

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD ZOOTECNIA



**“EFECTO DE DOS CRIOPROTECTORES SOBRE LA VIABILIDAD
ESPERMÁTICA DE ZÁNGANOS DE ABEJAS MELÍFERAS
(*Apis mellifera* L.)”**

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA

JOAQUÍN LUIS ERNESTO AMEN CASTILLO

LIMA – PERÚ

2019

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Facultad de Zootecnia

**“EFECTO DE DOS CRIOPROTECTORES SOBRE LA VIABILIDAD
ESPERMÁTICA DE ZÁNGANOS DE ABEJAS MELÍFERAS
(*Apis mellifera* L.)”**

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA

JOAQUÍN LUIS ERNESTO AMEN CASTILLO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ing. Edwin Mellisho Salas

Presidente

Ing. Enrique Alvarado Malca

Patrocinador

Ing. Jorge Vargas Morán

Co Patrocinador

Ing. Próspero Cabrera Villanueva

Miembro

M.V. Segundo Gamarra Carrillo

Miembro

Lima - Perú

Para Santiago Amen Chaypekin Leonsam,

Telésforo Castillo Calle,

Claudia Ruiz Rojas.

Hacedores de su propio destino.

AGRADECIMIENTOS

A Santiago y Leticia, por el apoyo incondicional y el amor infinito a nosotros, sus hijos.

A mis hermanos Pekín, Pamela, José y Pedro.

A Liz Raquel, por sus sabios consejos, amor y compañía.

Al Ing. Enrique Alvarado Malca, por los años de docencia, un gran Zootecnista.

Al Ing. Jorge Vargas Morán, por su apoyo en la elaboración de este trabajo y su amistad valiosa.

Al Ing. Amadeo Caballero Camarena, mi maestro en apicultura, y el mejor apicultor.

Al Ing. Erickson Ruiz Figueroa, por los años de amistad.

Al Ing. Próspero Cabrera Villanueva, jefe del Banco Nacional de Semen de la UNALM.

Al Ing. Hugo Zubiaga Minaya, compañero de trabajo y ejemplo de zootecnista.

A Zoar, Rudi, Dennis, Alvaro y Fernando, porque hicimos de nuestros años de universidad los mejores de nuestras vidas.

A mis viejos amigos Helmer y Gerónimo.

A Rolando Valladolid, Enrique Bazán y Alejandro Cienfuegos, amigos de trabajo que me impulsaron para seguir estudiando.

Al Proyecto Belga VLIR-USO, por el financiamiento recibido y que permitió la ejecución y elaboración de la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
	2.1 Las abejas.....	3
	2.1.1 La abeja reina o madre	3
	2.1.2 Las obreras	4
	2.1.3 Los zánganos	6
	2.2 Determinación del sexo en las abejas	6
	2.3 Anatomía y fisiología reproductiva del zángano	7
	2.3.1 Testículos	7
	2.3.2 Vesículas seminales.....	8
	2.3.3 Glándulas mucosas y órgano copulador.....	10
	2.4 Etología reproductiva del zángano.....	10
	2.5 Alimentación del zángano.....	11
	2.6 Colecta de semen	13
	2.6.1 Eversión del endófalo y eyaculación.....	13
	2.6.2 Eficiencia de colecta de semen.....	14
	2.6.3 Muestras heteroespérmicas	14
	2.7 Características seminales	16
	2.7.1 Volumen	16
	2.7.2 Concentración espermática	16
	2.7.3 Viabilidad espermática.....	17
	2.7.4 Motilidad espermática	18
	2.8 Criopreservación de semen	19
	2.8.1 Agentes crioprotectores.....	20
	2.8.2 Efecto de los crioprotectores sobre la viabilidad de los espermatozoides	21
	2.8.3 Dilutor	21
	2.8.4 Tasa de congelación del semen	22
	2.9 Inseminación instrumental de abejas reinas.....	23
III.	METODOLOGÍA.....	25
	3.1 Localización e instalaciones	25
	3.2 Animales y alimentación.....	25
	3.3 Captura de zánganos	27

3.4 Colecta de semen	27
3.5 Volumen y eficiencia de colecta de semen	31
3.6 Determinación de la concentración espermática.....	33
3.7 Dilución del semen de zánganos.....	34
3.8 Criopreservación del semen.....	36
3.9 Proceso de descongelación	37
3.10 Viabilidad posdescongelamiento	38
3.11 Análisis estadístico.....	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1 Características del semen colectado.....	40
4.1.1 Volumen y eficiencia de colecta de semen	40
4.1.2 Concentración espermática	41
4.1.3 Motilidad del semen diluido precongelado	41
4.2 Características del semen posdescongelado.....	43
4.2.1 Motilidad	43
4.2.2 Viabilidad.....	45
V. CONCLUSIONES.....	48
VI. RECOMENDACIONES	49
VII. BIBLIOGRAFÍA	50
VIII. ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tiempo de desarrollo de las castas en días.....	5
Tabla 2: Composición química del polen y la miel	12
Tabla 3: Relación entre los estados de los zánganos y la cantidad de polen en la colmena	12
Tabla 4: Características biofísicas de los crioprotectores DMSO y glicerina	20
Tabla 5: Fórmula de preparación de la mezcla azucarada y mezcla proteica.....	26
Tabla 6: Fórmula del dilutor	35
Tabla 7: Fórmula del medio buffer de fosfato de potasio.....	35
Tabla 8: Curva de congelación del semen de zánganos	36
Tabla 9: Motilidad del semen diluido precongelado	42
Tabla 10: Características del semen posdescongelado, congelado a – 20°C.....	43
Tabla 11: Características del semen posdescongelado, congelado a – 40°C.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espermateca del aparato reproductor de la abeja reina.....	5
Figura 2: Sección vertical del abdomen de un zángano joven	9
Figura 3: Órgano copulador en eversión. A: hasta el cérvix o cuello, B: un tercio de eversión con eyaculación, C: eversión completa.....	15
Figura 4. Instrumento para inseminar abejas reinas	24
Figura 5. Ubicación de los marcos de cría, marcos de alimento y alimentador, dentro de una colmena.....	26
Figura 6: Captura de zánganos con rejilla excluidora en la entrada de la piquera	28
Figura 7: Estimulación del zángano previo a la colecta	29
Figura 8: Eversión completa del endófalo	29
Figura 9: Colecta de semen, observado a través del estereoscopio	30
Figura 10. Disposición del capilar utilizado para la colecta de semen.....	32
Figura 11: Colecta del semen, tomado directamente del endófalo en erección	32
Figura 12: Medición de la altura del cilindro	33
Figura 13: Cámara de criogenización con las muestras en proceso de criopreservación	37

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Resultado de las colectas de semen	57
ANEXO 2: Concentración espermática.....	58
ANEXO 3: Valores observados de motilidad en las muestras en fresco combinadas con DMSO y glicerina en sus respectivos grados de dilución	58
ANEXO 4: Prueba de normalidad de Kolgomorov – Smirnov, para la motilidad del semen precongelado.....	59
ANEXO 5: Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, para la motilidad del semen precongelado.....	59
ANEXO 6: Gráfico de dispersión de puntos de la motilidad del semen precongelado.....	59
ANEXO 7: Prueba de Friedman para la motilidad precongelamiento de todas las muestras	60
ANEXO 8: Prueba de comparación para la motilidad precongelamiento de todas las muestras.....	60
ANEXO 9: Valores observados de motilidad en las muestras posdescongelamiento, congeladas a – 20°C	60
ANEXO 10: Valores observados de motilidad en las muestras posdescongelamiento, congeladas a – 40°C	61
ANEXO 11. Prueba de normalidad de Shapiro – Wilks modificado, de la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C	61
ANEXO 12: Prueba de homogeneidad de varianza de Levene, de la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C	61
ANEXO 13: Gráfico de dispersión de puntos de la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C.....	62
ANEXO 14: Prueba de Friedman para la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C	62
ANEXO 15: Prueba de normalidad de Shapiro – Wilks modificado, para la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 40°C	62
ANEXO 16: Prueba de homogeneidad de varianza de Levene, de la motilidad posdescongelamiento del semen congelado a – 40°C	63
ANEXO 17. Gráfico de dispersión de puntos de la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 40°C.....	63

ANEXO 18. Prueba de Friedman para la motilidad poscongelamiento del semen, congelado a -40°C	63
ANEXO 19: Valores observados de viabilidad, en porcentaje, de las muestras posdescongelamiento, congeladas a -20°C	64
ANEXO 20: Valores observados de viabilidad, en porcentaje, de las muestras posdescongelamiento, congeladas a -40°C	64
ANEXO 21: Prueba de comprobación de la normalidad de los residuales de Shapiro-Wilks modificado, de la viabilidad del semen posdescongelado, congelado a -20°C	65
ANEXO 22: Prueba de comparación de la homogeneidad de la varianza de la viabilidad del semen posdescongelado, congelado a -20°C	65
ANEXO 23: Cuadro de análisis de varianza de la viabilidad posdescongelamiento, de muestras de semen congeladas a -20°C	65
ANEXO 24: Prueba de comprobación de la normalidad de los residuales de Shapiro-Wilks modificado, de la viabilidad del semen posdescongelado, congelado a -40°C	66
ANEXO 25: Prueba de comparación de la homogeneidad de la varianza de Levene, de la viabilidad del semen posdescongelado, congelado a -40°C	66
ANEXO 26. Análisis de varianza de la viabilidad posdescongelamiento de muestras de semen congeladas a -40°C	66

RESUMEN

La criopreservación del semen de zánganos permitirá utilizar la genética de los mejores individuos en un largo plazo. Para ello, se evaluó el efecto de los crioprotectores Dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerina, sobre la viabilidad espermática de zánganos de abejas melíferas, utilizando dos diferentes grados de dilución del semen en el dilutor (1:9 y 1:12). El semen evaluado fue colectado en 15 capilares de vidrio, proveniente de zánganos capturados en su retorno a la colmena, siendo posteriormente diluido en las proporciones mencionadas para cada crioprotector utilizado, obteniendo finalmente cuatro mezclas por cada capilar. El contenido correspondiente a cinco capilares fue congelado hasta -20°C y el contenido de los otros diez, hasta -40°C , para posteriormente ser criopreservados. Los resultados de motilidad del semen fresco diluido y semen posdescongelado fueron medidos en una escala subjetiva (1 a 5), siendo analizados con una prueba de Friedman; los datos de viabilidad posdescongelamiento se midieron en porcentaje y fueron sometidos a un ANOVA. Se registraron los valores de volumen, eficiencia de colecta de semen y concentración. No se encontró diferencia significativa en los resultados de motilidad y viabilidad del semen posdescongelado, usando tanto el DMSO como la glicerina, en los grados de dilución del semen en el dilutor de 1:9 o 1:12, en ambas temperaturas de congelamiento. Los valores observados de motilidad y viabilidad posdescongelamiento no son considerados óptimos para la temperatura de congelamiento de -20°C , caso contrario para lo observado en la temperatura de congelamiento de -40°C , obteniendo mayor viabilidad observada en cuanto al uso del DMSO en cualquiera de los dos grados de dilución del semen en el dilutor.

Palabras claves: Criopreservación. DMSO. Glicerina. Semen.

ABSTRACT

The cryopreservation of drone semen will allow us to use the genetics of the best individuals in the long term. To this end, the effect of the cryoprotectors Dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerin on the sperm viability of honeybee drones was evaluated, using two different degrees of semen dilution in the diluter (1:9 and 1:12). The evaluated semen was collected in 15 glass capillaries, coming from drones captured on their return to the hive, being subsequently diluted in the proportions mentioned for each cryoprotector used, finally obtaining four mixtures for each capillary. The content corresponding to five capillaries was frozen until - 20°C and the content of the other ten, until - 40°C, to be cryopreserved later. The motility results of diluted fresh semen and post-defrost semen were measured on a subjective scale (1 to 5), being analyzed with a Friedman test; post-defrost viability data were measured in percentage and submitted to ANOVA. Values of volume, semen collection efficiency and concentration were recorded. No significant difference was found in the results of motility and viability of post-thawed semen, using both DMSO and glycerin, in the semen dilution degrees in the 1:9 or 1:12 diluter, at both freezing temperatures. The observed values of motility and post-thaw viability are not considered optimal for the freezing temperature of - 20°C, contrary to what was observed for the freezing temperature of - 40°C, obtaining greater viability observed for the use of DMSO in either of the two degrees of semen dilution in the diluter.

Key words: Cryopreservation. DMSO. Glycerin. Semen.

I. INTRODUCCIÓN

La polinización es un proceso esencial para el correcto funcionamiento de los ecosistemas y la producción de alimentos, reportándose que el 60% de frutas y verduras que hoy consumimos desaparecerán al no ser polinizadas. De 100 especies de cultivos que abastecen el 90% de los alimentos del mundo, las abejas polinizan más del 70% de ellos (Dugo, 2014).

