RAMÓN-UGALDE, J. Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*). **Abanico veterinario**, v. 9, 2019. <https://doi.org/10.21929/abavet2019.921>

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

LOVE, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 547–557, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.007>

MACKENSEN, O. Experiments in the Technique of Artificial Insemination of Queen Bees1. **Journal of Economic Entomology**, v. 48, n. 4, p. 418–421, 1955. <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.418>

MAINI, S.; MEDRZYCKI, P.; PORRINI, C. The puzzle of honey bee losses: a brief review. **Bulletin of Insectology**, v. 63, n. 1, p. 153-160, 2010.

MATTILA, H. R.; SEELEY, T. D. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. **Science**, v. 317, n. 5836, p. 362–364, 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1143046>

MCPHAIL, D. B.; GOODMAN, B. A. Tris buffer--a case for caution in its use in copper-containing systems. **Biochemical Journal**, v. 221, n. 2, p. 559–560, 1984.

MORAIS, L. S. Avaliação dos parâmetros espermáticos de zangões de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. no semiárido nordestino do Brasil. Orientador: Dejair Message. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2019.

MORAIS, L. S.; ARAUJO NETO, E. R.; SILVA, A. M.; MARINHO, D. E. L.; BEZERRA, L. G. P.; VELARDE, J. M. D. S.; SILVA, A. R.; GRAMACHO, K. P.; MESSAGE, D. Sperm characteristics of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) drones during dry and wet seasons in the Caatinga biome. **Journal of Apicultural Research**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2022. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2113328>

MURRAY, J. F.; VAN DER HORST, G.; ALLSOPP, M.; KOTZÉ, R. C. M. A new fluorescent method to determine honey bee sperm motility parameters with computer-aided sperm analysis. **Journal of Apicultural Research**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2022. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2090729>

NUR, Z.; SEVEN-CAKMAK, S.; USTUNER, B.; CAKMAK, I.; ERTURK, M.; ABRAMSON, C. I.; SAĞIRKAYA, H.; SOYLU, M. K. The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. **Apidologie**, v. 43, n. 1, p. 31–38, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1>

PAGE, R. E. Sperm Utilization in Social Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 31, n. 1, p. 297–320, 1986. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.31.010186.001501>

PAILLARD, M.; ROUSSEAU, A.; GIOVENAZZO, P.; BAILEY, J. L. Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 4, p. 1412–1418, 2017. <https://doi.org/10.1093/jee/tox149>

PETTIS, J. S. RICE, N.; JOSELOW, K.; VANENGELSDORP, D.; CHAIMANEE, V. Colony Failure Linked to Low Sperm Viability in Honey Bee (*Apis mellifera*) Queens and an Exploration of Potential Causative Factors. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0147220, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147220>

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. de M.; LOPES, M. T. do R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, É. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 422–442, 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>

PORTUGAL, J.; WARING, M. J. Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimide (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 949, n. 2, p. 158–168, 1988. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(88\)90079-6](https://doi.org/10.1016/0167-4781(88)90079-6)

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

QUARTUCCIO, M.; CRISTARELLA, S.; SCROFANI, A.; BIONDI, V.; DE MAJO, M.; MANNARINO, C.; CRAVANA, C.; MEDICA, P.; FAZIO, E. The sperm of *Apis mellifera siciliana* and *Apis mellifera ligustica*: A preliminary and comparative note. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1011–1016, 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1752465>

RAJAMOHAN, A.; DANKA, R. G.; HOPKINS, B. K.; RINEHART, J. P. A non-activating diluent to prolong in vitro viability of *Apis mellifera* spermatozoa: Effects on cryopreservation and on egg fertilization. **Cryobiology**, v. 92, p. 124–129, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.045>

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

RHODES, J. HARDEN, S.; SPOONER-HART, R.; ANDERSON, D.; WHEEN, G. Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. **Apidologie**, v. 42, n. 1, p. 29, 2011. <https://doi.org/10.1051/apido/2010026>

RHODES, J. W. **Quality of commercially reared queen and drone honey bees (*Apis mellifera* L.) in Eastern Australia.** 2011.

ROUSSEAU, A.; FOURNIER, V.; GIOVENAZZO, P. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. **The Canadian Entomologist**, v. 147, n. 6, p. 702–711, 2015. <https://doi.org/10.4039/tce.2015.12>

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. DE C. S.; SILVA, L. D. M. DA. Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 767–774, 2006. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26555>

SILVA, A. R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 119-127, 2007.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

TAYLOR, M. A.; GUZMÁN-NOVOA, E.; MORFIN, N.; BUHR, M. M. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 149–159, 15 jul. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.012>

UMESIOBI, D. O. Boar effects and their relations to fertility and litter size in sows. **South African Journal of Animal Science**, v. 40, n. 5, p. 471–475, 2010.

VANENGELSDORP, D.; TRAYNOR, K. S.; ANDREE, M.; LICHTENBERG, E. M.; CHEN, Y.; SAEGERMAN, C.; COX-FOSTER, D. L. Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0179535, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179535>

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology. v. 70, n. 3, p. 448–462, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.023>

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)

WEGENER, J.; BIENEFELD, K. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. **Theriogenology**, v. 77, n. 3, p. 600–607., 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.036>

WEGENER, J. *et al.* A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. **Cryobiology**, v. 69, n. 2, p. 236–242, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.011>

WINSTON, M. L. **The Biology of the Honey Bee**: Cambridge, MA: Harvard University Press, 1991.

WOYKE, J.; RUTTNER, F. An Anatomical Study of the Mating Process in the Honeybee. **Bee World**, v. 39, n. 1, p. 3–18, 1958. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1958.11095028>

WOYKE, J. Natural and Artificial Insemination of Queen Honeybees. **Bee World**, v. 43, n. 1, p. 21–25, 1962. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1962.11096922>

WOYKE, J. Causes of Repeated Mating Flights by Queen Honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 3, n. 1, p. 17–23, 1964. <https://doi.org/10.1080/00218839.1964.11100077>

YÁNIZ, J.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, P. Effect of chamber characteristics, incubation, and diluent on motility of honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm. **Apidologie**, v. 50, n. 4, p. 472–481, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00659-y>

YÁNIZ, J. L.; SILVESTRÉ, M. A.; SANTOLARIA, P. Sperm Quality Assessment in Honey Bee Drones. **Biology**, v. 9, n. 7, p. 174, 2020. <https://doi.org/10.3390/biology9070174>

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47–64, 2016.

ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: techniques and analysis. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 159–165, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.054>

**CAPÍTULO I – THE EFFECTS OF FOUR EXTENDERS ON REFRIGERATED  
AFRICANIZED HONEY BEE SEMEN**

(Artigo experimental)

**SUBMETIDO NA ANNALS OF ANIMAL SCIENCE**

**QUALIS:** Quadriênio 2017-2020: A1

**FATOR DE IMPACTO:** 2,667

## The effects of four extenders on refrigerated Africanized honey bee semen

Os efeitos de quatro diluentes no sêmen refrigerado de abelhas africanizadas

Lucas da Silva Morais<sup>1</sup>, Edgar Rodrigues de Araujo Neto<sup>1</sup>, Andreia Maria da Silva<sup>2</sup>, Luana Grasiele Pereira Bezerra<sup>2</sup>, Ana Flávia Santos da Cunha<sup>3</sup>, João Batista Freire de Souza Junior<sup>2</sup>, Alexandre Rodrigues Silva<sup>2,\*</sup>, Débora Andréa Evangelista Façanha<sup>4</sup>, Katia Peres Gramacho<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Beekeeping Technological Training Center, Federal Rural University of Semi-Arid – UFERSA, 59625900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory on Animal Germplasm Conservation, Federal Rural University of Semi-Arid, 59625900, Mossoro, Rio Grande do Norte, Brazil.

<sup>3</sup>Tiradentes University, 49032971, Aracaju, Sergipe, Brazil.

<sup>4</sup>University of the International Integration of Afro-Brazilian Lusophony – UNILAB, Rural Development Institute, 62790790, Redenção, Ceará, Brazil

\*Corresponding author. Alexandre Rodrigues Silva, alexrs@ufersa.edu.br, BR 110, Km 47, Costa and Silva, 59625900, Mossoró, RN, Brazil.

**Abstract:** Given the importance of bees to man and the world, there is a need for tools to preserve them. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of different diluents on the preservation of cooled semen from Africanized honey bees at a temperature of 16°C. For this, four modified diluents, Tris, Tris + EY, Collins and Ringer, were diluted in a ratio of 12:1 (diluent: semen) and subsequently tested. The semen samples were collected from Africanized honey bee drones with ages between ≥12 days and evaluated for pH, motility, viability, hypo-osmotic (HOST) and sperm

morphology. The samples were cooled in a biological demand oxygen incubator at  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  for a maximum period of 96 h. A statistically significant effect was observed in the semen metrics in sperm motility ( $P<0.05$ ), with the Tris and Tris + EY diluents being the most efficient at 96 h. In terms of viability, the diluents differed from one another in terms of the viability effect from 72 h of refrigeration ( $P<0.05$ ). As well as there was a significant relationship between the diluents and time on HOST from 24 h of refrigeration ( $P<0.05$ ). A high incidence of morphological abnormalities ( $>40\%$ ) was observed in all refrigerated diluents and was significantly more evident in the Ringer diluent ( $<65\%$ ). Fresh semen presented the best metrics in most of the evaluated parameters ( $P<0.05$ ). In conclusion, considering all sperm parameters, the Tris diluent was the ideal for the preservation of drone semen when cooled at  $16^\circ\text{C}$ .

**Keywords:** Africanized drones, sperm viability, HOST, sperm motility, sperm morphology.

## 1. Introduction

Bees are known worldwide for their importance in plant pollination. This service, between pollinator and plant, ensures the survival of both species. In addition to pollination services, commercial beekeeping, also known as apiculture, has an important place for humans when considering the production of its by-products, such as honey, pollen, propolis, royal jelly, bee wax, and bee venom (Pettis *et al.*, 2016; Martinello and Mutinelli, 2021). However, there are several subspecies of bees potentially threatened by introgression and human activities (Klein *et al.*, 2017; Belsky and Joshi, 2019). In light of this, germplasm conservation through biotechnologies such as refrigeration and cryopreservation followed by artificial insemination can provide a resource for biodiversity preservation (COLLINS, 2000; GÜL *et al.*, 2017).