La deforestación, la intensificación de los cultivos agrícolas y la contaminación representan una amenaza para la existencia de la fauna apícola, y si se llegara a eliminar, sería el peor error que atentaría a la seguridad y soberanía alimentaria (Martínez & Merlo, 2014), por ello, es que se buscan medios que maximicen la reproducción de la abeja melífera y aseguren la propagación del mejor material genético.

La técnica de la inseminación instrumental, similar a la inseminación artificial en las grandes especies, se utiliza como herramienta de selección y mejora de las poblaciones de abejas, realizándose con semen fresco, lo que sólo permite el uso inmediato del material, reduciendo la posibilidad de utilizar buena genética.

Por ello la criopreservación, cuyo objetivo es el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a bajas temperaturas, permitiría utilizar el semen de los mejores zánganos en otras colmenas, cuando las condiciones medioambientales reduzcan la disponibilidad de ellos.

La criopreservación implica el uso de un dilutor que no altere las características seminales, y que en éste caso no solamente es utilizado para aumentar el volumen seminal, como ocurre en las grandes especies, sino más bien, nos permite adicionar insumos que puedan controlar la variación del pH y que puedan reducir el impacto oxidativo del estrés térmico, así como reducir el efecto tóxico del crioprotector, ya que es uno de los factores para el desarrollo de protocolos de criopreservación.

Los protocolos de congelación y descongelación pueden ser los que definan el éxito o fracaso del objetivo final de la criopreservación. Por ello también es importante definir el proceso adecuado para su almacenamiento, y que permita a la vez mantener la viabilidad del material luego del descongelamiento.

El presente trabajo de investigación plantea el siguiente objetivo:

- Evaluar el efecto de dos crioprotectores (Dimetilsulfóxido y glicerina) sobre la viabilidad espermática de zánganos de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.), utilizando dos diferentes grados de dilución.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Las abejas

La abeja melífera pertenece a la clase de insectos Himenópteros que incluye miles de especies de abejas, avispas, hormigas y otras especies semejantes. Su característica principal es que posee un par de alas membranosas, siendo el par delantero mucho mayor que el posterior, poseen un aguijón abdominal con el cual muchas especies pueden inyectar un veneno poderoso en el cuerpo de sus enemigos o víctimas, esta arma es más frecuente en abejas y avispas (Mace, 1985)

Un enjambre de abejas se comporta como un organismo social, el cual puede contener un número variado de individuos, desde cinco hasta treinta mil, pero estrictamente hablando, se trata de una sola entidad, a pesar que las partes pueden separarse del conjunto y regresar a él. Todos y cada uno de los miembros de una colonia de abejas dependen de los otros y no pueden existir por separado (Mace, 1985).

En una colmena existen tres castas diferentes: la abeja reina o madre, las obreras y los zánganos.

2.1.1 La abeja reina o madre

Valega (2007), menciona que el ciclo biológico de la abeja reina se inicia con la postura de un huevo que tarda tres días y cinco horas en nacer; así se inicia la etapa larval que dura cinco días y medio, momento en que es operculada la celda para iniciar la etapa de prepupa y pupa que dura siete días y medio hasta nacer, haciendo un total de 16 días (Tabla 1).

Al segundo día de nacida la reina, única dentro de la colmena, comienza a salir en vuelos cortos de reconocimiento y entre el séptimo y décimo día sale a fecundarse en más de un vuelo, por lo que se convierte en el centro y vida de la familia. Si se muere, la colonia

tendrá que crear otra, a partir de un huevo fecundado, o de lo contrario desaparecerá. Su función principal es poner huevos que aseguren la continuidad y supervivencia de la sociedad (Salas, 2000).

La abeja reina mantiene *in situ* las células germinativas masculinas y femeninas, apareándose por únicas vez a edad muy temprana con hasta 12 zánganos, y retiene las células germinativas en un depósito llamado espermateca (Figura 1), motivo por el cual tiene un abdomen muy desarrollado. El apareamiento será el único motivo por el que salga de la colmena, con la excepción de cuando se produzca una enjambrazón de la colonia (MINAG, 2010). Los huevos, que posteriormente libera pueden ser:

- Diploides heterocigotas (óvulos fecundados), de los que nacen hembras fértiles (princesas) e infértiles (obreras).
- Haploides (óvulos no fecundados), de los que nacen machos normales o zánganos.

Otras funciones de la reina es impedir la formación de otras reinas y atrofiar la capacidad sexual de las obreras, esto mediante la secreción de una feromona que se extiende por toda la colmena (MINAG, 2010)

2.1.2 Las obreras

El ciclo biológico de las obreras comienza con la postura del huevo que tarda 3 días y 5 horas en nacer y pasar así al estado larval o de “cría abierta”. Este periodo dura 6 días hasta que es operculada la celda y pasa al tercer estadio de prepupa y pupa; este estadio dura 12 días, durante el cual va tomando forma la abeja hasta nacer; el ciclo biológico total desde que es depositado el huevo hasta que nace la abeja obrera dura 21 días (Tabla 1) (Valega, 2007).

Las obreras son hembras que constituyen la casi totalidad de la población y cumplen diversas funciones en la colmena, pudiéndose encontrar hasta más de ochenta mil en una colonia en plena temporada. Son el elemento productor y directivo de la colmena. Se llaman así porque son las que realizan el trabajo: producen miel y cera, fabrican panales, colectan polen, limpian la colmena y mantienen el orden. Son infecundas y también son las más pequeñas de la colmena. (Salas, 2000)

En condiciones normales, la colmena presenta abejas de todas las edades. La edad de la abeja determina, en general, su actividad diaria. Sin embargo, cuando las condiciones se vuelven anormales, la edad deja de ser un criterio que norma los deberes (MINAG, 2010).

Tabla 1: Tiempo de desarrollo de las castas en días

	Reina	Obrera	Zángano
Huevo	0 – 3	0 – 3	0 – 3
Larva	4 – 8	4 – 8	4 – 9
Operculado	9	9	10
Ninfa	10 – 15	10 – 20	11 – 23
Nacimiento	16	21	24

FUENTE: Elaboración propia

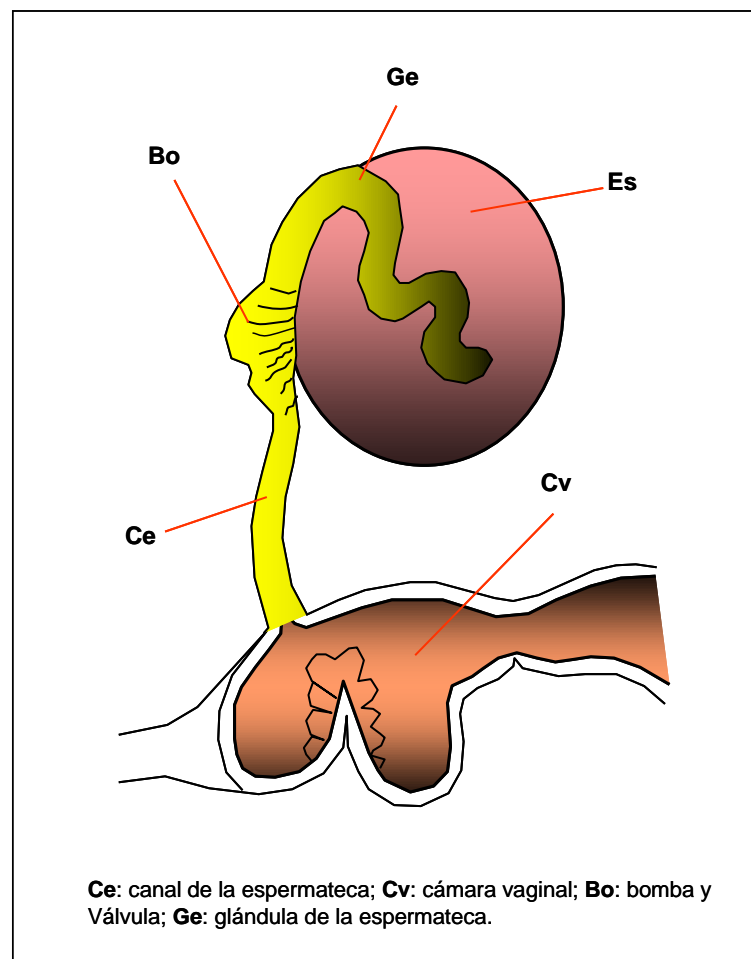


Figura 1. Espermateca del aparato reproductor de la abeja reina (Guth, 1990)

2.1.3 Los zánganos

Son obtenidos a partir de huevos no fecundados (reproducción partenogénica) y depositados, generalmente, en celdas más grandes que el de las obreras, reconocibles por su cuerpo voluminoso (15 mm) y tosco, abdomen rectangular, grandes ojos y vuelo ruidoso (Ravazzi, 1995; Von Frisch, 1999). Schlüns *et al.* (2003) observaron que los zánganos producidos en las colmenas varían de tamaño dependiendo de la celda en la cual fue depositado el huevo, así huevos de zánganos depositados en celdas para zánganos eran más grandes que aquellos obtenidos de huevos depositados en celdas para obreras.

Valega (2007) detalla el desarrollo del zángano; desde el óvulo, el cual tiene un periodo de tres días hasta nacer y pasar a la etapa larval que dura 7 días; luego la celda es operculada y pasa al periodo de pre-pupa y pupa para nacer a los 14 días; por lo que el ciclo biológico total del zángano, desde que es depositado el óvulo hasta que nace dura 24 días (Tabla 1).

Von Frisch (1999), Ritter (2001) y Jean-Prost & Médori (2007) describen el ciclo de vida del zángano desde que nace hasta el momento de su primer vuelo entre los nueve a catorce días de edad, durante los meses de primavera y verano, como la exclusiva misión de producir semen y fecundar a la reina; además de colaborar en la ventilación de la colmena y la estimulación de las obreras a trabajar; luego de ello son inútiles y serán eliminados o expulsados violentamente de la colmena.

En panales naturales, se calcula que hay aproximadamente ocho celdas de obreras por cada dos de zánganos, es decir, que la población total de éstos puede representar hasta el 20% en una colonia desarrollada en condiciones normales (SADA, 1981).

2.2 Determinación del sexo en las abejas

Borst (2015) señala que la genética en las abejas es que la abeja hembra, reina u obrera, tiene 16 cromosomas en pares, uno heredado de cada padre, el zángano obtiene solo un juego proveniente de la madre y ya que los que se encuentran normalmente en la colmena nacen de huevos no fertilizados, la mitad de ellos tendrá un juego de alelos y la otra mitad otro juego, de esta forma todos los zánganos haploides son viables. Sin embargo, en casos

de consanguinidad, se logra obtener zánganos diploides, los mismos que, al cabo de unos días luego de la ovoposición, serán devorados por las obreras (Mackensen, 1992).

De esta manera es que los zánganos son quienes comunican o transmiten el carácter hereditario de la familia o colonia, motivo por el cual es importante efectuar una adecuada selección para obtener colonias de comportamiento defensivo deseado y comportamiento higiénico; así como en el desempeño de tareas de recolección de agua, néctar y polen (Persano, 1980; Nates, 2011).

Cuando una colmena se queda sin reina, y todas las crías han nacido, sucede a menudo que algunas obreras empiezan a poner con la vana esperanza de perpetuar la colonia. Las crías obtenidas son en su totalidad zánganos, los mismos que son de menor tamaño y con menor producción de semen, a pesar de ello, estos zánganos son fértiles (Kelley, 1986).

2.3 Anatomía y fisiología reproductiva del zángano

A diferencia de otros insectos que tienen un pene exterior (ectófalo) duro y rígido, en el zángano este órgano está muy atrofiado; tiene solamente dos pares de placas quitinosas finas pegadas a la pared del cuerpo, que forman en la parte ventral el extremo del abdomen, estas placas no tienen ninguna relación con la transmisión del esperma (Weiss, 1986).

Ruttner (1976), Benedetti & Pieralli (1990) y Barrera & Romero (2014) describen la anatomía reproductiva del zángano constituida por dos testículos, dos conductos deferentes, dos vesículas seminales, dos glándulas mucosas, un canal eyaculador y un órgano de copulación o endófalo (Figura 2). Además, para Persano (1980) la proporción órgano reproductor – tamaño del cuerpo, es uno de los más grandes de todos los animales existentes en la tierra.

2.3.1 Testículos

Para Ordetx & Espina (1966), Mace (1985), Garau (1990) y Barrera & Romero (2014), son órganos que alcanzan su tamaño máximo durante la etapa de ninfa o pupa. Están

compuestos por numerosos folículos, en los cuales se originan y maduran los espermatozoides, los testículos se sitúan en los lados del abdomen, donde se conectan por los vasos deferentes con las vesículas seminales.

En el estadio de pupa se producen cerca de 10 millones de espermatozoides, los cuales llenan los túbulos de sus grandes testículos, estos migran luego a las vesículas seminales dejándolos vacíos; conforme las pupas avanzan en edad los testículos se atrofian hasta quedar reducidos a un muñón de tejido grisáceo (Garau, 1990; Barrera & Romero, 2014).

Metz & Tarpy (2019) observaron que ningún zángano tenía semen presente en sus vesículas seminales en el primer día de vida. Este porcentaje aumentó a aproximadamente el 50% en el tercer día, con la transferencia total de espermatozoides a las vesículas seminales, iniciada en todos los zánganos alrededor del día seis.

2.3.2 Vesículas seminales

Ordetx & Espina (1966) y Barrera & Romero (2014) las describen con forma de saco largo y amplio, y que sirven para almacenar espermatozoides procedentes de los testículos hasta el momento de la cópula, para esta función es necesario que el zángano tenga más de 12 días de edad.

Tal como se observa en la Figura 2, las vesículas se unen en un tubo: el canal o conducto eyaculador, por el cual los espermatozoides atraviesan en la época de apareamiento, y dentro del mismo dos glándulas mucosas envían una secreción que se mezcla con los espermatozoides y forman una masa, el espermatóforo, que ocupa una expansión del conducto llamado glande (Ordetx & Espina, 1966; Mace, 1985; Garau, 1990)

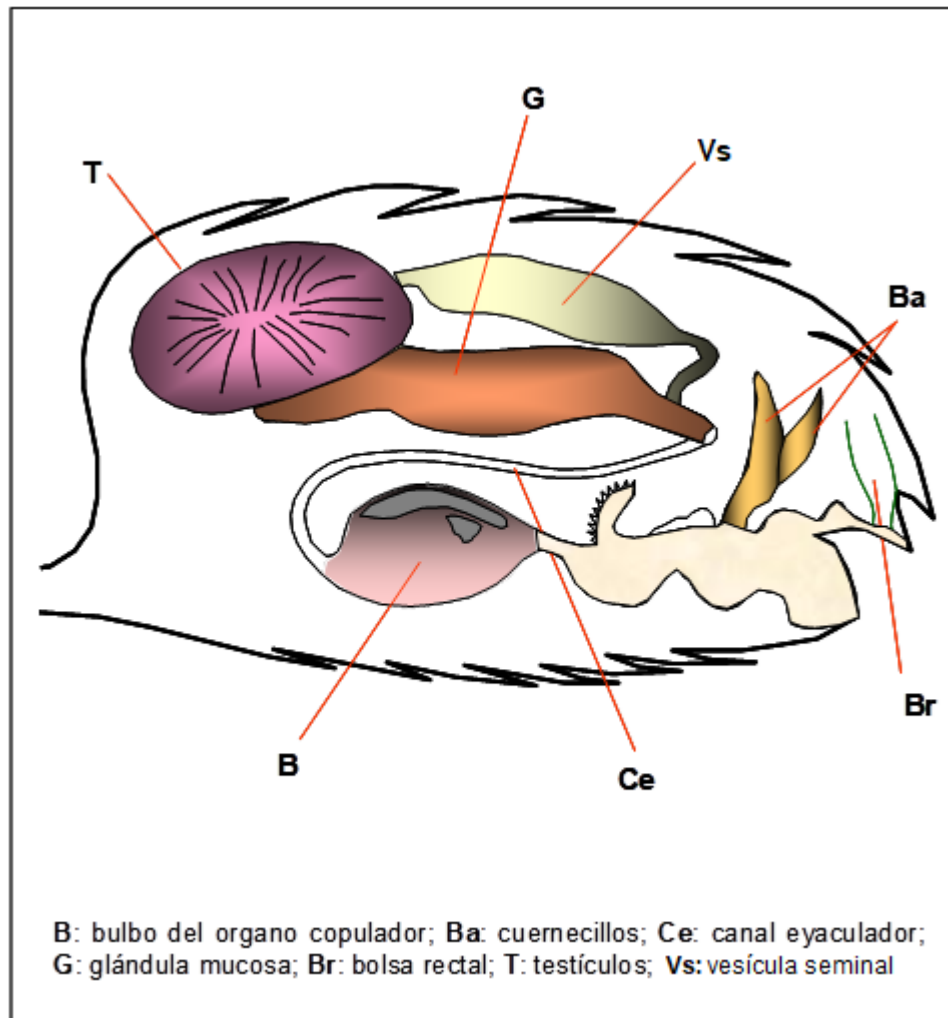


Figura 2: Sección vertical del abdomen de un zángano joven (Guth, 1990)

2.3.3 Glándulas mucosas y órgano copulador

Para Ordetx & Espina (1966) y Barrera & Romero (2014), las glándulas mucosas son dos grandes órganos accesorios, que se unen por su base a la salida de las vesículas seminales, y segregan una sustancia mucosa, que en contacto con el aire o el agua se solidifica (espermátforo), y que en el momento de la eyaculación empujan hacia el exterior al semen por el conducto eyaculador dentro de la vagina de la reina.

El órgano copulador es denominado endófalo, el cual es una estructura tubular larga invertida, con varios apéndices y zonas con vellosidades, se halla dentro de la cavidad abdominal, siendo su longitud similar a la del abdomen del zángano, y está formada por placas quitinosas, que durante la cópula requiere de una fuerte contracción de las paredes del abdomen para producir la eversión del pene (Moritz, 1984; Root, 1985; Barrera & Romero, 2014)

Después del apareamiento se queda dentro de los órganos genitales de la hembra, a la que se sujeta mediante los neumofisos o cuernos, por lo que el macho, mutilado, acaba muriendo (Benedetti & Pieralli, 1990; Garau, 1990).

2.4 Etología reproductiva del zángano

La vida del zángano consiste particularmente en la búsqueda de hembras con las que acoplarse, alimentándose con cierta frecuencia para continuar en su incesante búsqueda de hembras receptivas. No está definida otra función específica dentro de la colmena, sin embargo, los genes que portan son esenciales para la formación y mantenimiento de las poblaciones de abejas (Padilla *et al.*, 2007).

La reproducción natural ocurre en zonas denominadas áreas de congregación de zánganos, visitadas por zánganos y reinas integrantes de varias colonias, y donde se promueve la selección natural de los más aptos. Aquí, generalmente, los zánganos se reúnen de forma independiente a la presencia de reinas (Padilla *et al.*, 2007; Galindo *et al.*, 2017).

Las reinas de las abejas melíferas presentan un elevado grado de poliandria, apareándose durante el vuelo (Cobey *et al.*, 2013), con lo cual se crean numerosas líneas paternas dentro

de colonias que son genéticamente distintas, y traduciéndose en buen estado de salud de la misma, mejorando su productividad y aptitud (Mattila & Seeley, 2007), con lo que se podría decir que, el atributo más importante de la calidad de una reina es cuán bien se apareó (Tarpy *et al.*, 2013).

En las abejas, la poliandria muestra que una reina es fertilizada hasta por 12 zánganos en las áreas de congregación de zánganos durante el vuelo nupcial (Cobey *et al.*, 2013). Aunque un zángano cuenta con la suficiente cantidad de esperma como para llenar la espermateca de una reina, se sabe que una gran parte del esperma es expelido al exterior después de la cópula (Padilla *et al.*, 2007). A pesar del apetito sexual del zángano, en el interior de la colmena no existe atracción entre éstos y la reina (Persano, 1980).

2.5 Alimentación del zángano

Robles & Salvachúa (1999) destacan que el alimento suministrado a las larvas de zánganos es más abundante que el que proporcionan a las larvas de obreras. Ellos reciben una dieta basada en polen, rica en proteínas (Tabla 2), necesaria para su desarrollo. Así, la presencia de zánganos en las colmenas viene condicionada por la cantidad de polen que ingrese a la misma (Tabla 3). Para Dávila (1984), una colmena puede llegar a consumir hasta 27 kilogramos de polen en promedio por año.

Una colonia de abejas adultas es capaz de mantenerse bastante tiempo sin polen, o alimentándose sólo de miel, cuya composición se detalla en la Tabla 2, pero no se hallará en condiciones de criar larvas, ya sean de zánganos u obreras, porque para ello es indispensable el polen o un sustituto (Socorro & Espinar, 1998). Kepeña & Kopernicky (1973) suponen que ante la insuficiente presencia de polen en la colmena, los zánganos que logran la etapa adulta son capaces de conseguirlo por sus propios medios para lograr su madurez sexual.

Es importante mencionar la influencia de la contaminación, como lo señalan Ostiguy *et al.*, (2019), quienes detectaron con más frecuencia insecticidas que fungicidas o herbicidas en productos derivados de las flores, de ello, un tercio de los pesticidas detectados se encontraron solo en el polen, representando una gran amenaza para la población apícola.

Pettis *et al.*, (2016) recomiendan reducir la exposición a pesticidas a los zánganos y reinas, no sólo por la toxicidad que podría ocasionar, sino también porque afecta de forma considerable la capacidad reproductiva de ellos, viéndose los efectos en la calidad del semen y la longevidad de la reina.

Tabla 2: Composición química del polen y la miel

Componente	Polen	Miel
Agua	5% - 6% ^b	17.2% ^c
Proteínas	25% ^b	0.26% ^a
Azúcares	40% ^b	79.59% ^c
Cenizas	5% ^b	0.169% ^c
Ácidos		0.43% ^e
pH		3.91 ^c
Lípidos	4.5% ^b	
Vitaminas	0.015% ^b	
Otros componentes		2.21% ^d

FUENTE: Adaptado de ^a Piana *et al.* (1989), ^b Philippe (1990), ^c White (1992), ^d Robles & Salvachúa (1999) y ^e Sáinz & Gómez (2000)

Tabla 3: Relación entre los estados de los zánganos y la cantidad de polen en la colmena

Estado de los zánganos identificados en la colonia	Conclusión acerca del polen en la colonia
Adultos – pupas – larvas – huevos	Abundancia de polen.
Adultos – pupas – huevos	Disminución de las reservas de polen durante las 48 últimas horas.
Adultos	Escasez de polen, durante una semana, como mínimo.
Falta de zánganos	Grave escasez de polen, durante dos semanas a un mes.

FUENTE: Taber (1977)

2.6 Colecta de semen

Para la obtención de semen viable, es necesario contar con zánganos maduros sexualmente, ello se da en un periodo de 13 a 15 días luego de la eclosión de los mismos (Cobey *et al.*, 2013; Stefan, 2013). Por ello, Cobey *et al.* (2013) recomiendan capturar el día anterior o el día de la inseminación aquellos zánganos que regresan de vuelos de apareamiento fallidos o recogerlos de los panales ubicados en los extremos dentro de la colonia.

Büchler *et al.* (2013) y Rousseau *et al.* (2015) sugieren la acumulación de colonias de zánganos antes del período de apareamiento en colmenas estándar, tomando especial cuidado para proporcionar un suministro de miel y polen continuamente, así como de jóvenes abejas nodrizas para su cuidado. Además de controles regulares del estado de salud y el desarrollo general, para lograr un alto nivel de control de calidad. Sin embargo, mantener zánganos por más de una semana dentro de la colmena afecta a la sobrevivencia y la calidad de los mismos, a pesar de contar con la cantidad suficiente de alimento dentro de la colmena (Hassan, 1997).

2.6.1 Eversión del endófalo y eyaculación

La Figura 3 muestra como es la aparición de los cuernos, que generalmente son de color amarillo – naranja cuando el zángano ya es maduro. Caballero (2002), Cobey *et al.* (2013) y Rousseau *et al.* (2015) detallan que ello se logra sujetando el tórax entre el pulgar y el índice, con el abdomen hacia arriba y presionándolo suavemente, mientras con la otra mano se sostiene la cabeza, logrando así la eversión parcial del endófalo.

Posterior a la aparición de los cuernos, se continúa presionando el abdomen hasta la eversión total del endófalo, lo que produce la liberación del semen. Para Cobey *et al.* (2013), Büchler *et al.* (2013) y Rousseau *et al.* (2015), el semen se aprecia de un color tostado cremoso y mármol, con una capa subyacente de moco blanco. Así, para Stefan (2013), un mayor contenido de espermatozoides se refleja en un color y una viscosidad más intensos.

En una eyaculación normal, en primer lugar aparece el esperma puro y después, completamente aparte, el mucus. El esperma y el mucus llegan al bulbo por el conducto eyaculador que es largo y estrecho, como se aprecia en la Figura 2. Esto se puede observar

a través de la pared transparente del vestíbulo y del bulbo, cuando el pene del zángano ha salido hasta la mitad (Durval, 1981).