For instrumental insemination in bees of the genus *Apis*, fresh semen from drones is collected and stored at temperatures above zero for up to 39 weeks (COBEY, 2007; PAILLARD et al., 2017). According to (Harbo and Williams, 1987), drone semen can be stored between 13°C and 25°C; however, sperm motility and viability seem to be higher when stored between 12°C and 16°C (Locke and Peng, 1993; Paillard *et al.*, 2017). However, this semen storage leads to a loss of sperm quality, and as queen bees mate only once in their life, they must receive a high percentage of viable sperm, capable of producing fertilized eggs throughout their life (COBEY, 2007). Given this importance, the higher the sperm quality, the better the efficiency during instrumental insemination (COBEY; TARPY; WOYKE, 2013). Therefore, the use of diluted semen refrigeration arises as an alternative to maintaining seminal quality.

In the refrigeration of semen from bee drones, the use of diluents is necessary, which provide a protective medium for sperm. In bees, various diluents have been used (MORITZ, 1984). However, the scientific community has not yet agreed on which diluent is the most efficient. In addition to diluents, dilution makes it possible to reduce competition between sperm for oxygen and space, thereby preventing the initiation of cell death (TAYLOR *et al.*, 2009).

Previous investigations have looked into the influence of different diluents and temperatures on the semen of European honey bee drones (COLLINS, 2000; RAJAMOHAN *et al.*, 2020; TAYLOR *et al.*, 2009) and little research has been done on Africanized honey bees (Almeida and Soares, 2002; Morais *et al.*, 2022). This semen biotechnology has contributed to the success of propagating numerous species and is considered an important tool for animal reproduction, including bees (ALCAY *et al.*, 2019; YÁNIZ; SILVESTRE; SANTOLARIA, 2020). The hypothesis raised in this study is that the diluents tested here will provide distinct results in the refrigeration process, given their composition and temperature used.

Therefore, this study aimed to evaluate the effect of different diluents on the preservation of refrigerated semen from Africanized honey bees (*Apis mellifera*) at a temperature of 16°C.

## **2. Material and methods**

The experiments were conducted at the Nucleus of Technological Training in Apiculture - NCTA and at the Laboratory of Animal Germplasm Conservation - LCGA of the Federal Rural University of the Semi-Arid Region - UFERSA (5°03'37"S and 37°23'50"W; average temperature range, 27 - 29°C, located in Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil). The chemical products used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### **2.1. Animals**

The Africanized honey bee drones were captured from 30 different colonies. The drones were collected at the beehive entrance using a bee escape in which they were retained. Them, the Drones were evaluated in regard to maturity, and when they were considered mature when they exhibited endophallus tip complete eversion and semen presence they were used in experiment (Collins and Donoghue, 1999). A total of 500 Africanized honey bee drones were used in the experiment.

### **2.2. Semen collection and dilution**

Semen collection was performed using the standard collection technique (Collins and Donoghue, 1999). Briefly, the semen was collected using a modified Harbo syringe (HARBO, 1985) developed by Schley, designed for bee insemination. Ten collections were performed, totaling ten repetitions. In each collection, the semen samples were diluted in four treatments, except the fresh one which was not diluted and considered as the control.

After semen collection in each repetition, the samples were diluted in four different diluents, mentioned in table 1, in a proportion of 12:1 (diluent: semen, respectively). After dilution, the samples were divided into five equal parts, containing 20 µL in each microtube. In all diluents, 10% dimethylsulfoxide (DMSO) was added to their formulation as cryoprotectant. The Tris + EY diluent was added 20% egg yolk in its final volume.

**Table 1.** Composition and characteristics of the diluents tested in the collection and sperm parameters of Africanized honey bees (*A. mellifera*).

Name	Component	g/100 mL H <sub>2</sub> O	pH	Authors
Tris	Tris base	7.640	7.5	Modified from Taylor <i>et al.</i> (2009).
	D+ Glucose	1.052		
	Citric acid	3.832		
Tris + EY	Tris base	7.640	7.5	Modified from Dadkhah <i>et al.</i> (2016).
	D+ Glucose	1.052		
	Citric acid	3.832		
	Egg yolk	20% (v/v)		
Collins	D+ Glucose	0.300	7.5	Modified from Collins (2000).
	Potassium chloride	0.410		
	Sodium bicarbonate	0.210		
	Sodium chloride dihydrate	2.430		
Ringer	Potassium chloride	0.025	6.35	Modified from Camargo (1975)
	Calcium chloride	0.030		
	Sodium chloride dihydrate	0.850		
	D+ Glucose	0.500		

### 2.3. Refrigeration protocol

The microtubes containing the diluted semen were refrigerated in an oxygen biological demand incubator (BOD) at 16 ± 1°C for a maximum period of 96 h. Being evaluated at times 0, 24, 48, 72 and 96 h of cooling. The moment 0 h was evaluated immediately after dilution along with the fresh one.

### 2.4. Evaluation of sperm parameters

The hydrogen ion potential (pH) was evaluated in fresh and diluted semen before and after refrigeration using a pH measuring tape (Merck, São Paulo).

Sperm motility, was evaluated using 5 µL of the fresh and diluted sample on a preheated glass slide (34°C) which was analyzed under a light microscope (x10). Motility was classified according to the number of moving sperm from 0% to 100% (MORAIS et al., 2022)

The sperm viability, was given through a fluorescent solution composed of 5 µL of Hoechst 342 (H-342; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 1 µL of propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA). 2 µL aliquots of the fresh and diluted semen sample were incubated for 10 minutes at 34°C in the fluorescent solution and subsequently evaluated by epifluorescence microscopy (400x; Episcopic Fluorescent attachment “EFA” Halogen Lamp Set; Leica, Kista, Sweden) (MORAIS et al., 2022). For each sample, 100 sperm were counted; those that presented blue-marked heads were classified as viable while those that were marked totally or partially in red were classified as non-viable (Hopkins and Herr, 2010).

The hypo-osmotic swelling test (HOST) was used to evaluate the functional integrity of the sperm membrane, based on curled and swollen tails. Through the incubation of 5 µL of semen in 45 µL hypo-osmotic solution at 0 mOsm/L (distilled water) for 60 minutes of incubation period at 34°C (NUR et al., 2012). After the incubation period, an aliquot of incubated semen was placed on a glass slide, covered with a cover slip and evaluated under a phase contrast microscope (x40). Microscope fields were selected randomly. 100 sperm were evaluated per slide, and the percentages of sperm with curled tails were calculated (NUR et al., 2004).

For evaluating the sperm morphology, semen smears were used by mixing 5 µL of semen with 45 µL of Bengala Rose stain (Cromato, SP, Brazil), which were incubated for 2 h at room

temperature. Then, a drop of 10 µL was placed on a glass slide and covered with a coverslip. After 24 h, a total of 100 cells were counted using optical microscopy (x100) in random fields. The percentages of normal and altered spermatozoa were verified for each smear. Morphological defects were classified according to the region of the spermatozoa, such as head and tail (MORAIS et al., 2022).

## 2.5. Statistical analysis

Sperm traits were expressed as mean ± standard error. The data were examined for parametric assumptions: normality using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity using Levene's test. Fresh semen was considered one of the treatments, and Dunnett's test was applied to compare it with the other treatments. Subsequently, a two-way ANOVA using a general linear model (PROC GLM) of the Statistical Analysis System (version 8.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was performed to evaluate the effects of the treatment, incubation time (0, 24, 48, 72 and 96 h) and its interaction on the sperm traits. Incubation time was considered a repeated measure. Finally, Tukey's test for Adjusted Multiple Comparisons was used to verify the potential differences between the means. Statistical significance was set at P<0.05.

## 3. Results

### 3.1. Sperm parameters of fresh and diluted semen in different diluents and refrigerated at 16°C

After refrigeration, there was a significant decrease (P<0.05) in most sperm parameters (Table 2) compared to fresh samples. Regarding sperm motility, none of the experimental groups were similar to fresh (P<0.05). However, post-refrigeration values for broken tail and double tail morphological abnormalities in all experimental groups were similar to those observed for fresh

semen ( $P<0.05$ ). However, in the case of curled tail abnormality, the Collins and Ringer diluents stand out negatively when compared to other treatments ( $P<0.05$ ).

**Table 2.** Mean values ( $\pm$  SEM) of the motility patterns, viability, hypo-osmotic swelling test (HOST), pH, normal sperm, and abnormal sperm with coiled tail, broken tail, and double tail in fresh and refrigerated semen at 16°C in different semen extenders.