Si el bulbo del zángano está vacío indica que no está maduro o está mal cuidado, es decir que no se puede obtener semen de él. En el interior de este bulbo hay un tejido glandular que produce una secreción que una vez mezclada con el semen incrementa la motilidad de los espermatozoides (Durval, 1981; Alins, 1986).

2.6.2 Eficiencia de colecta de semen

Rousseau *et al.* (2015) obtuvieron que el 55.3% de zánganos capturados produjo una cantidad apreciable de semen para ser recolectado, dependiendo sobre todo de la edad del zángano, demostrando que, zánganos de menos de 14 días de vida producían menos semen que zánganos de 35 días.

Rhodes (2008) logró obtener eyaculados en el 59% de zánganos capturados que tenían 14 días de edad y en el 76% de zánganos capturados con 35 días de edad, además observó que la temporada de captura influye en la eficiencia de colecta de semen.

Para Stefan (2013), el procedimiento de colecta y su nivel de dificultad varía entre individuos, siendo la cantidad de semen colectada muy diferente, especialmente en zánganos originados a partir de líneas puras. Observó que algunos no tenían espermatozoides, en otros la eyaculación se produjo sin eversión completa cuando se inicia el proceso de recolección artificial, o la eversión con la eyaculación es tan violenta que el esperma se perdió.

2.6.3 Muestras heteroespérmicas

La heteroespérmia es una estrategia en la reproducción natural de las abejas reinas. Es así que, en la inseminación instrumental el semen es recogido directamente del endófalo de varios zánganos en una jeringa y almacenado en tubos capilares. Por ello, Cobey *et al.* (2013) recomiendan tener un buen suministro de zánganos maduros que garantice la colecta suficiente de semen.

En aves, las muestras heteroespérmicas obtienen mejores resultados posdescongelamiento que en muestras homoespérmicas (Herrera, 2005). De igual modo, la utilización de la inseminación artificial con dosis heteroespérmicas en cerdos es benéfica, pues oculta las deficiencias individuales en el desempeño reproductivo de cada macho (Borges, 2012).

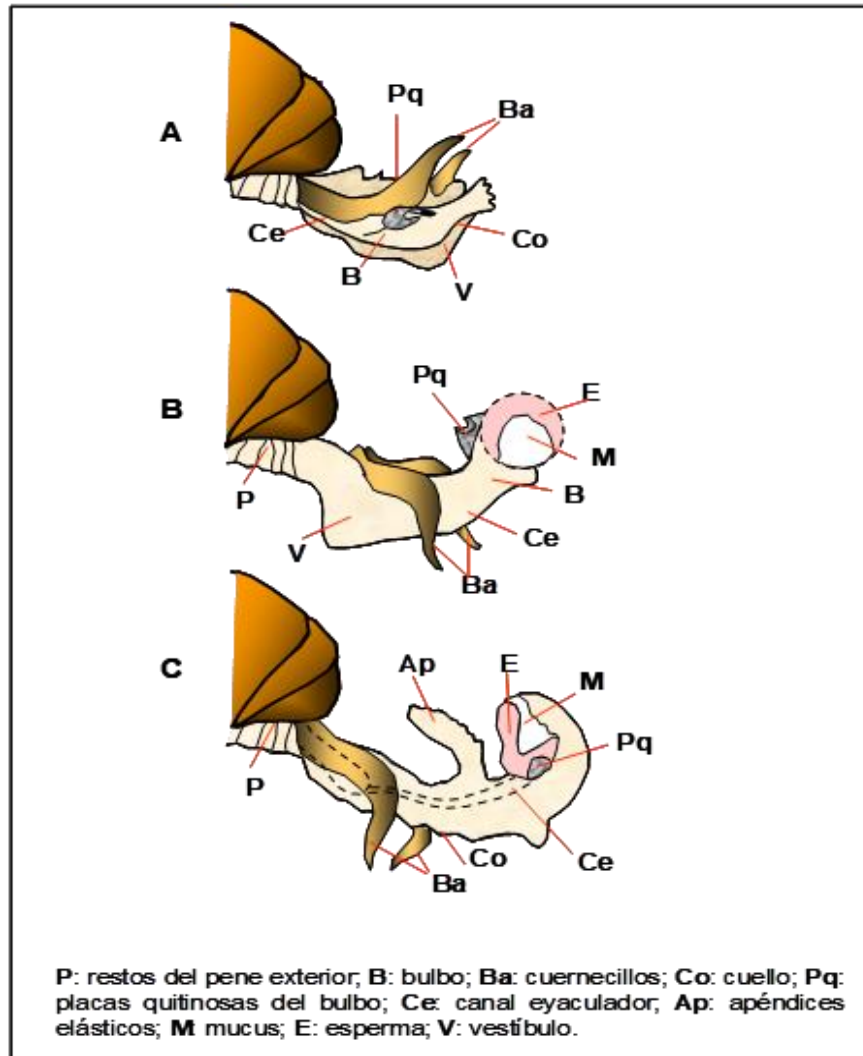


Figura 3: Órgano copulador en eversión. A: hasta el cervix o cuello, B: un tercio de eversión con eyaculación, C: eversión completa (Guth, 1990)

2.7 Características seminales

El semen está compuesto por los espermatozoides y el líquido de la vesícula seminal, en proporción de 1:1 hasta de 2:1, lo cual le da las características de intensidad de color y viscosidad (Ruttner *et al.*, 1976). El espermatozoide del zángano tiene un pH de 6,8 a 7 y se mezcla con cualquier medio acuoso. Por desecación, los espermatozoides mueren en pocos minutos, así como tampoco resisten el enfriamiento (Moritz, 1991).

2.7.1 Volumen

Gençer *et al.* (2011) y Rousseau (2015) obtuvieron un volumen de eyaculado por zánganos de $1.01 \pm 0.03 \mu\text{l}$ y $1.01 \pm 0.016 \mu\text{l}$ respectivamente, siendo influenciado por el efecto combinado de la edad de los zánganos y la fecha de reproducción. Rhodes (2008) obtuvo en promedio $1.09 \mu\text{l}$ de semen por zángano, observando los efectos de la estación y la edad, además que el volumen de semen fue mayor en primavera que en otoño o verano.

2.7.2 Concentración espermática

Los resultados para éste parámetro son muy variados, así para Taylor (2009) y Gençer (2011), la concentración espermática en semen de zánganos es de $8.80 \pm 0.98 \times 10^6$ y $7.32 \pm 0.11 \times 10^6$ de espermatozoides totales por eyaculado, respectivamente.

No así para los resultados obtenidos por Rhodes (2008) quien obtuvo un promedio de 3.63×10^6 de espermatozoides por zángano; Rousseau *et al.* (2015), quienes obtuvieron $1.80 \pm 1.65 \times 10^6$ en promedio por eyaculado; y Metz & Tarpy, (2019) con una media de $4.93 \pm 0.15 \times 10^6$ de espermatozoides.

Schlüns *et al.* (2003) hallaron que el conteo de espermatozoides en las vesículas seminales de los zánganos maduros depende del tamaño del zángano, así los zánganos más pequeños, que fueron obtenidos de huevos depositados en celdas de obreras, tenían un promedio de $7.45 \pm 0.461 \times 10^6$, mientras que los zánganos de mayor tamaño, aquellos provenientes de huevos depositados en celdas de zánganos, producían una media de $11.95 \pm 1.007 \times 10^6$.

2.7.3 Viabilidad espermática

Para la evaluación de la viabilidad, Collins & Donoghue (1999), demostraron que las combinaciones de SYBR-14 con yoduro de propidio eran más efectivas para diferenciar células con diferentes integridades de membrana. Por ello, utilizando éste método, Rousseau *et al.* (2015), obtuvieron $64.2 \pm 1.07\%$ para semen fresco diluido.

Taylor *et al.* (2009) y Hopkins *et al.* (2016), utilizando el mismo método, obtuvieron en semen fresco diluido valores entre 60% a 80%. Burley *et al.* (2008) determinaron que la viabilidad del semen fresco sin diluir es de 90.7%, utilizando para ello una solución diferente mezclada con el yoduro de propidio.

Gençer *et al.* (2014), observaron que la viabilidad de los espermatozoides disminuye entre el primer y segundo minuto de exposición al aire libre, así como cuando éste es recogido en la punta del capilar y durante todo el proceso de colecta. Concluyó que un efecto posible de la pérdida de la viabilidad de los espermatozoides puede ser debido a la presión ejercida durante la eyaculación, ya sea por colecta o monta natural.

Para semen posdescongelado Taylor *et al.* (2009), utilizando Dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, reportaron $49.32 \pm 2.28\%$, y utilizando glicerol $45.47 \pm 1.69\%$. Para Alçay *et al.* (2015) el semen posdescongelado usando glicerol presentó valores de viabilidad de $51.8 \pm 3.6\%$, mientras que usando DMSO fue de $69.5 \pm 3.2\%$. Asimismo, Paillard *et al.* (2017) reportaron que al cabo de 330 días de ser congelado el semen, la viabilidad espermática fue de $76 \pm 5\%$ utilizando DMSO.

Kachura *et al.* (1997) hallaron que entre un periodo de seis a doce meses de congelación, la cantidad de espermatozoides viables se mantiene entre un 60 – 80%, y que la disminución de la vitalidad se debe al incremento de las malformaciones morfológicas, sobre todo de la cola.

Taylor *et al.* (2009) y Alçay *et al.* (2015), demostraron que el principal efecto del uso del crioprotector es en la viabilidad espermática posdescongelamiento. Para Harbo (1979), las reinas inseminadas con semen descongelado no serían lo suficientemente fuertes como para dirigir una colmena productora de miel, sino que más bien, para producir una progenie de reinas. Así, Pettis *et al.* (2016) reportan que la baja viabilidad de los espermatozoides está relacionada con el rendimiento de la colonia.

2.7.4 Motilidad espermática

La valoración de la motilidad implica la estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides y la calidad de la motilidad. Así, la evaluación de la motilidad de los espermatozoides se realiza con semen puro y diluido, y debido a que este parámetro es en extremo susceptible a las condiciones ambientales, es necesario proteger el semen de agentes o situaciones perjudiciales antes del análisis (Hafez *et al.*, 2011).

Grey (1931) y Fox (1956), citados por Verma (1976), indican que los espermatozoides de la abeja mellifera pueden conservarse por mucho tiempo posiblemente porque no pueden moverse, debido a las aglomeraciones densas tanto en el semen como en la espermateca, ya que cada célula ejerce un efecto restrictivo sobre la actividad de las demás células. Manifiestan una actividad metabólica reducida, constituyendo un dispositivo que ahorra energía. Esto permite a los espermatozoides una viabilidad y capacidad de fecundar durante buen tiempo tanto en la espermateca así como el almacenamiento *in vitro*.

Taylor *et al.* (2009), Alçay *et al.* (2015) y Dadkhah *et al.* (2016) asignaron una escala de 0 a 5 para la motilidad de semen fresco, siendo 0 una motilidad menor de 20% y 5 para la motilidad que supere el 95%, considerando como ideal aquellas mayores de 3.

Rhodes (2008), asignando la misma escala, obtuvo para semen fresco y diluido en tampón Tris, una motilidad promedio de 3.4. Taylor *et al.* (2009), para el semen diluido en una solución que contenía citrato de sodio y catalasa, en proporciones de semen:dilutor de 1:9 y 1:12, obtuvieron parámetros de motilidad superiores a 3.0. Alçay *et al.* (2015), utilizando el mismo dilutor pero mezclándolo con los crioprotectores glicerol y DMSO, obtuvieron valores de 3.0 ± 0.3 y 3.8 ± 0.2 , respectivamente para el semen diluido fresco. Dadkhah *et al.* (2016) utilizaron como dilutores una solución tampón mezclada con yema de huevo o lecitina de soya, y obtuvieron motilidad superior a 4.0 para el semen diluido fresco.

Hopkins (2012) asignó un puntaje de motilidad subjetiva durante sus evaluaciones, otorgando una puntuación de “bueno” a las muestras de semen posdescongelamiento, si la motilidad era notablemente menor que la del semen fresco, mientras que si los espermatozoides se movían solo levemente se obtenía un puntaje de “pobre”.

Así, para Dadkhah *et al.* (2016) la motilidad de los espermatozoides posdescongelados fue de 3.6 ± 0.24 como máximo valor. Alçay *et al.* (2015) obtuvieron para el semen

posdescongelado con glicerol una motilidad de 2.0 ± 0.2 , mientras que la motilidad para el semen posdescongelado con DMSO fue de 3.1 ± 0.2 .

2.8 Criopreservación de semen

El objetivo principal de la criopreservación es el de mantener la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas y posdescongelamiento; la estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada (Ávila *et al.*, 2006).

Para Hopkins *et al.* (2016) y Gul *et al.* (2017), la criopreservación es un método avanzado, que permite almacenar el semen y utilizarlo en una fecha en el que no está disponible, lo que facilita la transferencia de genes seleccionados para la reproducción y la conservación. Así mismo, se considera que, para las abejas melíferas, es fundamental su protección debido a su actividad en la polinización y papel crítico en la agricultura.

La criopreservación exitosa del semen se ve afectada por muchos factores, entre ellos el tamaño y la edad del zángano y la calidad del semen, así como de tres variables a tomar en cuenta: la tasa de congelación, los dilutores que se mezclan con el semen y la relación entre las cantidades de semen y dilutor (Harbo, 1979; Dadkhah *et al.*, 2016)

Se calcula que desde el proceso de colecta del semen, criopreservación del mismo y hasta su uso en la inseminación, la pérdida de volumen promedio del eyaculado es de 6.6% (Harbo, 1979), lo que garantiza la eficacia del método frente a la cantidad de semen perdido durante la monta natural.

2.8.1 Agentes crioprotectores

Son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución, el cual se define como la máxima temperatura a la que puede producirse la mayor cristalización del solvente y soluto. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración de solutos en el medio extracelular a una temperatura menor, de forma que la deshidratación celular será mayor. Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores: los alcoholes, entre ellos la glicerina; azúcares y el DMSO (Ávila *et al.* 2006)

Para Alçay *et al.* (2015) y Marín (2016) el éxito de la criopreservación depende, entre otros factores, de la naturaleza del crioprotector, la concentración del mismo y la composición del dilutor, además del proceso de congelación y descongelación.

El agente crioprotector utilizado tiene una importancia primordial puesto que es el encargado de minimizar el estrés físico y químico que sufren los espermatozoides durante la refrigeración, la congelación y la descongelación (Marín, 2016). Sin embargo, todos los crioprotectores tienen diferentes características biofísicas (Tabla 4) y por lo tanto, pueden reaccionar de manera diferente con los espermatozoides de diferentes especies (Taylor *et al.*, 2009).

Tabla 4: Características biofísicas de los crioprotectores DMSO y glicerina

Parámetros	DMSO	Glicerina
Fórmula química	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$
Peso molecular	78.13	92.10
Peso específico (g/cm^3 a 20 °C)	1.10	1.25
Concentración (g/L)		
1.0 M	78.13	92.10
3.0 M	234.39	276.30
Concentración (ml/L)		
1.0 M	71.00	73.70
3.0 M	213.10	221.10

Peso específico: peso de un volumen dado de una sustancia respecto al peso del mismo volumen de agua a 0°C.

Fuente: Hafez *et al.* (2011)

2.8.2 Efecto de los crioprotectores sobre la viabilidad de los espermatozoides

El DMSO previene la acumulación excesiva de electrolitos, ya que es capaz de unirse a estos durante el proceso de congelamiento; e igualmente previene la formación de cristales de hielo que dañan la estructura de la membrana. Debido a su bajo peso molecular la entrada a través de la membrana celular es rápida, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. En comparación, el glicerol entra y deja las células mucho más lento que el DMSO, por lo que su acción crioprotectora demora más y su acción tóxica ejerce su efecto (Ávila *et al.*, 2006; Solé *et al.*, 2009).

Harbo (1979), Taylor *et al.* (2009) y Hopkins & Herr (2010), evaluaron el semen criopreservado con DMSO y observaron que tenía mayor viabilidad posdescongelamiento que el tratado con glicerina. Además que se obtuvo más cría de obreras con el primer tratamiento.

Hopkins & Herr (2010), hallaron que la mezcla de diluyente que contenía glicerina, causa el mayor porcentaje de muerte celular antes de la congelación, por lo que en algunos estudios la glicerina fue eliminada como un crioprotector candidato.

Es así que Harbo (1977) concluye que el almacenamiento en nitrógeno líquido reduce significativamente el número de espermatozoides que llegan a la espermateca de la abeja reina, y que sin DMSO como crioprotector, el esperma no sobrevive al almacenamiento de nitrógeno líquido.

Wegener & Bienefeld (2012), cuestionaron el efecto inofensivo del DMSO, evaluado en otros trabajos, además hallaron que la toxicidad del crioprotector podía ser reducida cuando se mezclaba con otros crioprotectores.

2.8.3 Dilutor

Taylor *et al.* (2009) utilizó seis diferentes dilutores en su evaluación, tomando como base o control la solución de Kiev, la cual contenía citrato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, sulfanilamida y glucosa, a un pH de 8.37 y presión osmótica de 318 ± 2.06 mOsmol. Observó que, el dilutor evaluado que contenía citrato de sodio, bicarbonato de

sodio, cloruro de potasio, amoxicilina y catalasa, ajustado a un pH de 8.11 y presión osmótica de 280 ± 1.90 mOsmol., en proporciones de semen:dilutor de 1:9 y 1:12, no presentaban diferencias significativas en cuanto a la viabilidad de los espermatozoides.

El uso de la catalasa como antioxidante enzimático, favorecería en la optimización de los protocolos de conservación seminal, evitando que los espermatozoides sufran daños que conduzcan a la pérdida de su capacidad fecundante producto de la acumulación, en altas concentraciones, de peróxidos (Córdova et al., 2009)

En la naturaleza, la catalasa es producida por las abejas sometidas a bajas temperaturas, debido a una modificación en las glándulas rectales durante estas temporadas, y que su volumen de producción depende de la edad de las abejas, considerándolo como una reacción de defensa del organismo a las condiciones desfavorables (Jerebkin, 1976). Li-Byarlay *et al.* (2016), reportan que en zánganos, la supervivencia a un agente estresor oxidativo agudo, en este caso las bajas temperaturas, se debe a la tolerancia y la producción de catalasa.

2.8.4 Tasa de congelación del semen

Para Gul *et al.* (2017), el programa de congelación que utilizaron en su estudio, fue de -3 °C / min, partiendo de semen refrigerado a $+5$ °C hasta -40 °C, todo ello en 23 minutos y luego se mantuvo a -40 °C durante 5 minutos. Después del proceso de enfriamiento, todas las pajillas se transfirieron a nitrógeno líquido y se almacenaron.

Taylor *et al.* (2009) confirmaron los beneficios de una tasa variable controlada de enfriamiento lento / congelación rápida / descongelación rápida, previamente observada para espermatozoides de diversas especies e incluso recomendó el método de vitrificación. Hopkins & Herr (2010) consideran que un método es exitoso si la viabilidad está por encima del 50% posdescongelamiento.

2.9 Inseminación instrumental de abejas reinas

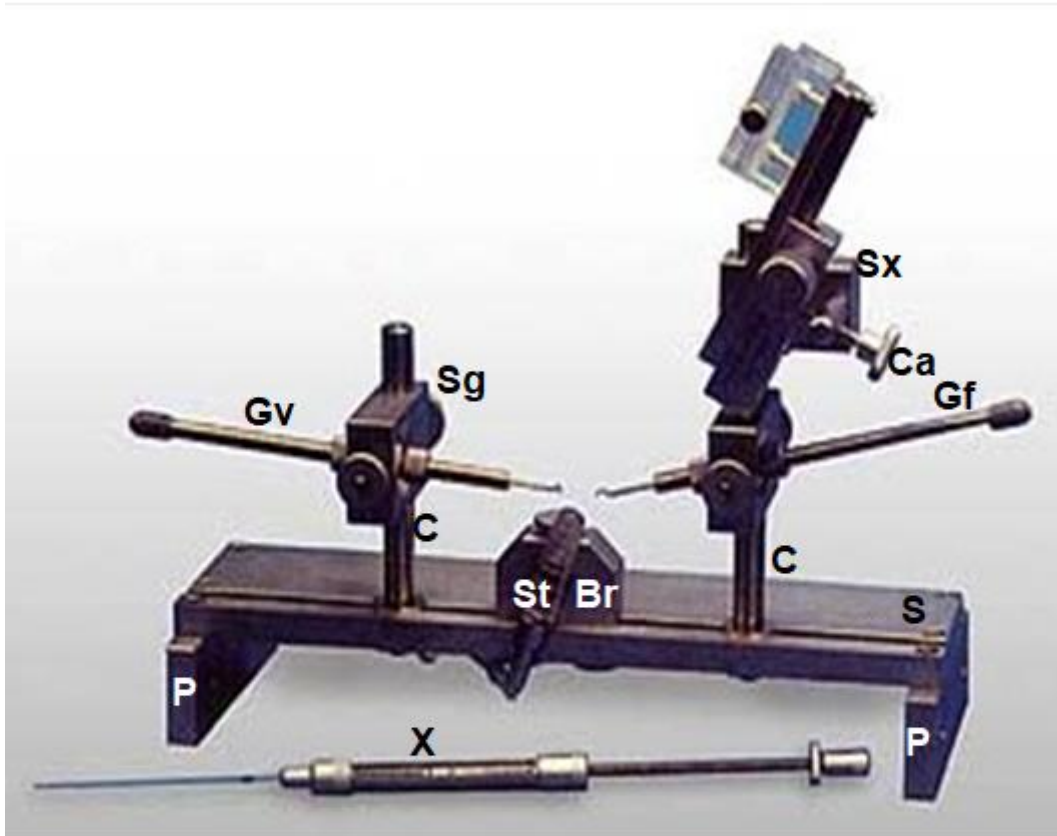
Cobey (2007) describe la inseminación instrumental como un método confiable para controlar el acoplamiento de la abeja reina, proporcionando una herramienta esencial para la investigación. Además confiere la habilidad para realizar cruza específicas que no ocurren naturalmente, y ofrece la ventaja de aparear las reinas de manera más uniforme. Sin embargo, las reinas acopladas libremente poseen significativamente más espermatozoides en las espermatecas que las reinas inseminadas instrumentalmente (Kaftanoglu, 1981)

Para Caballero (2002) la inseminación instrumental posibilita obtener líneas de abejas reinas puras por cruce a través de la consanguinidad, mientras que por cruzamiento se obtienen híbridos que incrementan la producción de miel. Además, se debe tener en cuenta que los zánganos juegan un papel primordial en la cría de reinas, puesto que su herencia es la que nos dará buenas o malas estirpes (Garau, 1990)

La capacidad de aumentar la diversidad genética dentro de una colonia y la capacidad de aislar un rasgo específico y eliminar la complejidad del fondo genético que enmascara la expresión de una característica particular; son unas de las ventajas más resaltantes de la inseminación instrumental, además es una herramienta esencial para desarrollar stocks comerciales que tienen mejor supervivencia en presencia de ácaros y enfermedades parasitarias, así como para mejorar ciertos rasgos (Cobey, 2007).

La inseminación instrumental con semen posdescongelado, luego de ser centrifugado para eliminar una proporción de los insumos utilizados, produce una cantidad considerable de abejas obreras, no obstante la población de éstos individuos obtenidos por éste método es notoriamente inferior a la cantidad de obreras obtenidas con semen fresco. Además, el uso de semen criopreservado a menudo produce un mayor número de celdas vacías (Wegener *et al.*, 2014)

Siendo una labor muy delicada, se hace necesario contar con un equipo especial para tal fin, la Figura 4 muestra el equipo de inseminación instrumental utilizado en muchos de los laboratorios dedicados a esta labor.



P: pies base; **C:** columnas de soporte; **S:** placa metálica; **Br:** bloque de la reina; **St:** stoper; **Sg:** soporte del gancho; **Gv:** gancho ventral; **Gf:** gancho del aguijón; **Ca:** tornillo de fijación y orientación de la jeringa; **Sx:** soporte de la jeringa; **X:** jeringa

Figura 4. Instrumento para inseminar abejas reinas (Sirera y Cañas, 1996)

III. METODOLOGÍA

3.1 Localización e instalaciones

La crianza de los zánganos y la colecta del semen se llevaron a cabo en las instalaciones de la empresa apícola Apicenter Caballero, ubicada en el distrito de La Victoria, Región Lima a 133 m.s.n.m, durante la temporada de primavera 2018 – verano 2019, con temperaturas estimadas entre 16°C a 27°C. Cuenta con un laboratorio adecuado para la colecta de semen, con instalaciones de agua, electricidad y mesa de trabajo. Con buena iluminación natural y artificial.

La evaluación, dilución, criopreservación y descongelamiento del semen se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE) y el laboratorio del Banco Nacional de Semen de la Facultad de Zootecnia, acondicionados a temperatura de 21°C y humedad relativa de 60%, durante el periodo que duraron las pruebas, ambos pertenecientes a la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicada en el distrito de La Molina, Región Lima a 241 m.s.n.m, durante la temporada de verano 2019, con temperaturas estimadas entre 22°C a 27°C.

3.2 Animales y alimentación

Los zánganos, obtenidos de reinas inseminadas instrumentalmente con semen fresco, por el método descrito por Caballero (2002) y Cobey *et al.* (2013), y criados en colmenas tipo Langstroth, eran de las razas italianas, carniola, caucasiana e híbrida (carniola x italiana), sin considerar una raza en particular para la colecta y ni un tamaño estandarizado.