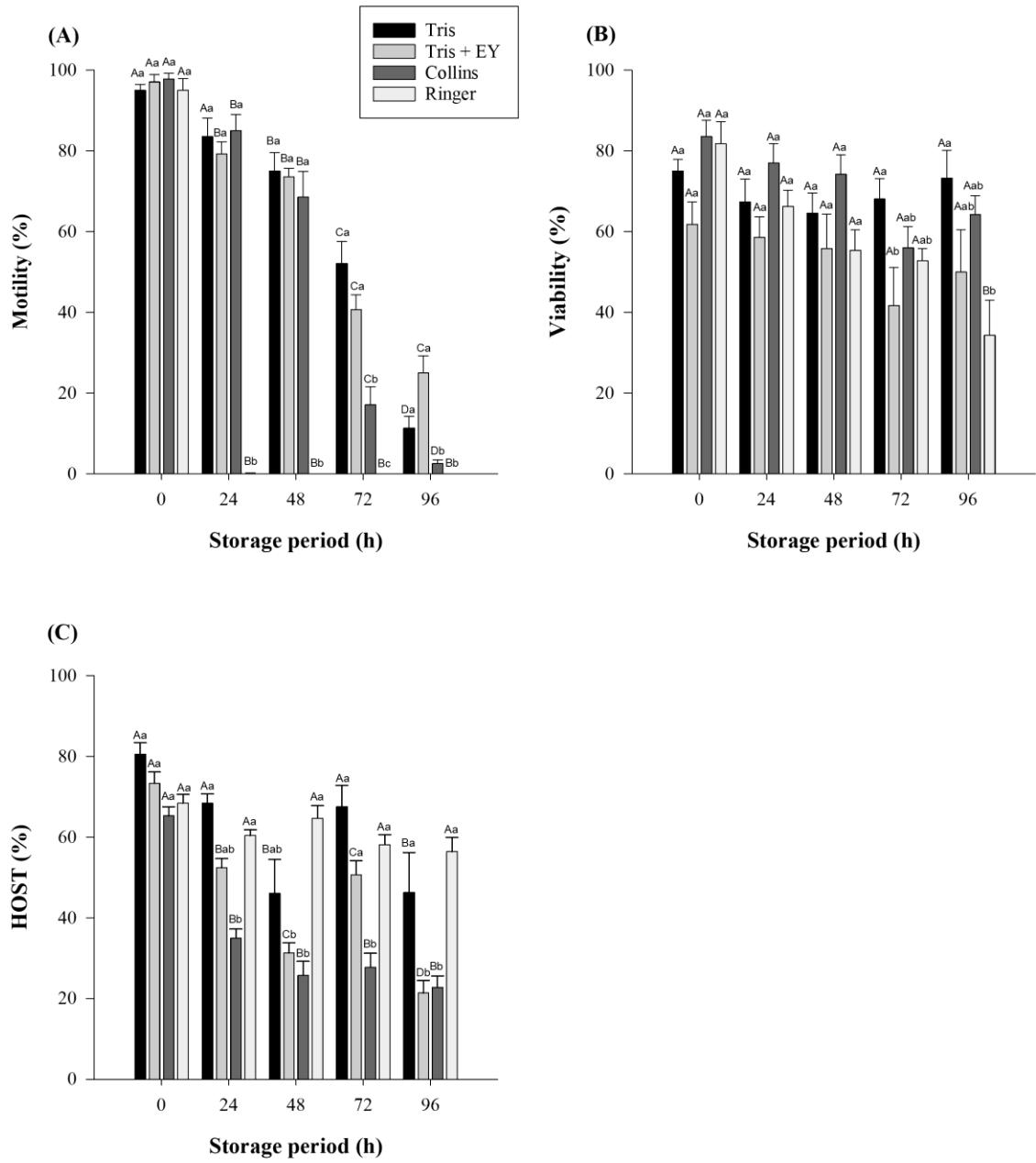
Sperm Parameters	Semen Extenders				
	Fresh	Tris	Tris + EY	Collins	Ringer
Motility	95.7 $\pm$ 1.7 <sup>A</sup>	63.4 $\pm$ 5.3 <sup>Ba</sup>	63.1 $\pm$ 4.7 <sup>Ba</sup>	54.2 $\pm$ 6.7 <sup>Bb</sup>	19.1 $\pm$ 6.5 <sup>Bc</sup>
Viability	71.8 $\pm$ 4.6 <sup>A</sup>	69.7 $\pm$ 2.3 <sup>Aa</sup>	53.6 $\pm$ 3.6 <sup>Bb</sup>	71.1 $\pm$ 2.6 <sup>Aa</sup>	58.2 $\pm$ 3.6 <sup>Ab</sup>
HOST	63.3 $\pm$ 3.4 <sup>A</sup>	61.8 $\pm$ 3.6 <sup>Aa</sup>	45.8 $\pm$ 3.3 <sup>Bb</sup>	35.4 $\pm$ 2.9 <sup>Bc</sup>	61.6 $\pm$ 1.3 <sup>Aa</sup>
pH	7.5 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	7.3 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	7.1 $\pm$ 0.1 <sup>Bb</sup>	7.4 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	5.7 $\pm$ 0.1 <sup>Bc</sup>
Normal sperm	46.1 $\pm$ 4.6 <sup>A</sup>	49.6 $\pm$ 2.5 <sup>Aa</sup>	38.2 $\pm$ 2.4 <sup>Ab</sup>	29.1 $\pm$ 1.7 <sup>Bc</sup>	16.5 $\pm$ 1.8 <sup>Bd</sup>
Curled Tail	53 $\pm$ 4.6 <sup>A</sup>	49.7 $\pm$ 2.5 <sup>Aa</sup>	60.3 $\pm$ 2.4 <sup>Ab</sup>	70.4 $\pm$ 1.6 <sup>Bc</sup>	83.2 $\pm$ 1.8 <sup>Bd</sup>
Broken Tail	0.7 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	0.7 $\pm$ 0.4 <sup>Aa</sup>	1.4 $\pm$ 0.5 <sup>Aa</sup>	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	0.2 $\pm$ 1.7 <sup>Aa</sup>
Double Tail	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	0.1 $\pm$ 0.1 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Aa</sup>

<sup>A, B</sup>Values with different letters on the same row differ significantly between fresh and refrigerated groups (Dunnett's test;  $P<0.05$ ).

<sup>a, b, c, d</sup>Values with different letters on the same row differ significantly between semen extenders (Tukey test;  $P < 0.05$ )

### 3.2. Motility, viability, and HOST in different diluents and refrigeration time

A significant effect was observed in the metrics of semen from Africanized honey bee drones in relation to the diluent and the refrigeration time (Fig. 1,  $P<0.05$ ). Sperm motility differed among treatments ( $P<0.05$ ), with the Tris and Tris + EY diluents being the most efficient at 96 h ( $P>0.05$ ; Fig. 1A), however, all diluents had a significant decrease over time ( $P<0.05$ ). The diluents differed from each other on the effect of viability from 72 h of refrigeration ( $P<0.05$ ; Fig. 1B) and only the Ringer diluent obtained a significant decrease over the refrigeration time after 48 h. There was a significant relationship between the diluents and the time on the HOST from 24 h of refrigeration ( $P<0.05$ ; Fig. 1C).



**Figure 1.** Average percentages ( $\pm$  SEM) of motility (A), viability (B), and the HOST (C) in samples refrigerated at 16°C, over the storage time. Means followed by different uppercase letters indicate significant differences between the refrigeration times within each diluent, and means followed by lowercase letters indicate a significant difference between the experimental groups (Tukey test; P<0.05).

### 3.3. The effect of diluents and 16°C refrigeration at different times on sperm morphology

Morphologically, a higher value (P<0.05) of normal spermatozoa was observed in the Tris diluent compared to the Ringer diluent after 96 h of refrigeration, Tris + EY and Collins did not differ from the others (P>0.05; Table 3). The time effect was only significant for the Ringer diluent (P<0.05), with 24 and 72 h being the times that showed the lowest amount of normal spermatozoa 9.4  $\pm$  1.2% and 11.4  $\pm$  1.9% respectively. Regarding sperm abnormalities, the broken tail and double tail defects were not significant between the diluents and refrigeration time (P>0.05). However, the tail curled effect was significant (P < 0.05; Table 4), with the Ringer diluent showing the highest averages at all refrigeration times, exceeding 65% of tail curled defect.

**Table 3.** Mean values ( $\pm$  SEM) for normal sperm of Africanized honey bee drones submitted to refrigerated at 16°C in different semen extenders and storage period.

Semen extenders	Storage period				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Tris	59.3 $\pm$ 3.7 <sup>Aa</sup>	43.4 $\pm$ 4.5 <sup>Aa</sup>	56.1 $\pm$ 5.4 <sup>Aa</sup>	45.9 $\pm$ 5.8 <sup>Aa</sup>	43.1 $\pm$ 6.2 <sup>Aa</sup>
Tris + EY	45.0 $\pm$ 6.0 <sup>Aab</sup>	34.3 $\pm$ 2.1 <sup>Aa</sup>	39.1 $\pm$ 7.7 <sup>Aab</sup>	41.7 $\pm$ 5.5 <sup>Aa</sup>	30.9 $\pm$ 3.2 <sup>Aab</sup>
Collins	37.4 $\pm$ 2.4 <sup>Aab</sup>	28.4 $\pm$ 2.4 <sup>Aab</sup>	24.7 $\pm$ 6.5 <sup>Ab</sup>	29.0 $\pm$ 3.4 <sup>Aab</sup>	25.7 $\pm$ 2.1 <sup>Aab</sup>
Ringer	33.9 $\pm$ 4.0 <sup>Ab</sup>	9.4 $\pm$ 1.2 <sup>Bb</sup>	14.3 $\pm$ 1.8 <sup>ABb</sup>	11.4 $\pm$ 1.9 <sup>Bb</sup>	13.6 $\pm$ 2.0 <sup>ABb</sup>

<sup>A, B</sup>Values with different letters on the same row differ significantly between cooling times within each semen extender (Tukey test; P < 0.05).

<sup>a, b</sup>Values with different letters on the same row differ significantly between semen extenders (Tukey test; P < 0.05)

**Table 4.** Mean values ( $\pm$  SEM) of abnormal sperm with tail coiling defect submitted to refrigerated at 16°C in different semen extenders and storage periods.

Semen extenders	Storage period				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Tris	40.6 $\pm$ 3.7 <sup>Aa</sup>	55.4 $\pm$ 4.9 <sup>Aa</sup>	43.4 $\pm$ 5.6 <sup>Aa</sup>	53.7 $\pm$ 5.7 <sup>Aa</sup>	55.3 $\pm$ 6.4 <sup>Aa</sup>
Tris + EY	53.7 $\pm$ 5.7 <sup>Aab</sup>	64.6 $\pm$ 2.4 <sup>Aa</sup>	60.4 $\pm$ 7.6 <sup>Aa</sup>	58.3 $\pm$ 5.5 <sup>Aa</sup>	64.6 $\pm$ 4.9 <sup>Aa</sup>
Collins	62.0 $\pm$ 2.3 <sup>Aab</sup>	71.1 $\pm$ 2.3 <sup>Aab</sup>	74.6 $\pm$ 6.3 <sup>Ab</sup>	71.0 $\pm$ 3.4 <sup>Aab</sup>	73.3 $\pm$ 1.8 <sup>Aab</sup>
Ringer	65.3 $\pm$ 3.9 <sup>Ab</sup>	90.6 $\pm$ 1.2 <sup>Bb</sup>	85.7 $\pm$ 1.8 <sup>ABb</sup>	88.4 $\pm$ 1.9 <sup>Bb</sup>	86.3 $\pm$ 1.9 <sup>ABb</sup>

<sup>A, B</sup>Values with different letters on the same row differ significantly between cooling times within each semen extenders (Tukey test; P < 0.05).

<sup>a, b</sup>Values with different letters on the same row differ significantly between semen extenders (Tukey test; P < 0.05)

#### 4. Discussion

To our knowledge, this is the first article to evaluate the cooling of semen from Africanized honey bees. In which, four different diluents (Tris, Tris + EY, Collins, and Ringer) were compared in terms of their effect on sperm quality over 96 h at 16°C. The study demonstrated the possibility of using different compositions in diluents without causing extensive damage to the quality of semen during the cooling process. Additionally, the results provide a scientifically solid foundation for developing a commercially acceptable diluent for bee semen preservation.

Conservation processes at low temperatures have a destructive effect on sperm due to cold shock, ice formation, and lipid peroxidation (NUR et al., 2012; USTUNER et al., 2016). These undesirable effects when combined, act on the decrease of sperm parameters, such as, viability, functionality of the plasma membrane and acrosome integrity (ALCAY et al., 2019). Sperm motility also decreases with storage time and contamination (Locke and Peng, 1993).

Our in vitro semen assay results are in line with other studies comparing the cooling time under the decrease of sperm motility (Taylor *et al.*, 2009; Alcay *et al.*, 2019). The evaluation of motility in this study showed that semen is able to maintain motility for 96 h when cooled at 16°C, except for the Ringer diluent, which ceased motility from 48 h of cooling. It is seen that the motility of fresh and cooled sperm were affected by the diluent used. Yet, this study was not designed to test the specific components of each diluent. However, we can speculate about the effects that these diluents have on various functions of sperm cells, based on the findings of this and previous studies (Cobey, 2007; Taylor *et al.*, 2009; Abdelkader *et al.*, 2014).

In this study, the two diluents that resulted in the lowest levels of motility were those that contained higher levels of K<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Collins and Ringer), not corroborating with the findings of Taylor *et al.* (2009), which obtained results opposite to those of this study. It was seen that ions such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> are common in the semen of many species, including bees, and these in turn are known to influence sperm motility and are commonly added to semen diluent solutions (Moritz, 1984; Park and Chapman, 2005; Shaliutina *et al.*, 2013). However for the Ringer diluent, pH may have been a determining factor for the rapid decrease in motility, as a relatively more alkaline pH value stimulates motility of these sperm similar to that similar to that of mature queen's seminal fluid (Camargo, 1975). Therefore, based on these results, we infer that in addition to substances such as K<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, other factors are determinant for sperm motility.

The evaluation of stored semen viability in this study showed that bee semen can remain viable for a long period, showing a significant decrease ( $P<0.05$ ) after 72 h. The sperm refrigerated in the Ringer diluent were the ones that maintained the lowest amount of viable spermatozoa (34.4%) throughout the refrigeration period. However, we observed a survival rate above 70% for semen refrigerated in the Tris diluent. Collins (2000) found viable spermatozoa in semen

refrigerated at 12°C and 25°C after 39 weeks. Paillard *et al.* (2017) observed total mortality of spermatozoa in semen stored at 16 °C after 47 weeks of refrigeration, demonstrating that diluted bee semen can be effectively stored at temperatures above 0°C for weeks. Locke and Peng (1993) also obtained good sperm viability, being above 75% after 6 weeks of refrigeration at 21-24°C. Therefore, our results confirm a decrease in semen viability over time, as well as demonstrate the importance of choosing a good diluent for the conservation of Africanized honey bee semen, which is still not well known.

In addition to sperm viability, HOST is the optimized test to detect subtle changes in the functional integrity of the sperm membrane (Jeyendran *et al.*, 1984; Alcay *et al.*, 2019). Various physiological processes during fertilization require a functionally intact membrane (NUR *et al.*, 2012). In this study, distilled water was used as a determinant to evaluate the reactivity of honey bee sperm. This test is based on the ability of functionally intact sperm to swell after exposure to a hypo-osmotic solution (Ahmadi and Ng, 1997; Nur *et al.*, 2004). Therefore, cold shock causes the phase transition of membrane lipids after the plasma membrane loses its selective permeability (TAYLOR *et al.*, 2009). That said, protection against cold shock is possible with increased membrane fluidity (PALHARES *et al.*, 2021). Accordingly, egg yolk was added to the Tris diluent in order to protect the sperm plasma membrane, due to its amount of lipoproteins that act in protecting the membrane during the cooling and freezing process (Aboagla and Terada, 2004; Dadkhah *et al.*, 2016; Loeza-Concha *et al.*, 2019). We found values of functional integrity of the membrane in all treatments, which began to show a decrease over time from 24 h of refrigeration and the Ringer experimental group was the one that stood out from the others, showing 56.4% ± 3.5% after 96 h of refrigeration ( $P<0.05$ ). The HOST values are similar to those of the research

carried out by Alcay *et al.* (2015) who used DMSO in their diluent obtained a value of 69.5% ± 3.2% and Alcay *et al.* (2019) obtained 60.5% ± 3.4%.

A significant effect was also observed in the morphology of honey bee sperm among the experimental groups over the refrigeration time. Although the highest values for morphologically normal sperm were in the newly diluted semen in Tris (59.3% ± 3.7%), which significantly differentiated ( $P<0.05$ ) from those found in Ringer diluted (33.9% ± 4.0%), emphasizing that this significance between these two groups remained throughout the refrigeration time ( $P<0.05$ ). In the present study, an average of > 60% of abnormal sperm were found in the sperm diluted with Ringer, throughout the refrigeration time, observing all this concentration in the abnormality of the curled tail, demonstrating superiority (>20%) to those evaluated in Tris ( $P < 0.05$ ) at all refrigeration times. In addition to the effects of the dilution medium composition, we suggest that the increase in sperm damage may be a consequence of the acid pH (6.35), when compared to the others and the fresh without the use of diluent (7.5). As in the present study, Morais *et al.*, (2022) in their study with semen of Africanized honey bee drones, showed that the most common abnormalities were found in the sperm tail, being >60% with a curled tail. Which were also reported by Tarliyah *et al.* (1999). Tail double and broken abnormalities were not significant in this study ( $P>0.05$ ). However, such abnormalities can effectively impair honey bee fertilization, especially in instrumental insemination, as in nature this can be mitigated due to the queen's fertilization with multiple males (Withrow and Tarpy, 2018; Morais *et al.*, 2022). Therefore, it is important to investigate different causes that may interfere with the morphology of sperm in bees.

In conclusion, the results of this study indicated that the Tris and Tris + EY diluents preserved sperm motility better than the others. Considering all sperm parameters, the Tris diluent was the ideal for the preservation of drone semen when refrigerated. Future studies may focus on

mechanisms to improve sperm parameters during refrigeration. These are important findings to be considered for the development of conservation strategies for Africanized honey bees and formation of germplasm banks.

## 5. Conflict of interest statement

The authors state that there are no conflicts of interest.

## 6. References

- Abdelkader, F., Kairo, G., Tchamitchian, S., Cousin, M., Senechal, J., Crauser, D., Vermandere, J., Alaux, C., Conte, Y., Belzunces, L., Barbouche, N., Brunet, J.-L. (2014). Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie*, 45: 215–223.
- Aboagla, E. M.-E., Terada, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 1160–1172.
- Ahmadi, A., Ng, S.-C. (1997). The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 68: 346–350.
- Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Mulkpinar, E., Gokce, E., Ustuner, B., Sen, H., Nur, Z. (2019). Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, 87, 28–31.
- Alcay, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Cakmak, S., Nur, Z. (2015). Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. *K. Univ. Vet. Fakul. Derg.*, 21: 31–35.
- Almeida, R., Soares, E. E., A. (2002). Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apoidea). *Interciencia*, 27: 317-321.
- Belsky, J., Joshi, N. K. (2019). Impact of Biotic and Abiotic Stressors on Managed and Feral Bees. *Insects*, 10: 233.
- Camargo, C. A. (1975). Biology of the Spermatozoon of *Apis mellifera*. I. Influence Of Diluents and pH. *J. Apicult. Res.*, 14: 113–118.
- Cobey, S. W. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38(4), 390–410.

Cobey, S. W., Tarpy, D. R., Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *J. Apicult. Res.*, 52: 1–18.

Collins, A. M. (2000). Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Stored at Above-Freezing Temperatures. *J. Econ. Entomol.*, 93: 568–571.

Collins, A. M., Donoghue, A. M. (1999). Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*, 51: 1513–1523.

Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M., Hopkins, B. K. (2016). Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *J. Apicult. Res.*, 55: 279–283.

Gül, A., Şahinler, N., Onal, A. G., Hopkins, B. K., Sheppard, W. S. (2017). Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, 101: 109–113.

Harbo, J. R. (1985). Instrumental insemination of queen bees – part 1. *Am. Bee J.*, 125: 197–202.

Harbo, J. R., Williams, J. L. (1987). Effect of Above-Freezing Temperatures on Temporary Storage of Honeybee Spermatozoa. *J. Apicult. Res.*, 26: 53–55.

Hopkins, B. K., Herr, C. (2010). Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*, 41: 548–556.

Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 70: 219–228.

Klein, S., Cabirol, A., Devaud, J.-M., Barron, A. B., Lihoreau, M. (2017). Why Bees Are So Vulnerable to Environmental Stressors. *Trends Ecol. Evol.*, 32: 268–278.

Locke, S. J., Peng, Y. S. (1993). The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiol. entomol.*, 18: 144–148.

Loeza-Concha, H., Domínguez-Rebolledo, Á., Copas-Medina, K., Vivas-Rodríguez, J., Escalera-Valente, F., Ramón-Ugalde, J., Loeza-Concha, H., Domínguez-Rebolledo, Á., Copas-Medina, K., Vivas-Rodríguez, J., Escalera-Valente, F., Ramón-Ugalde, J. (2019). Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*). *Aban. Vet.*, 9.

Martinello, M., Mutinelli, F. (2021). Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxid.*, 10: 71.

Morais, L. S., Araujo Neto, E. R., Silva, A. M., Marinho, D. E. L., Bezerra, L. G. P., Velarde, J. M. D. S., Silva, A. R., Gramacho, K. P., Message, D. (2022). Sperm characteristics of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) drones during dry and wet seasons in the Caatinga biome. *J. Apicult. Res.*, 0: 1–8.

- Moritz, R. F. A. (1984). The Effect of Different Diluents on Insemination Success in the Honeybee Using Mixed Semen. *J. Apicult. Res.*, 23: 164–167.
- Nur, Z., Dogan, I., Yerlikaya, H., Soylul, M. (2004). Relationship between the canine sperm membrane integrity and other semen characteristics. *Indian Vet. J.*, 81, 1119–1121.
- Nur, Z., Seven-Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C. I., Sağırkaya, H., Soylu, M. K. (2012). The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43: 31–38.
- Paillard, M., Rousseau, A., Giovenazzo, P., Bailey, J. L. (2017). Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *J. Econ. Entomol.*, 110: 1412–1418.
- Palhares, P. C., Assis, I. de L., Machado, G. J., de Freitas, R. M. P., de Freitas, M. B. D., Paula, D. A. J., Carneiro, W. F., Motta, N. C., Murgas, L. D. S. (2021). Sperm characteristics, peroxidation lipid and antioxidant enzyme activity changes in milt of Brycon orbignyanus cryopreserved with melatonin in different freezing curves. *Theriogenology*, 176, 18–25.
- Park, C., Chapman, F. A. (2005). An Extender Solution for the Short-Term Storage of Sturgeon Semen. *N. Am. J. Aquacult.*, 67: 52–57.
- Pettis, J. S., Rice, N., Joselow, K., vanEngelsdorp, D., Chaimanee, V. (2016). Colony Failure Linked to Low Sperm Viability in Honey Bee (*Apis mellifera*) Queens and an Exploration of Potential Causative Factors. *PLOS ONE*, 11: e0147220.
- Rajamohan, A., Danka, R. G., Hopkins, B. K., Rinehart, J. P. (2020). A non-activating diluent to prolong in vitro viability of *Apis mellifera* spermatozoa: Effects on cryopreservation and on egg fertilization. *Cryobiology*, 92: 124–129.
- Shaliutina, A., Hulak, M., Gazo, I., Linhartova, P., Linhart, O. (2013). Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 139: 127–135.
- Tarliyah, L., Boediono, A., Walujo., D., Pergerakan. (1999). Spermatozoa leb ah madu *Apis mellifera* L. (hymenoptera: Apidae) pada berbagai suhu penyimpanan dalam media pengencer dengan kadar glukosa yang berbeda. *Med.Vet.*, 6: 15–20.
- Taylor, M. A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., Buhr, M. M. (2009). Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72: 149–159.
- Ustuner, B., Alcay, S., Toker, M. B., Nur, Z., Gokce, E., Sonat, F. A., Gul, Z., Duman, M., Ceniz, C., Uslu, A., Sagirkaya, H., Soylu, M. K. (2016). Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Anim. Reprod. Sci.*, 164: 97–104.