Las colonias de las cuales provenían, eran alimentadas artificialmente en un inicio con un suplemento azucarado y una pasta proteica (Tabla 5), los mismos que fueron retirados poco

a poco conforme mejoraron las condiciones medioambientales. La Figura 5 detalla la disposición dentro de la colmena de los marcos de cría y el alimentador, utilizados durante la etapa experimental.

Tabla 5: Fórmula de preparación de la mezcla azucarada y mezcla proteica

INGREDIENTES	COMPOSICIÓN
Para la mezcla azucarada	
Agua hervida	33%
Azúcar	67%
Para la mezcla proteica	
Miel	67%
Polen	33%

FUENTE: adaptado de Standifer (1992) y Fert (1997)

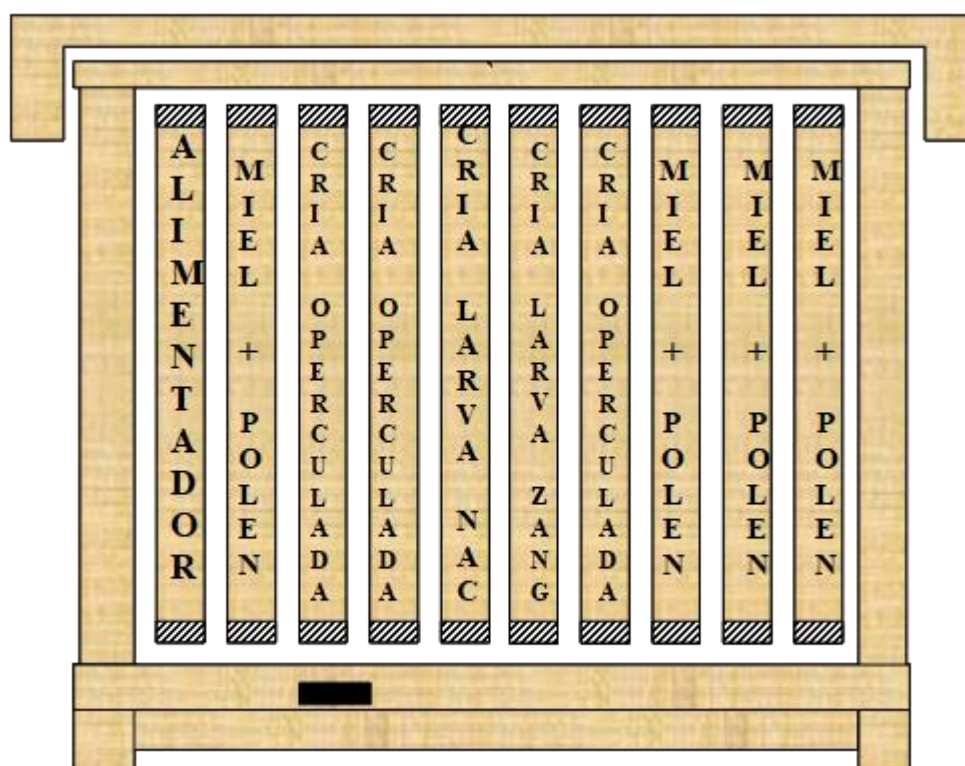


Figura 5. Ubicación de los marcos de cría, marcos de alimento y alimentador, dentro de una colmena (Caballero, 2002)

3.3 Captura de zánganos

En un inicio los zánganos eran tomados directamente del interior de las colmenas, por lo cual muchos de ellos presentaban problemas con: las heces durante la labor de colecta, la poca madurez sexual de los mismos y una baja eficiencia de colecta de semen, además del estrés generado a la población.

Por ello se optó por capturarlos cuando retornaban del vuelo, utilizando una rejilla excluidora colocada en la entrada de la piquera, la misma que evitaba que los zánganos ingresen nuevamente (Figura 6). Asimismo, de acuerdo a Fernandes (2011), la hora preferida de captura era a partir del mediodía en adelante, momento en el que la temperatura lograba su pico durante el día.

Éste método garantizaba que los zánganos ya habían tenido la oportunidad de defecar, y demostraba que tenían la edad suficiente, comprobando lo descrito por Jean-Prost & Médori (2007), incrementando así el porcentaje de colecta.

3.4 Colecta de semen

El semen se recogió directamente del endófalo del zángano, para ello debía estar en posición invertida utilizando la mano menos diestra, sujetándolo por el abdomen entre el pulgar y el índice; mientras, con la otra mano se aplicaba presión sobre la cabeza (Figura 7). La presión ejercida sobre el abdomen lograba la eversión parcial del endófalo, mientras se contraía notoriamente y se endurecía de forma involuntaria. Así, manteniendo la presión sobre el abdomen y deslizando suavemente los dedos hacia abajo, se producía la eversión completa (Stefan, 2013). Se debían mantener las condiciones sanitarias, ya que los zánganos a menudo defecaban durante la colecta (Cobey *et al.*, 2013; Stefan, 2013).

La colecta de semen se realizaba en un tiempo máximo de una hora y media a dos horas posterior a la captura, pues en éste período de tiempo los zánganos morían, dificultando con ello la actividad. Asimismo, la colecta se iniciaba cinco días antes de la fecha programada para la criopreservación.

Luego de tener la eversión completa (Figura 8), se procedía a recoger el semen (Figura 9), el cual se apreciaba macroscópicamente de color melón claro ligeramente vetado; ello

sobre una capa subyacente de mucus blanco, de consistencia más viscosa. Todo este procedimiento ocasionaba la muerte de los zánganos.



Figura 6: Captura de zánganos con rejilla excluidora en la entrada de la piquera



Figura 7: Estimulación del zángano previo a la colecta



Figura 8: Eversión completa del endófalo



Figura 9: Colecta de semen, observado a través del estereoscopio

Para aspirar el semen, se usó un capilar de vidrio de 1.1 mm de diámetro con capacidad para 100 μL , el cual estuvo adherido a una jeringa de 1 ml que contenía solución salina al 0.9%, la misma que sólo cumplió funciones hidráulicas, por ello, se dejaba un espacio de seguridad de 1 centímetro (Figura 10), con lo que se evitaba el contacto entre la solución salina y el semen, pues generaba toxicidad. A su vez, la jeringa estaba acoplada a un equipo de inseminación instrumental de abejas reinas modelo Schley modificado, adherido a un estereoscopio de 40 aumentos, lo que nos permitía observar claramente la diferencia entre el semen a coleccionar y el mucus.

Como se muestra en la Figura 11, para dar inicio a la aspiración del semen, la punta del capilar debía estar ligeramente húmeda con la solución salina. Para las siguientes tomas era necesario regresar una pequeña porción del semen tomado anteriormente, de manera que hacía contacto con la muestra a aspirar, ya que la naturaleza viscosa del semen dificultaba la labor.

Era importante evitar la aspiración del mucus o sumergir la punta del capilar en él, pues ello ocasionaba obstrucción y dificultaba la colecta. Además era necesaria la constante limpieza de la punta del capilar con un hisopo humedecido de solución salina al 0.9%, así como del cambio constante de las jeringas utilizadas durante la labor.

3.5 Volumen y eficiencia de colecta de semen

Los registros de colecta de semen fueron tomados desde un período previo al inicio de las pruebas. Los datos de volumen de eyaculado y eficiencia de colecta de semen se recopilaron en una plantilla Excel.

Al finalizar la aspiración se tenía en cada capilar la recuperación de semen de aproximadamente 25 zánganos. Posteriormente se calculaba el volumen del cilindro ocupado por la muestra, para ello se medía la altura obtenida por el semen, con un vernier Caliper de 0 – 150 X 0.05 mm (Figura 12), mediante la fórmula:

$$V = \pi * r^2 * h$$

Donde:

V = volumen de semen obtenido en el capilar.

r^2 = radio de la base del capilar elevado al cuadrado.

h = altura obtenida por el semen en el capilar.

En el cálculo de volumen de semen por zángano se obtuvo dos resultados, mediante las siguientes fórmulas:

- Volumen de semen obtenido por zángano utilizado en cada capilar:

$$V = \frac{\text{volumen del semen en el capilar}}{\text{cantidad de zánganos utilizados por capilar}} \mu L$$

- Volumen de semen obtenido por zángano efectivo utilizado en cada capilar:

$$V = \frac{\text{volumen del semen en el capilar}}{\text{cantidad de zánganos que sí eyacularon}} \mu L$$

Durante el proceso de colecta no todos los zánganos utilizados lograban eyacular, tal como lo mencionan Stefan (2013) y Rousseau *et al.* (2015), por ello era inevitable la pérdida de muchos y fue necesario contar con un mayor número por cada colecta realizada. La cantidad de zánganos que lograban eyacular fue considerada como eficiencia de colecta de semen.

Terminada la operación, el capilar era retirado de la jeringa y sellado por ambos extremos con vaselina, sin dejar espacios de aire entre ésta y el semen. Se tomaba nota del volumen y de la cantidad total de zánganos utilizados para obtener cada capilar.

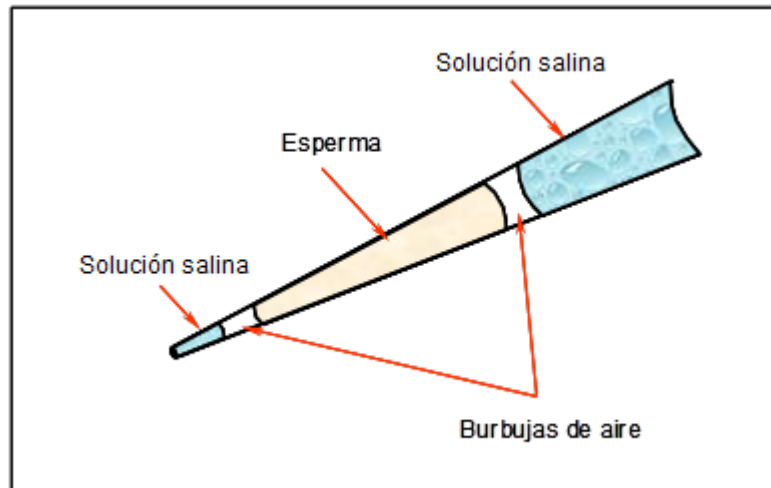


Figura 10. Disposición del capilar utilizado para la colecta de semen (Ruttner, 1976)

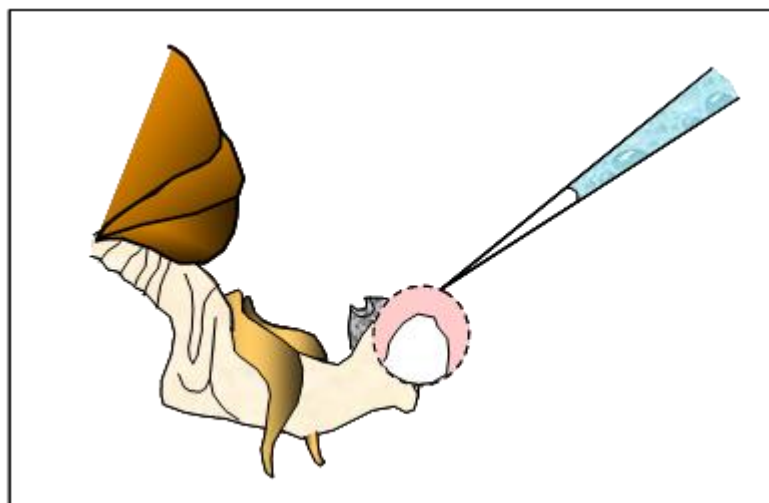


Figura 11: Colecta del semen, tomado directamente del endófalco en erección (Ruttner, 1976)

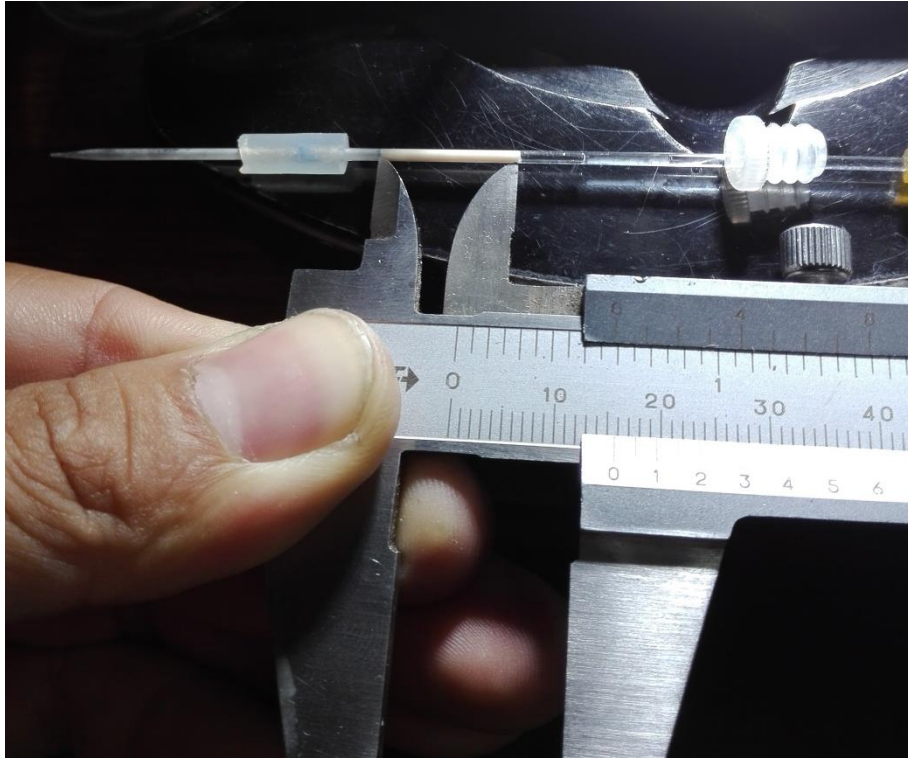


Figura 12: Medición de la altura del cilindro

3.6 Determinación de la concentración espermática

Ya que el semen de los zánganos es demasiado viscoso para poder ser evaluado puro, debido a la gran concentración de espermatozoides en tan pequeño volumen, se tuvo que probar diferentes diluciones. En el laboratorio del Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE), se determinó la proporción de dilución del semen en el dilutor a utilizar. Con un microscopio marca Nikon modelo Eclipse E200, con aumentos de 4X, 10X, 40X y 100X, y utilizando solución salina al 0.9%.