Withrow, J. M., Tarpy, D. R. (2018). Cryptic “royal” subfamilies in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. PLOS ONE, 13: e0199124.

Yániz, J. L., Silvestre, M. A., Santolaria, P. (2020). Sperm Quality Assessment in Honey Bee Drones. Biology, 9: 174.

**CAPÍTULO II – CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM AFRICANIZED HONEY  
BEEs (*Apis mellifera*) IN IN DIFFERENTS EXTENDERS**

(Artigo experimental)

**SUBMETIDO NA ANNALS OF TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION**

**QUALIS:** Quadriênio 2017-2020: A2

**FATOR DE IMPACTO:** 1,893

**Cryopreservation of semen from Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in different extenders**

Criopreservação de sêmen de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) em diferentes diluentes

Lucas S. Morais<sup>1</sup>, Edgar R. Araujo Neto<sup>1</sup>, Andreia M. Silva<sup>2</sup>, Luana G. P. Bezerra<sup>2</sup>, Ana F. S. Cunha<sup>3</sup>, Nailton O. S. Chagas<sup>1</sup>, Genevile C. Bergamo<sup>4</sup>, Alexandre R. Silva<sup>2,\*</sup>, Débora A. E. Façanha<sup>5</sup>, Katia P. Gramacho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Beekeeping Technological Training Center, Federal Rural University of Semi-Arid – UFERSA, Mossoro, RN, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory on Animal Germplasm Conservation, Federal Rural University of Semi-Arid, Mossoro, RN, Brazil.

<sup>3</sup>Tiradentes University, Aracaju, SE, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Natural Sciences, Mathematics and Statistics, Federal Rural University of Semi-Arid, Mossoro, RN, Brazil.

<sup>5</sup>University of the International Integration of Afro-Brazilian Lusophony – UNILAB, Rural Development Institute, Redenção, CE, Brazil.

\*Corresponding author.

E-mail address: alexrs@ufersa.edu.br (Alexandre R. Silva)

## **Abstract**

This study aimed to evaluate the effect of different diluents on the cryopreservation of semen from Africanized honey bees (*A. mellifera*). Three modified diluents, using a dilution ratio of 12:1 (diluent: semen) were tested. For cryopreservation, samples were cooled to 15 °C for 40 minutes in isothermal boxes and stabilized at 5 °C for 10 minutes in a biological incubator. They were then exposed to nitrogen vapor for 10 minutes and finally stored in a cryobiological container at -196 °C. After one week, the samples were thawed individually in a 37 °C water bath for 30 seconds. Sperm motility was evaluated visually in a subjective, while sperm viability was evaluated using Hoechst and propidium iodide fluorescent probes. Hypo-osmotic evaluation was given through a hypo-osmotic solution at 0 mOsm/L, and sperm morphology was evaluated using the rose Bengal. Sperm parameters were altered after the cryopreservation process. The newly diluted (non-frozen) treatments compared to the fresh (no diluent) did not affect motility and the hypo-osmotic test but affected the viability and morphology of the spermatozoa ( $P < 0.05$ ). In the thawed samples, morphology was significantly different between treatments ( $P < 0.05$ ). The other sperm parameters after freezing of the diluents were not different among them ( $P > 0.05$ ). This study was pioneering in use of different diluents to develop commercial diluent for preserving semen from Africanized bees drones. Therefore, these are important findings to be considered when using germplasm from endangered populations, in the need for creating biobanks and instrumental insemination technologies.

**Keywords:** Tris, Drones, Cryoprotectants, Motility, Viability, Hypo-osmotic test

## **1. Introduction**

Honey bees play a vital role in maintaining ecosystems through their pollination services (Potts *et al.*, 2010). However, in the last decade, a decrease in these pollinators has been seen worldwide, with their causes attributed to the destruction of their natural habitat (Kline and Joshi, 2020), parasites (Evison *et al.*, 2012), insufficient food supply (Pettis *et al.*, 2016), inadequate management (Requier *et al.*, 2018) and mainly exposure to pesticides (Castilhos *et al.*, 2019). These losses are a major threat to biodiversity. Therefore, various efforts have been made to seek the conservation of these animals, with semen preservation as an effective strategy to protect genetic diversity and contribute to instrumental insemination programs (Collins, 2000; Paillard *et al.*, 2017).

In various mammal species, cryopreservation is used for long-term storage of semen (Aires *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2022). This biotechnology has contributed to the success of propagating numerous species, and it is considered an important tool for animal reproduction, including bees (Collins, 2000; Almeida and Soares, 2002). Access to cryopreserved semen can allow instrumental insemination in bees at any time of the year, especially in regions where drone presence is not abundant. However, it is worth noting that the field of cryopreservation of honey bee semen is quite difficult and has limitations such as semen collection, the volume of semen collected, and the lack of adult drones depending on environmental conditions (Morais *et al.*, 2022).

The study of cryopreservation in European honey bees (*A. mellifera*) has research on diluents, cryoprotectants, and cooling rates. However, in semen from Africanized honey bees, only semen collection and evaluation in different seasons has been reported (Morais *et al.*, 2022).

Among the problems related to semen preservation of bees, decline in quality, such as viability and motility after thawing, is seen during long-term storage (Yániz *et al.*, 2019; Rajamohan *et al.*, 2020).

In this context, the formulation of diluents used in the preservation of honey bee semen has been widely discussed in the scientific community, due to the non-existence of a standard commercial diluent for all honey bee subspecies, either by its hydrogen ion potential (Kaftanoglu and Peng, 1984), the cryoprotectant (Taylor *et al.*, 2009), the use of egg yolk (Dadkhah *et al.*, 2016) and antibiotic (Collins, 2000). Kaftanoglu and Peng (1984) evaluated 11 diluents, containing various concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) and freezing rates, and found that the best post-thaw sperm motility was obtained from the ratio of 40% semen and 60% Kiev solution (containing 10% DMSO). As Taylor *et al.* (2009) evaluated 6 diluent combinations, containing different dilution ratios and cryoprotectants, obtained viability of 68.3% in a ratio of 12:1 (diluent: semen) with DMSO in its formulation.

Therefore, the hypothesis raised in this study is that the diluents tested here will provide distinct results in the cryopreservation process, given their composition in sperm parameters. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of different diluents on the cryopreservation of semen from Africanized honey bees (*A. mellifera*).

## 2. Materials and methods

The experiments were carried out at the Nucleus of Technological Training in Apiculture - NCTA and the Animal Germplasm Conservation Laboratory - LCGA of the Federal Rural University of the Semi-Arid - UFERSA (5°03'37"S e 37°23'50"W, located in Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil).

The chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### *2.1. Animals*

A total of 500 Africanized honey bee drones were used in the experiment. They were captured from 10 different colonies. They were collected at the entrance of the hive using a bee escape in which they were retained. In them, the drones were evaluated for maturity, and were considered mature when they displayed complete eversion of the endophallus tip and the presence of semen were used in the experiment (Collins and Donoghue, 1999).

### *2.2. Diluents*

The detailed composition of the diluents is presented in Table 1. All of the diluents had 10% DMSO added to their formulation as a cryoprotectant. The Tris + EY diluent had 20% egg yolk added to it final volume.

**Table 1.** Composition and characteristics of the semen extenders tested in the collection and sperm parameters of Africanized honey bee (*A. mellifera*).

Name	Component	g/100 mL H <sub>2</sub> O	pH	Authors
Tris	Tris base	7.640	7.5	Modified from
	D+ Glucose	1.052		Taylor <i>et al.</i>
	Citric acid	3.832		(2009).
Tris + EY	Tris base	7.640	7.5	Modified from
	D+ Glucose	1.052		Dadkhah <i>et al.</i>
	Citric acid	3.832		(2016).
	Egg yolk	20% (v/v)		
Collins	D+ Glucose	0.300	7.5	Modified from
	Potassium chloride	0.410		Collins <i>et al.</i>
	Sodium bicarbonate	0.210		(2000).
	Sodium chloride dihydrate	2.430		

### *2.3. Semen collection and dilution*

The semen collection was performed using the standard collection technique (Collins and Donoghue, 1999). In brief, semen was collected using a modified Harbo syringe (Harbo, 1985) developed by Schley for bee insemination. Ten repetitions were carried out, and in each collection, 40 µL of semen was collected, with 10 µL evaluated immediately, which served as the control. The sample was then divided into three aliquots of 10 µL of semen and diluted in Tris, Tris + EY or Collins, using a ratio of 12:1 (diluent: semen).

### *2.4. Freezing and thawing protocol of semen*

For freezing, 250 µL straws (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, France) were used. The straws were packaged after dilution, in which 20 µL of diluted semen was pipetted, followed by an air space in a 1:1 ratio. Then, the straws were sealed with polyvinylpyrrolidone and destined for cryopreservation.

The samples were cooled to 15 °C for 40 minutes in isothermal boxes and stabilized at 5 °C for 10 minutes in a biological incubator (Quimis, Diadema, SP, Brazil). They were then exposed to nitrogen vapor (5 cm) for 10 minutes and finally stored in a cryobiological container at -196 °C. After one week, the straws were thawed individually in a water bath at 37 °C for 30 seconds (Dadkhah *et al.*, 2016). After thawing, the samples were evaluated for the sperm parameters described later.

### *2.5. Sperm parameters evaluated*

#### *2.5.1. Sperm motility*

Sperm motility (%) was evaluated using 5 µL of the fresh and diluted sample of the frozen-thawed semen on a pre-heated glass slide (34 °C) and later analyzed under a light microscope (x10). Motility was classified as a percentage according to Morais *et al.* (2022).

#### *2.5.2. Sperm viability*

Sperm viability (%) was used to evaluate the structural integrity of spermatozoa, for which a fluorescent solution composed of 5 µL of Hoechst 342 (H-342; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 1 µL of propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA) was used. 2 µL aliquots of the sample were incubated for 10 minutes in a 34 °C fluorescent solution and subsequently evaluated under epifluorescence microscopy (400x; Episcopic Fluorescent attachment “EFA” Halogen Lamp Set; Leica, Kista, Sweden). For each sample, 100 spermatozoa were counted; those that presented heads marked totally or partially in red were classified as non-viable, and those that were only marked in blue were classified as viable (Hopkins and Herr, 2010).

#### *2.5.3. Hypo-osmotic swelling test (HOST)*

The HOST was used to evaluate the functional integrity of the sperm membrane, based on curled and swollen tails. By incubating 5 µL of semen in 45 µL of a 0 mOsm/L hypo-osmotic solution (distilled water) for 60 minutes of incubation period at 34 °C (Nur *et al.*, 2012). After the incubation period, an aliquot of the sample was placed on a glass slide, covered with a coverslip, and evaluated under phase contrast microscopy (x 40). The microscope fields were selected randomly, with 100 spermatozoa per slide (Nur *et al.*, 2004).

#### *2.5.4. Sperm morphology*

To evaluate sperm morphology, sperm smears were used by mixing 5 µL of semen with 45 µL of rose Bengal (Cromato, SP, Brazil) which were incubated for 2 h at room temperature.

Then, a 10 µL aliquot was placed on a glass slide and covered with a coverslip. After 24 h, a total of 100 cells were counted using optical microscopy (x100) in random fields. The percentages of normal and altered spermatozoa were verified for each smear. Morphological defects were classified according to the region of the spermatozoon, such as head and tail (Morais *et al.*, 2022).

### *2.6. Statistical analysis*

The data of the sperm parameters were expressed as mean ± standard error. The data were examined for parametric assumptions: normality using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity using the Levene test. The motility, viability and morphology data were transformed into the square root of the arcsine and then submitted to the analyses. Fresh semen was considered the control, and the Dunnett test was applied to compare it with the other treatments. Thus, to evaluate the effect of the sperm parameters on the frozen-thawed semen among the diluents, a one-way ANOVA using an LSD model of the R software, version 3.3.0 (R Core Team, Vienna, Austria) was performed. Finally, the Tukey test for Adjusted Multiple Comparisons was used to check for potential differences among the means. Statistical significance was established at P < 0.05.

## **3. Results**

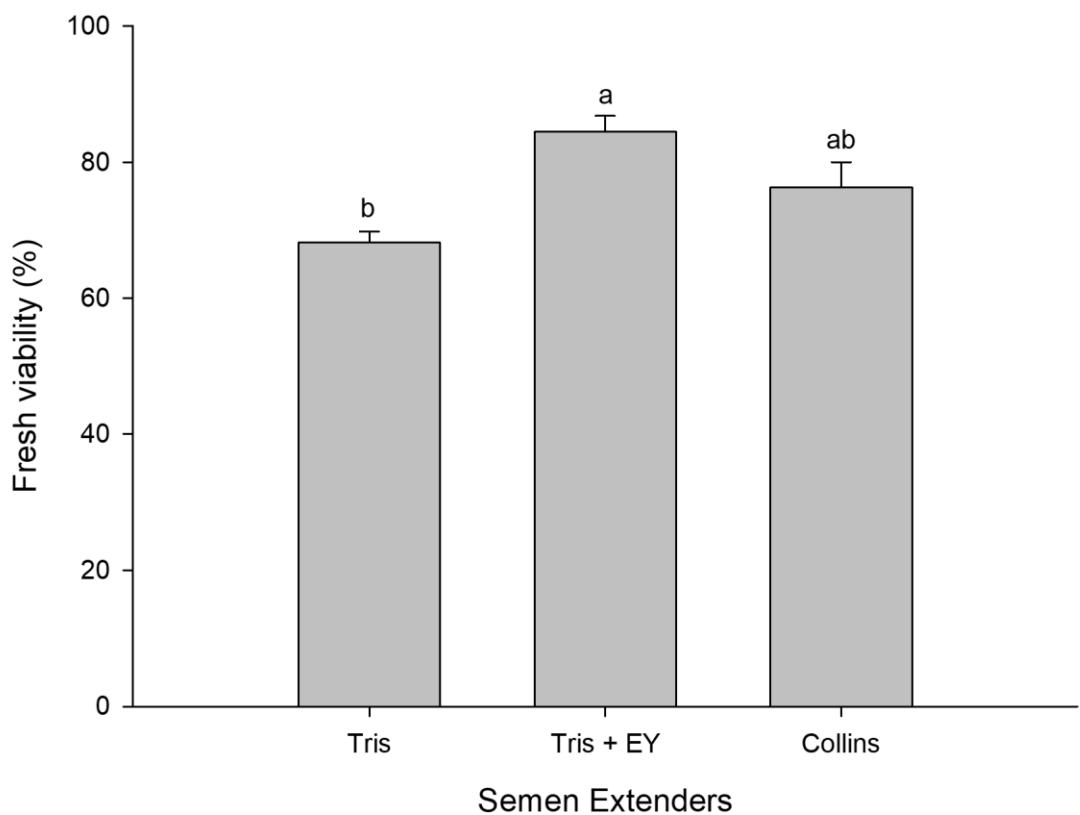
The sperm parameters underwent changes after the cryopreservation process. Sperm motility did not differ between the fresh and the evaluated diluents in the frozen and thawed samples ( $P > 0.05$ ). After dilution, it was observed that the Tris + EY treatment ( $84.5 \pm 2.3\%$ ), presented the best viability, being superior even to the control ( $F = 6.9$ ;  $DF = 3, 36$ ;  $P = 0.0009$ ) (Table 2). Still when compared only the samples diluted Tris + EY ( $84.5 \pm 2.3\%$ ) was superior only Tris ( $68.2 \pm 1.6\%$ ) ( $F = 9.3$ ;  $DF = 2, 27$ ;  $P = 0.0008$ ) (Figure 1). The hypo-osmotic test did not suffer significant difference between the diluents in comparison to the fresh and in the

cryopreservation process ( $P < 0.05$ ). However, for morphology, the samples diluted with Tris ( $69.3 \pm 1.9\%$ ) presented superior results when compared to Tris + EY ( $52.7 \pm 5.0\%$ ) and Collins ( $47.7 \pm 5.9\%$ ) ( $F = 6.1$ ;  $DF = 2, 27$ ;  $P = 0.006$ ) (Figure 2). In the thawed samples, the Tris treatment presented a higher number of normal spermatozoa and a lower number of spermatozoa with tail defects compared to the Collins diluent ( $F = 6.8$ ;  $DF = 2, 27$ ;  $P = 0.004$ ) (Table 3). The other sperm parameters in the post-freezing of the diluted samples were not statistically different from each other ( $P > 0.05$ ).

**Table 2.** Mean values ( $\pm$  SEM) of motility, viability, HOST) normal spermatozoa and abnormal spermatozoa with curled tail, broken tail and double tail in fresh semen and after 5 minutes of exposure to three types of semen extenders.

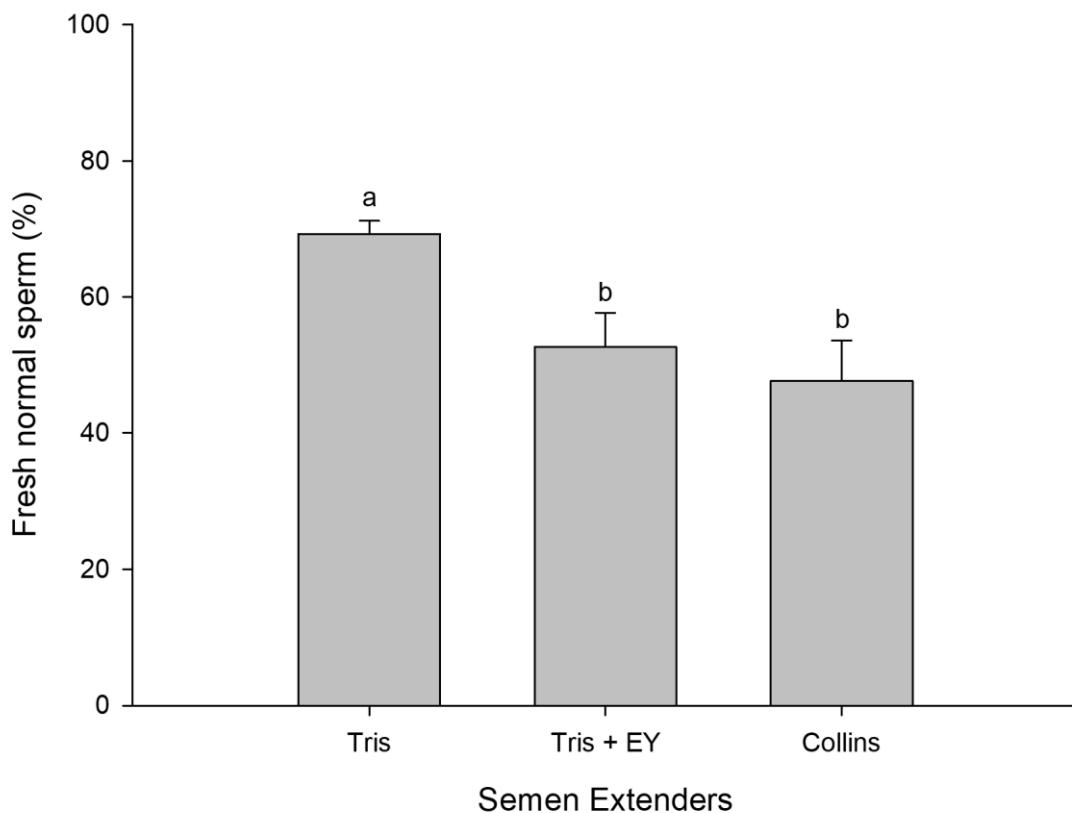
<b>Sperm Parameters</b>	Fresh	<b>Semen extenders</b>		
		Tris	Tris + EY	Collins
Motility	$99.5 \pm 0.5^A$	$99.5 \pm 0.5^A$	$97.5 \pm 2.0^A$	$100.0 \pm 0.0^A$
Viability	$73.9 \pm 2.3^B$	$68.2 \pm 1.6^B$	$84.5 \pm 2.3^A$	$76.3 \pm 3.7^B$
HOST	$73.6 \pm 3.8^A$	$82.5 \pm 1.6^A$	$78.6 \pm 3.9^A$	$72.6 \pm 3.5^A$
Normal sperm	$59.1 \pm 3.7^A$	$69.3 \pm 1.9^A$	$52.7 \pm 5.0^A$	$47.7 \pm 5.9^A$
Curled Tail	$40.0 \pm 3.5^A$	$30.1 \pm 1.9^A$	$46.6 \pm 5.0^A$	$52.0 \pm 6.0^A$
Broken Tail	$0.8 \pm 0.4^A$	$0.5 \pm 0.2^A$	$0.6 \pm 0.3^A$	$0.3 \pm 0.3^A$
Double Tail	$0.1 \pm 0.1^A$	$0.1 \pm 0.1^A$	$0.1 \pm 0.1^A$	$0^A$

<sup>A,B</sup> Means in the same row showing different superscripts point to significant differences between the fresh and cooled groups (Dunnett test;  $P < 0.05$ ).