Se utilizaron tres capilares de semen que no fueron usados para la criopreservación; cada capilar se diluyó en un matraz con solución salina al 0.9% en proporción de 1:3000, realizándose cuatro evaluaciones para cada capilar diluido. La mezcla del semen con la solución salina ocasionó la muerte de todos los espermatozoides.

La observación se hizo en el microscopio, conectado a un monitor, con el aumento de 400X, colocando 20 μ L sobre ambos espacios de la cámara de Neubauer, la misma que ya

tenía acoplado el cubreobjetos, lo que dispersó la muestra por capilaridad. Para cada evaluación el matraz fue agitado.

Se tomó una captura de pantalla, con ayuda del monitor, y se contabilizó la cantidad de células en las cuatro esquinas y el medio de cada espacio de la cámara. Se promedió la cantidad contada en ambos espacios y se anotó para cada evaluación.

Para el cálculo de la concentración se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides}/\mu\text{l} = \bar{X} \left(\frac{1 \text{ cuadrado}}{0.1 \text{ mm}^3} \right) \left(\frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} \right) \left(\frac{1 \text{ ml}}{1000 \mu\text{l}} \right) (\text{FA}) \quad (50)$$

Donde:

\bar{X} = Promedio de espermatozoides.

F.A = Factor de dilución, en éste caso 3000.

3.7 Dilución del semen de zánganos

La dilución y criopreservación se llevaron a cabo en el laboratorio del Banco Nacional de Semen. Las muestras de semen fueron colectadas en el transcurso de cinco días previo a la criopreservación. La dilución y criopreservación se llevaron a cabo en el mismo día.

Para la preparación del dilutor de citrato de sodio se usó una balanza analítica marca Adam modelo PW 254, con capacidad para 250 gramos y tolerancia de 0.0001 gramos, pesando los componentes de acuerdo a lo utilizado por Taylor *et al.*, (2009), y cuya composición se detalla en la Tabla 6. Asimismo, la catalasa necesitaba ser diluida en un medio buffer de fosfato de potasio (Tabla 7) en proporción de 1mg/ml, al cual se controló el pH, siendo mezclada con el dilutor de citrato de sodio minutos antes de la experimentación.

El orden de preparación de la mezcla era colocando 15 μl del dilutor en el fondo de un tubo Eppendorf de 2 ml y luego se añadía determinado volumen de semen, a continuación se completaba con dilutor en las proporciones de semen:dilutor de 1:9 o 1:12, dejando ésta mezcla por un periodo de 10 minutos, lo que permitía que los espermatozoides se adapten

al medio, se homogenizaba la mezcla con movimientos suaves. El dilutor se encontraba a la temperatura ambiente del laboratorio del Banco Nacional de Semen, 21°C.

Para la medición del volumen de semen utilizado, y debido a la viscosidad de las muestras, se realizaba primero la medición del volumen del cilindro ocupado por el semen en el capilar y se vertía en el tubo Eppendorf un equivalente a la cuarta parte de la muestra contenida, posteriormente y por diferencia se conocía el volumen de semen utilizado.

Finalizada la mezcla con el dilutor, se añadía el crioprotector en proporción (v/v) de 10%, con respecto al volumen de semen utilizado, para ello se empleó 15 capilares conteniendo las muestras. Ésta operación se repitió tanto con el DMSO como con la glicerina, sobre las proporciones de semen:dilutor de 1:9 y 1:12, obteniendo al final cuatro mezclas diferentes por cada capilar utilizado.

Al finalizar esta operación y previo a la criopreservación de cada una de las muestras, se colocó 50 µL del semen diluido sobre una lámina portaobjetos, y sin utilizar el cubreobjetos, se evaluó la motilidad asignando valores subjetivos de 0 a 5, ello en un periodo de una hora.

Tabla 6: Fórmula del dilutor

Componente	g/100 mL H₂O bidestilada
Citrato de sodio	2.430
NaHCO ₃	0.210
KCl	0.040
Amoxicilina	0.030
Solución de catalasa	200 µL
pH	8.1

FUENTE: Taylor (2009)

Tabla 7: Fórmula del medio buffer de fosfato de potasio

Componente	g/500 mL H₂O bidestilada
KH ₂ PO ₄	2.04
K ₂ HPO ₄	1.74
pH	7

FUENTE: elaboración propia

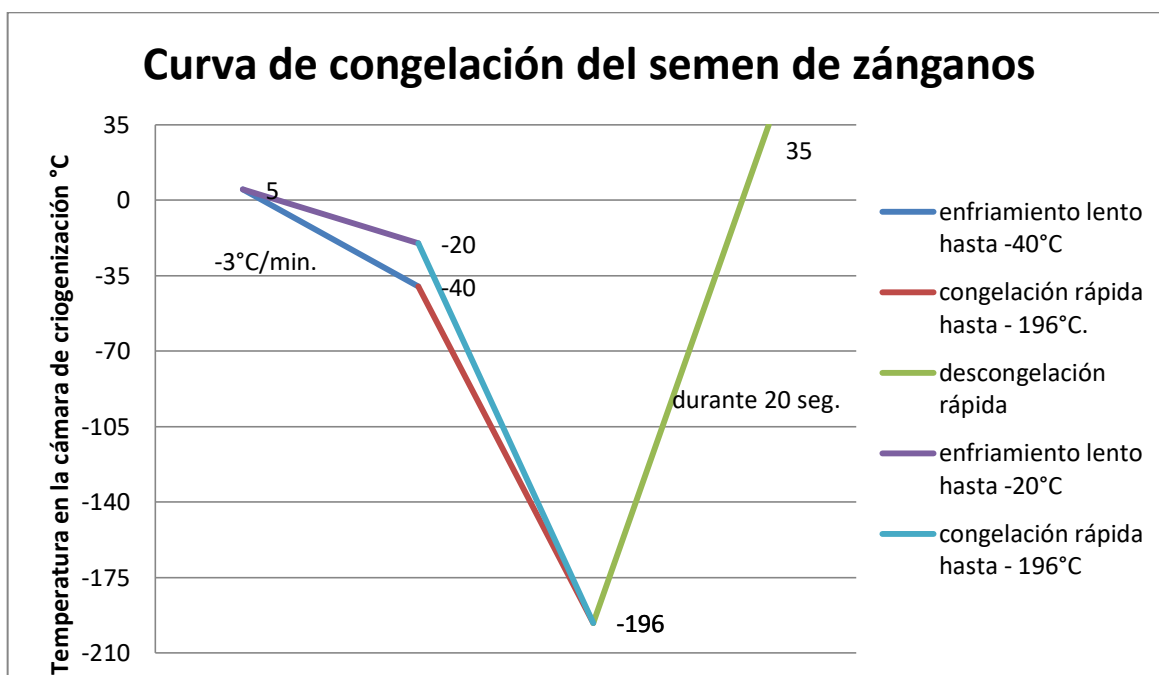
3.8 Criopreservación del semen

El contenido de los tubos Eppendorf se colocó en pajillas de semen de 0.5 cc, cortadas por la mitad, utilizando el lado que contenía el tapón de algodón, se sellaba con polvo de alcohol polivinílico el extremo libre.

El proceso de congelamiento se realizó a dos temperaturas diferentes, en el primer caso se utilizaron cinco capilares de semen, en los que se redujo $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -20°C para luego sumergirlas en el nitrógeno líquido. Para el segundo caso, se utilizaron diez capilares, reduciendo la temperatura $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -40°C y posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido (Tabla 8)

La metodología de la criopreservación implicó modificar la altura de la rejilla de la cámara de criopreservación con respecto al nitrógeno líquido, utilizada para la criopreservación de semen de toros, de forma tal que el descenso de temperatura sea más lento (Figura 13).

Tabla 8: Curva de congelación del semen de zánganos



Fuente: elaboración propia



Figura 13: Cámara de criogenización con las muestras en proceso de criopreservación

3.9 Proceso de descongelación

La descongelación se realizaba de manera individual, sumergiendo cada pajilla en un termo con agua a 35°C, por un periodo de 20 segundos. Posteriormente se retiró y secó, para luego cortarla por el extremo que contenía el alcohol polivinílico, expulsando el contenido en una lámina porta objetos, dividiendo la muestra en cinco gotas.

Se utilizó el microscopio con el lente de 400X, conectado a la cámara y al monitor para observar la muestra, para lo cual no se utilizó el cubreobjetos. Conforme se realizaba la descongelación, se preparaba las muestras para la evaluación de la motilidad y viabilidad de las mismas.

Se evaluó la motilidad de cada una de las gotas observando que, la primera gota, que estuvo en contacto con el alcohol polivinílico, mostraba nula o muy baja motilidad, se asignó valores subjetivos de 0 a 5. Asimismo se apreciaron algunas anomalías espermáticas.

3.10 Viabilidad posdescongelamiento

Sobre una lámina porta objetos se colocó 1µl de solución Hoechst – PI de marca comercial MASED® y se añadió 1µl de la muestra descongelada y 3µl de dilutor de marca comercial Andromed®, sobre la misma lámina se homogenizó y se colocó la lámina cubre objetos, dejando dos minutos de incubación al aire para que el fluorocromo pueda ingresar a la membrana citoplasmática (células dañadas). Pasado este tiempo se observó bajo el microscopio con aumento de 400X, bajo una longitud de onda de emisión/excitación de 350 a 461 nm. Se identificó como células dañadas aquellas que se tiñeron de rojo, mientras que las que no sufrieron daño, de azul.

Se buscó un campo que permitiese el conteo de la muestra, y con ayuda del monitor, se realizó una captura de pantalla. La imagen obtenida se dividió en una cuadrícula de 3X3, considerando como resultado de la muestra el porcentaje de las cuatro imágenes de las esquinas junto con la del medio, diferenciando células vivas de muertas. Según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{número de células teñidas de azul}}{\text{número total de células contadas}} \times 100$$

3.11 Análisis estadístico

Para el análisis de motilidad del semen diluido fresco y del semen posdescongelado, se comprobó la distribución normal y la homogeneidad de varianza y se utilizó la prueba de Friedman, con el programa estadístico INFOSTAT® (Balzarini *et al.*, 2008). Donde los bloques son representados por cada capilar y la combinación del crioprotector con el grado de dilución corresponde a los tratamientos. El análisis se realizó para ambas temperaturas de congelación, eliminándose los bloques que no estén balanceados.

Para el análisis de viabilidad posdescongelamiento, los datos se convirtieron al valor de ArcoSeno y se sometieron a un ANOVA, con el programa estadístico INFOSTAT® (Balzarini *et al.*, 2008). Se consideró como factores a los crioprotectores (DMSO y glicerina) y los grados de dilución del semen en el dilutor (1:9 y 1:12), y como tratamientos a las diferentes combinaciones de semen y crioprotector con los grados de dilución en el dilutor.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características del semen colectado

4.1.1 Volumen y eficiencia de colecta de semen

Se capturaron 1832 zánganos para la colecta de semen, lo cual fue contenido en 39 capilares de vidrio, no todas las colectas fueron usadas para la experimentación. Los resultados individuales para cada capilar se muestran en el ANEXO 1.