**Figure 1.** The effect of different semen extenders on fresh sample sperm viability (mean  $\pm$  SEM).

Letters in lowercase indicate a significant difference between diluents (Tukey test;  $P < 0.05$ ).



**Figure 2.** The effect of different semen extenders on fresh sample normal sperm morphology (mean  $\pm$  SEM). Letters in lowercase indicate a significant difference between diluents (Tukey test;  $P < 0.05$ ).

**Tabela 3.** Sperm morphology of post-thawed bees using different semen extenders (mean  $\pm$  SEM).

Morphological parameters	Semen extenders		
	Tris	Tris + EY	Collins
Normal sperm	$49.2 \pm 4.9^a$	$43.8 \pm 3.1^{ab}$	$31.1 \pm 2.5^b$
Curled Tail	$49.9 \pm 4.8^a$	$55.5 \pm 3.2^a$	$67.5 \pm 3.2^b$
Broken Tail	$0.8 \pm 0.3^a$	$0.7 \pm 0.3^a$	$1.4 \pm 0.9^a$
Double Tail	$0.1 \pm 0.1^a$	$0^a$	$0^a$

<sup>a,b</sup> Means in the same row showing different superscripts point to significant differences (Tukey test;  $P < 0.05$ ).

#### **4. Discussion**

This study provides initial information on the quality of semen in Africanized honey bee drones under the use of different diluents during cryopreservation. It is known that factors such as drone size and age, semen quality, diluent type, cryoprotectants, semen-to-diluent ratio, and cooling, freezing, and thawing techniques are essential for successful cryopreservation (Taylor *et al.*, 2009; Dadkhah *et al.*, 2016; Morais *et al.*, 2022).

This study provides initial information on the quality of semen in Africanized honey bee drones under the use of different diluents during cryopreservation. It is known that factors such as drone size and age, semen quality, diluent type, cryoprotectants, semen-to-diluent ratio, and cooling, freezing, and thawing techniques are essential for successful cryopreservation (Taylor *et al.*, 2009; Dadkhah *et al.*, 2016; Morais *et al.*, 2022). Therefore, in this study, the effect of semen diluent containing egg yolk in preserving the quality of semen from Africanized honey bees showed the best sperm viability before the freezing process. This better preservation of sperm viability in honey bees, using egg yolk as a membrane cryoprotectant, possibly occurred due to the protective mechanism of low-density lipoproteins in the egg yolk on the sperm membrane, which provided an appropriate environment in preserving semen quality (Aboagla and Terada, 2004; Bergeron and Manjunath, 2006). As well as the phosphatidylcholine in egg yolk, which has been showing beneficial effects in preserving and functioning of mammal semen and improves progressive microscopic parameters of sperms (Forouzanfar *et al.*, 2010; Pearodwong *et al.*, 2010).

Our results showed that the viable semen in different diluents presented a decrease of 30% in the post-thawing. However, Dadkhah *et al.* (2016), with European honey bees, found viability of 60% in diluent using egg yolk in its composition in the post-thawing. As well as Hopkins and Herr (2010), in their study on the factors of success in freezing bee semen, obtained viability

greater than 90% after 6 days of storage in liquid nitrogen (-196 °C), which contained Tris and egg yolk in its diluent. Collins (2000) reports the importance of a sperm viability greater than 45% in the success of instrumental insemination in bees. This decrease found in the present study may be related to other factors, such as the composition of the diluents and the freezing curve (Taylor *et al.*, 2009) for the semen of Africanized bees, requiring more studies. Given that in mammal semen during the cryopreservation process, there may be a change in the plasma membrane, leaving the sperm more sensitive, in Africanized bees due to being a polyhybrid, perhaps, there is a difference between the composition and resistance of the spermatozoa during cryopreservation (Nishijuma *et al.*, 2015).

Sperm cryopreservation ensures that genetic material is preserved for a long time. However, it is known that this process can be affected by components of the diluents, such as the buffer, osmotic pressure, and the type of cryoprotectant (Taylor *et al.*, 2009; Alcay *et al.*, 2015). These undesired effects decrease the sperm parameters during the freezing-thawing process (Nur *et al.*, 2012; Gül *et al.*, 2017; Alcay *et al.*, 2019). In this study, we can affirm that the freezing-thawing process affects the morphology of the spermatozoa, taking into account an increase of > 50% in sperm abnormalities in the post-thawed, with the Collins diluent being the most affected. Morais *et al.* (2022) in their work with Africanized bees, found a percentage of normal spermatozoa similar to the present study, however, the time of year had a significant effect on morphological abnormalities reaching > 64% the presence of the tail-coiled defect. Being this the most present defect in the present study, reaching > 67%, and previously reported by Tarliyah *et al.* (1999). Studies involving sperm morphology in Africanized bees are still scarce, requiring further investigations on what can cause these changes, especially in the tail of spermatozoa.

The parameters of motility and HOST were not significant between the means in the frozen-thawed, however, both suffered decreases in post-thawed (80% and 50% respectively). As in this study, Morais *et al.* (2022) found a motility of 80% in fresh semen of Africanized bees in the semi-arid. However in post-thawed, Alcay *et al.* (2015) observed a decrease of >30% in motility and >25% in hypo-osmotic in semen of European honey bees, using DMSO as cryoprotector in their diluent. In addition, the responses of the bee spermatozoa to the hypo-osmotic solution were similar to those reported by Nur *et al.* (2012) and Alcay *et al.* (2019). It is seen that submitting bee spermatozoa to hypo-osmolar solutions causes morphological changes, evidenced by the rolling and swelling of the tail (Nur *et al.*, 2012). We can, however, speculate about the effects that various components in the diluents have on various functions of the sperm cells, based on the findings of this and previous studies.

In conclusion, it is highlighted that the diluent containing Tris was the best option for preservation of the sperm in relation to their morphological characteristics. However, there is a need for more studies on the ideal diluent for cryopreservation of semen from Africanized bees, as the parameters of motility and post-thawed viability were below the average of previous studies with non-Africanized honey bees (*A. mellifera*). Thus, this study was the first research that used different diluents, in order to develop a commercial diluent to preserve semen from Africanized bee drones. Therefore, these are important findings to be considered when using germplasm from endangered populations, in the need for creating biobanks and instrumental insemination technologies.

## 5. Author contribution

Lucas da Silva Morais, Andreia Maria da Silva, Luana Grasiele Pereira Bezerra, Ana Flávia Santos da Cunha, and Nailton Oliveira de Sousa Chagas carried out the conceptualization, data collection,

and initial investigations. Genevile Carife Bergamo conducted the data analysis. Alexandre Rodrigues Silva, Débora Andrea Evangelista Façanha, and Katia Peres Gramacho carried out the supervision of the work. Furthermore, all authors equally contributed to the concept of the manuscript at all stages and approved the submitted version.

## **6. Funding**

This study was financed in part by the Coordenacão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Financial Code 001). Dr. Alexandre R. Silva is a receipt of grants from National Council for the Scientific Development (CNPq).

## **7. Declarations**

### **7.1. Data availability**

The data obtained during the current study are presented in the manuscript and available from the corresponding author.

### **7.2. Conflict of interest**

The authors declare no competing interests.

## **8. References**

Aboagla, E. M. E., & Terada, T., 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62 (6), 1160–1172.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.013>

Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E., 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders

for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60 (2), 269–279.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01369-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01369-9)

Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Mulkipinar, E., Gokce, E., Ustuner, B., Sen, H., & Nur, Z., 2019. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, 87, 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.005>

Alcay, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Cakmak, S., & Nur, Z., 2015. Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 21 (1), 31–35. <https://doi.org/10.9775/KVFD.2014.11515>

Almeida, R., & Soares, E. E., A., 2002. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apoidea). *Interciencia*, 27 (6), 317–321.

Auth, C. A., & Hopkins, B. K., 2021. Nitrogen vapor immersion: An accessible alternative for honey bee (*Apis mellifera* L.) semen cryopreservation. *Cryobiology*, 100, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.04.006>

Bergeron, A., & Manjunath, P., 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73 (10), 1338–1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>

Cardoso, R. de C. S., Silva, A. R., Uchoa, D. C., & da Silva, L. D. M., 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59 (3), 743–751. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01151-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01151-2)

Castilhos, D., Dombroski, J. L. D., Bergamo, G. C., Gramacho, K. P., & Gonçalves, L. S., 2019. Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas. *Apidologie*, 50 (5), 657–668. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00676-x>

Collins, A. M., 2000. Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Stored at Above-Freezing Temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 93 (3), 568–571. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.568>

Collins, A. M., & Donoghue, A. M., 1999. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*, 51 (8), 1513–1523. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00094-1)

Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M., & Hopkins, B. K., 2016. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *Journal of Apicultural Research*, 55 (4), 279–283. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243292>

Evison, S. E. F., Roberts, K. E., Laurenson, L., Pietravalle, S., Hui, J., Biesmeijer, J. C., Smith, J. E., Budge, G., & Hughes, W. O. H., 2012. Pervasiveness of Parasites in Pollinators. *PLOS ONE*, 7 (1), e30641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030641>

Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R., & Nasr-Esfahani, M. H., 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 73 (4), 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.005>

Gül, A., Şahinler, N., Onal, A. G., Hopkins, B. K., & Sheppard, W. S., 2017. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, 101, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.020>

Harbo, J. R., 1985. Instrumental insemination of queen bees – part 1. *American Bee Journal*, 125, 197–202.

Hopkins, B. K., & Herr, C., 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*, 41 (5), 548–556. <https://doi.org/10.1051/apido/20010006>

Kaftanoglu, O., & Peng, Y. S., 1984. Preservation of Honeybee Spermatozoa in Liquid Nitrogen. *Journal of Apicultural Research*, 23 (3), 157–163. <https://doi.org/10.1080/00218839.1984.11100625>

Kline, O., & Joshi, N. K., 2020. Mitigating the Effects of Habitat Loss on Solitary Bees in Agricultural Ecosystems. *Agriculture*, 10 (4), 115. <https://doi.org/10.3390/agriculture10040115>

Morais, L. S., Araujo Neto, E. R., Silva, A. M., Marinho, D. E. L., Bezerra, L. G. P., Velarde, J. M. D. S., Silva, A. R., Gramacho, K. P., & Message, D., 2022. Sperm characteristics of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) drones during dry and wet seasons in the Caatinga biome. *Journal of Apicultural Research*, 0 (0), 1–8. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2113328>

Moreira, S. S. J., Santos, C. S., Castelo, T. S., Bezerra, L. G. P., Praxedes, É. C. G., Matos, T. M., Souza-Junior, J. B. F., Feijó, F. M. C., Comizzoli, P., & Silva, A. R., 2022. Investigating the need for antibiotic supplementation to the extender used for semen cryopreservation in collared

peccaries. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1354.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.954921>

Nishijima, K., Kitajima, S., Koshimoto, C., Morimoto, M., Watanabe, T., Fan, J., & Matsuda, Y., 2015. Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. *Theriogenology*, 84 (7), 1172–1175.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.018>

Nur, Z., Dogan, I., Yerlikaya, H., & Soylul, M., 2004. Relationship between the canine sperm membrane integrity and other semen characteristics. *The Indian veterinary journal*, 81, 1119–1121.

Nur, Z., Seven-Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C. I., Sağırkaya, H., & Soylu, M. K., 2012. The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43 (1), 31–38. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1>

Paillard, M., Rousseau, A., Giovenazzo, P., & Bailey, J. L., 2017. Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *Journal of Economic Entomology*, 110 (4), 1412–1418. <https://doi.org/10.1093/jee/tox149>

Pearodwong, P., Suwimonteerabutr, J., Rungruangsak, J., & Tummaruk, P., 2019. Comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of boar semen. *Veterinarska Stanica*, 50 (6), 531-540.

Pettis, J. S., Rice, N., Joselow, K., vanEngelsdorp, D., & Chaimanee, V., 2016. Colony Failure Linked to Low Sperm Viability in Honey Bee (*Apis mellifera*) Queens and an Exploration of

Potential Causative Factors. *PLOS ONE*, 11 (2), e0147220.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147220>

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E., 2010.

Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25 (6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

Rajamohan, A., Danka, R. G., Hopkins, B. K., & Rinehart, J. P., 2020. A non-activating diluent to prolong in vitro viability of *Apis mellifera* spermatozoa: Effects on cryopreservation and on egg fertilization. *Cryobiology*, 92, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.045>

Requier, F., Antúnez, K., Morales, C. L., Aldea Sánchez, P., Castilhos, D., Garrido, P. M., Giacobino, A., Reynaldi, F. J., Rosso Londoño, J. M., Santos, E., & Garibaldi, L. A., 2018. Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *Journal of Apicultural Research*, 57 (5), 657–662. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494919>

Tarliyah, L., Boediono, A., Walujo., & D., Pergerakan., 1999. Spermatozoa leb ah madu *Apis mellifera* L. (hymenoptera: Apidae) pada berbagai suhu penyimpanan dalam media pengencer dengan kadar glukosa yang berbeda. *Media Veteriner*, 6,15–20.

Taylor, M. A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., & Buhr, M. M., 2009. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72 (2), 149–159.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.012>

Yániz, J., Palacín, I., & Santolaria, P., 2019. Effect of chamber characteristics, incubation, and diluent on motility of honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm. *Apidologie*, 50 (4), 472–481.  
<https://doi.org/10.1007/s13592-019-00659-y>

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A presente tese apresentou resultados significativos no que diz respeito a conservação dos espermatozoides de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). Sendo assim, nossos resultados mostraram, pela primeira vez o efeito de diferentes diluidores de sêmen sobre os parâmetros espermáticos em zangões de abelhas africanizadas. No qual foi observado padrões de alterações nas funções espermáticas e alterações morfológicas decorridas do processo de conservação e diluição.

Foi evidenciado que o sêmen de zangões africanizados pode ser conservado a 16 °C por um curto período de tempo e criopreservado em -196 °C por um longo período. No entanto os diluentes Tris e Tris + EY, foram os ideais para conservação da motilidade espermática no sêmen refrigerado e características morfológicas no sêmen criopreservado. Entretanto, esse trabalho serve como base para futuros estudos que possam focar em mecanismos para melhorar os parâmetros espermáticos durante sua conservação.

A criopreservação é imprescindível para a conservação de espermatozoides a longo prazo, no entanto foi observado que a exposição do sêmen a este processo resulta em danos à membrana dos espermatozoides, já que todos os parâmetros espermáticos avaliados apresentaram uma redução após a criopreservação.

É importante ressaltar que o uso de diferentes diluentes e testes específicos para avaliação dos parâmetros espermáticos tem grande importância para que programas de melhoramento em abelhas possam organizar melhor o processo de seleção, e consequentemente otimizar o ganho genético. No qual este último é dependente do intervalo de geração de espécie, ou seja, quanto mais rápida e eficiente for a estratégia de reprodução, maior serão os ganhos por geração.

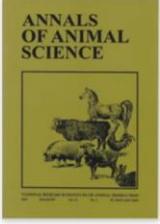
## 8. ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo The effects of four extenders on refrigerated Africanized honey bee sêmen.

08/02/2023 10:38 Annals of Animal Science

 sciendo [About](#) [Publish with us](#) [Subjects ▾](#) [Blog](#) [Team](#) [Journal](#) [Search](#) [En ▾](#)

Journal



**Annals of Animal Science**  
The Journal of National Research Institute of Animal Production

[Download](#) [Share](#) [For Authors](#)

Aims & Scope	Editorial Board	Abstracting & Indexing	Issues	<b>Submit</b>
--------------	-----------------	------------------------	--------	---------------

Please submit your manuscripts to Annals of Animal Science via email to:  
[katarzyna.skupniewicz@iz.edu.pl](mailto:katarzyna.skupniewicz@iz.edu.pl)

APC for Polish authors is 180 PLN per page + 5%, and foreign authors are currently waived of the APC.

**Open Access License**  
This journal provides immediate open access to its content under the [Creative Commons BY 4.0 license](#). Authors who publish with this journal retain all copyrights and agree to the terms of the above-mentioned CC BY 4.0 license.

**Open Access Statement**  
The journal is an Open Access journal that allows a free unlimited access to all its contents without any restrictions upon publication to all users.

[Accessibility Menu](#)



Lucas Morais &lt;morais.lucas11@gmail.com&gt;

**Submission of manuscript to Annals of Animal Science**

1 mensagem

**Lucas Morais** <morais.lucas11@gmail.com>  
Para: katarzyna.skupniewicz@iz.edu.pl

6 de fevereiro de 2023 às 11:16

Dear Prof. Sylwester Świątkiewicz

Editor-in-Chief

Annals of Animal Science

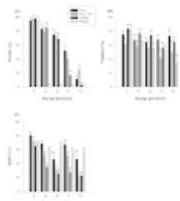
I, Lucas da Silva Morais, am submitting the manuscript entitled "The Effects of Four Extenders on Refrigerated Africanized Honey Bee Semen" for consideration for publication in the Annals of Animal Science Journal. This manuscript represents original work that has not been previously published and is not currently under consideration for publication in any other journal. Enclosed are the files of our manuscript and submission form to be considered for publication.

I am available for any further clarifications.

Thank you very much for your attention.

Sincerely,

---

**3 anexos****Figure 1.PNG**  
145K**Manuscript Submission Form.pdf**  
264K**The effects of four extenders on refrigerated Africanized honey bee semen.docx**  
91K

**ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo Cryopreservation of semen from Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in different extensors.**

02/02/2023 14:45 Gmail - Track the status of your submission to Tropical Animal Health and Production



Lucas Morais <morais.lucas11@gmail.com>

**Track the status of your submission to Tropical Animal Health and Production**

1 mensagem

**Research Square** <info@researchsquare.com>  
Para: Lucas Morais Lucas Da Silva Morais <morais.lucas11@gmail.com>

2 de fevereiro de 2023 às 14:45

Dear Lucas Morais Lucas Da Silva Morais,

Congratulations on your manuscript submission to Tropical Animal Health and Production. In partnership with Springer Nature, Research Square provides a private dashboard, where you can track the status of your manuscript (Cryopreservation of semen from Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in different extensors) that is under consideration at Tropical Animal Health and Production. To access your dashboard and start tracking the progress of your manuscript through peer review, please log in to your account:

[Log in to your account](#)

Although you chose not to share your manuscript as a preprint when you submitted it to the journal, you can still do so through your dashboard. Preprints are given a DOI and posted permanently online on Research Square, allowing for more collaboration opportunities, earlier citations, and community comments. If you are interested in this option, log in via the link above and then select "Post My Preprint".

Please note that the peer review process, including all editorial communications, will continue through the journal where you submitted your manuscript. All queries about the peer review process should be directed to the journal.

Let us know if you have any questions or feedback - we'd love to hear from you.

Sincerely,

The Research Square Team

[Research Square](#)

*A preprint platform that makes research communication faster, fairer, and more useful.*

This email has been sent to [morais.lucas11@gmail.com](mailto:morais.lucas11@gmail.com) by Research Square.

[Privacy policy](#)

[Contact us](#)

Research Square Platform, LLC is a company registered in the United States under Federal Employer Identification Number (FEIN) 82-4431595 with its registered office at [601 West Main Street, Durham, NC, USA](#)

© 2022 Research Square Platform, LLC. All rights reserved.

Title: Cryopreservation of semen from Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in different extensors

RSID: rs-2543951



Lucas Morais &lt;morais.lucas11@gmail.com&gt;

**TROP-D-23-00172 - Acknowledgement of Receipt**

1 mensagem

**Tropical Animal Health and Production** <em@editorialmanager.com>

2 de fevereiro de 2023 às 14:44

Responder a: Tropical Animal Health and Production &lt;mariafe.delaserna@springernature.com&gt;

Para: Lucas Da Silva Morais &lt;morais.lucas11@gmail.com&gt;

Dear Lucas Morais Da Silva Morais:

I am writing to acknowledge the receipt of your manuscript entitled "Cryopreservation of semen from Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in different extenders".

The submission id is: TROP-D-23-00172

Please refer to this number in any future correspondence.

Thank you for submitting this paper to Tropical Animal Health and Production.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript.

Your username is: lucas-morais170

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at

<https://www.editorialmanager.com/trop/>.

Yours sincerely,

Leslie JS Harrison PhD

Tropical Animal Health and Production

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/trop/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=f6943bbbf2&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1756742179280660049&simpl=msg-f%3A1756742...> 1/1