Se obtuvo que el volumen promedio de semen por zángano que eyaculó corresponde a $0.67 \pm 0.16 \mu\text{l}$, mientras que del total de zánganos utilizados durante este período el volumen promedio calculado fue de $0.36 \pm 0.11 \mu\text{l}$. De los 1832 zánganos utilizados para la colecta de semen, sólo 991 de ellos fueron capaces de eyacular, lo que representa un 54.09% como la eficiencia de colecta de semen.

Rhodes (2008), Gençer *et al.* (2011) y Rousseau (2015), obtuvieron valores promedio de volumen eyaculado por zánganos superiores a $1 \mu\text{l}$, lo cual difiere a los resultados obtenidos en esta evaluación, en la que se obtuvo un volumen promedio de $0.67 \pm 0.16 \mu\text{l}$. La diferencia se puede deber a que no se consideró una raza en particular de abejas ni tampoco un tamaño estandarizado de zánganos.

La eficiencia de colecta de semen en esta prueba fue de 54.09%, lo cual es similar a lo reportado por Rousseau *et al.* (2015), quienes obtuvieron que el 55.3% de zánganos capturados produjo una cantidad suficiente de semen para ser colectado. Para Rhodes (2008), los zánganos de 14 días de edad tienen una eficiencia de colecta de 59%, por lo que podemos suponer que los capturados en esta prueba bordean esta edad.

Se comprobó lo descrito por Fernandes (2011) y Cobey *et al.* (2013), pues se estableció

como hora de captura de los zánganos que retornaban del vuelo entre las horas de la tarde. Se observó que muchos de los zánganos utilizados para la colecta no lograban la eversión completa del endófalo, y en algunos casos la eyaculación se dio de manera violenta, corroborando lo descrito por Stefan (2013).

4.1.2 Concentración espermática

El ANEXO 2 detalla los resultados individuales de la concentración espermática hallada en las 12 repeticiones realizadas. Se obtuvo un promedio de $3.91 \pm 0.64 \times 10^6$ espermatozoides por microlitro, mientras que la concentración espermática por volumen promedio eyaculado por zángano es de $2.62 \pm 0.43 \times 10^6$.

Los resultados obtenidos en esta evaluación son menores a lo reportado por Taylor *et al.* (2009) y Gençer *et al.* (2011), quienes obtuvieron $8.80 \pm 0.98 \times 10^6$ y $7.32 \pm 0.11 \times 10^6$ de espermatozoides totales por eyaculado, respectivamente. No así para los resultados obtenidos por Rousseau *et al.* (2015), quienes reportaron $1.80 \pm 1.65 \times 10^6$ en promedio por eyaculado, siendo menor a lo registrado en el presente trabajo. Sin embargo, los resultados se aproximan a los reportados por Rhodes (2008) quien obtuvo un promedio de 3.63×10^6 de espermatozoides por zángano y Metz & Tarpy, (2019) con promedio de $4.93 \pm 0.15 \times 10^6$. Según Schlüns *et al.* (2003), esta diferencia se debe a que no se emplearon zánganos con tamaño estandarizado.

4.1.3 Motilidad del semen diluido precongelado

La Tabla 9 presenta los resultados promedio de la evaluación de motilidad del semen diluido y mezclado con los crioprotectores, de todos los capilares utilizados en la experimentación, luego de una hora de realizada las mezclas. Al momento de la toma de muestras para realizar la evaluación se perdieron dos repeticiones (ANEXO 3), por lo que para el análisis estadístico sólo se utilizó los datos de los bloques balanceados.

Tabla 9: Motilidad del semen diluido precongelado

	DMSO 1:9	DMSO 1:12	GLICERINA 1:9	GLICERINA 1:12
n	14	15	14	15
Promedio	3.43 ± 0.62	3.33 ± 0.65	4.07 ± 0.47	3.97 ± 0.44

Los resultados de motilidad precongelamiento observados indican que el semen diluido, en la proporción semen:dilutor de 1:9 o 1:12, mezclado con glicerina, son superiores a los resultados de motilidad del semen observados cuando se usa el DMSO en cualquiera de las dos proporciones de dilución del semen en el dilutor.

En el resultado de la comprobación de los supuestos (ANEXO 4, ANEXO 5 Y ANEXO 6), a un nivel de significancia de 0.05, se puede afirmar que los datos obtenidos no cumplen con la distribución normal ni la homogeneidad de varianza ($p < 0.0001$).

Así, evaluando estadísticamente mediante una prueba aproximada de Friedman (ANEXO 7), con $p = 0.001$, a un nivel de significación de 0.05, se puede afirmar que los crioprotectores DMSO y glicerina, mezclados con el semen en el nivel de dilución en el dilutor, de 1:9 y 1:12, tienen diferentes efectos sobre la motilidad del semen precongelado.

Al realizar las pruebas de comparación (ANEXO 8), a un nivel de significación de 0.05, se puede afirmar que la glicerina, en cualquiera de los dos niveles de dilución en el dilutor, ejerce un menor efecto tóxico sobre la motilidad del semen precongelado luego de una hora de realizada la mezcla.

Los valores de motilidad promedio obtenido para el semen precongelado diluido y mezclado con DMSO o glicerina, se aproximan a lo obtenido por Alçay *et al.* (2015), quienes reportan 3.8 ± 0.2 y 3.0 ± 0.3 , respectivamente. Dadkhah *et al.* (2016) utilizaron como dilutores soluciones tampón mezcladas con yema de huevo o lecitina de soya, obteniendo valores de motilidad para el semen fresco superior a 4.0. Los resultados obtenidos se ajustan a las recomendaciones dadas por Taylor *et al.* (2009), Alçay *et al.* (2015) y Dadkhah (2016), quienes sugieren que valores de motilidad mayores a 3.0 son ideales para la inseminación instrumental y la congelación.

Los resultados obtenidos en esta prueba se contraponen a los obtenidos por Taylor *et al.* (2009), Hopkins & Herr (2010) y Alçay *et al.* (2015), quienes observaron que la respuesta de motilidad del semen fresco era mejor con DMSO que con glicerina.

4.2 Características del semen posdescongelado

Tabla 10: Características del semen posdescongelado, congelado a – 20°C

Crioprotector y dilución	n	Motilidad	Viabilidad
DMSO 1:9	4	1.38±1.03	45.40±4.39
GLICERINA 1:9	5	1.9±1.75	32.65±15.51
DMSO 1:12	5	1.7±0.76	40.34±15.69
GLICERINA 1:12	4	2.25±1.55	43.33±3.62 (n=3)

Tabla 11: Características del semen posdescongelado, congelado a – 40°C

Crioprotector y dilución	n	Motilidad	Viabilidad
DMSO 1:9	6	2.00±1.00	59.52±11.85
GLICERINA 1:9	9	1.89±0.96	52.62±8.33
DMSO 1:12	9	2.33±0.94	57.70±11.19
GLICERINA 1:12	9	2.22±0.97	55.39±4.64

4.2.1 Motilidad

Los resultados obtenidos que se detallan en la Tabla 10 y Tabla 11, corresponden a la evaluación de la motilidad del semen posdescongelado, cuando fue congelado hasta – 20°C y – 40°C, para luego ser sumergido en nitrógeno líquido para criopreservarlo. En el ANEXO 9 y el ANEXO 10 se detallan los resultados individuales obtenidos de la evaluación.

Se observa que para la temperatura de congelamiento a – 20°C, la motilidad promedio posdescongelado, obtenida con la glicerina es superior a la observada con el DMSO, cuando se diluye en la proporción de 1:9, siendo de 1.9 ± 1.75 y 1.38 ± 1.03 , respectivamente. Asimismo, cuando el semen es diluido en el dilutor en la proporción 1:12, donde el uso del DMSO muestra menor resultado que con la glicerina, obteniéndose 1.7 ± 0.76 y 2.25 ± 1.55 , respectivamente.

Para la temperatura de congelamiento a -40°C , la motilidad promedio posdescongelado, cuando se usa el DMSO, en la proporción de dilución del semen:dilutor de 1:9, es de 2.00 ± 1.00 , siendo superior a lo mostrado con el uso de la glicerina en la misma proporción, el cual es de 1.89 ± 0.96 . De igual modo, para la proporción de dilución de semen:dilutor de 1:12, el uso de DMSO como crioprotector muestra mejor motilidad posdescongelamiento que cuando se usa glicerina, siendo 2.33 ± 0.94 y 2.22 ± 0.97 , respectivamente.

Se evaluó el cumplimiento de los supuestos de los datos obtenidos de la motilidad posdescongelamiento, del semen congelado a -20°C (ANEXO 11, ANEXO 12 y ANEXO 13), y sometiendo los resultados a la prueba de Friedman, detallada en el ANEXO 14, con $p = 0.905$ y un nivel de significancia de 0.05, se puede afirmar que no existe diferencia significativa en el promedio de motilidad posdescongelamiento, entre los crioprotectores DMSO y glicerina, así como en los grados de dilución de 1:9 y 1:12 del semen en el dilutor.

Para los resultados de motilidad del semen posdescongelado, congelado a -40°C , se comprobó que no se cumplían los supuestos (ANEXO 15, ANEXO 16 y ANEXO 17) por lo que mediante la prueba de Friedman (ANEXO 18) a un nivel de significancia de 0.05 ($p = 0.7099$), se puede afirmar que no existe diferencia significativa en el uso de los diferentes grados de dilución del semen en el dilutor cuando se usan tanto el DMSO o la glicerina como crioprotectores.

Los resultados de motilidad posdescongelamiento, obtenidos cuando el semen se congela a -20°C , se muestran superiores cuando se usa glicerina que cuando se usa DMSO, por lo cual se contraponen a los obtenidos por diversos autores, quienes demostraron que la motilidad del semen posdescongelado, utilizando DMSO, es mejor que cuando se utiliza glicerina. Sin embargo, los autores consiguieron estos resultados congelando el semen hasta -40°C para luego criopreservarlo.

Para los resultados de motilidad posdescongelamiento, obtenidos cuando el semen se congeló a -40°C , Dadkhah *et al.* (2016) obtuvieron un valor máximo de motilidad posdescongelamiento de 3.6 ± 0.24 , muy por encima de lo reportado en el presente trabajo. Sin embargo, Alçay *et al.*, (2015) para el semen criopreservado con glicerina, obtuvieron una motilidad posdescongelamiento de 2.0 ± 0.2 , lo cual se aproxima a los valores obtenidos en la presente investigación cuando se mezcló con el mismo crioprotector en proporción de 1:9 y 1:12, reportándose 1.89 ± 0.96 y 2.22 ± 0.97 , respectivamente. Sin

embargo, Alçay *et al.*, (2015) reportaron, para el semen criopreservado con DMSO y congelado a -40°C , una motilidad de 3.1 ± 0.2 , en contraste a los resultados obtenidos en esta evaluación que dieron, para las proporciones de dilución de 1:9 y 1:12 utilizando el mismo crioprotector, 2.00 ± 1.00 y 2.33 ± 0.94 , respectivamente.

Para ambas temperaturas de congelamiento no se aprecia diferencia en el uso de los diferentes grados de dilución del semen en el dilutor, demostrando lo propuesto por Taylor *et al.* (2009), quienes obtuvieron que diluyendo el semen en proporción de 1:9 o 1:12, los resultados de motilidad no tenían diferencia significativa.

4.2.2 Viabilidad

Los resultados obtenidos que se detallan en la Tabla 10 y Tabla 11 corresponden a la evaluación de la viabilidad posdescongelamiento, medida en porcentajes, cuando el semen se congeló hasta -20°C y -40°C , para luego ser sumergido en nitrógeno líquido para criopreservarlo. En el ANEXO 19 y ANEXO 20 se detallan los resultados individuales obtenidos de la evaluación.

Se observa que, el promedio de la viabilidad del semen posdescongelado, obtenido cuando es congelado hasta -20°C , usando DMSO como crioprotector en la dilución de semen:dilutor de 1:9 es de $45.40 \pm 4.39\%$, superior a lo observado cuando se utilizó glicerina en la misma proporción de dilución, que fue de $32.65 \pm 15.51\%$. Por el contrario se observa que cuando el DMSO es utilizado en la proporción de semen:dilutor de 1:12, el promedio de viabilidad es menor a lo observado cuando se utilizó glicerina, obteniendo $40.34 \pm 15.69\%$ y $43.33 \pm 3.62\%$, respectivamente.

La viabilidad del semen postdescongelado observada, cuando el semen se congeló a -40°C , es superior cuando se usó DMSO como crioprotector en la proporción de 1:9 que cuando se usó glicerina, presentando $59.52 \pm 11.85\%$ y $52.62 \pm 8.33\%$, respectivamente. Asimismo, para la mezcla de DMSO en la dilución de semen:dilutor de 1:12 fue de $57.70 \pm 11.19\%$, superior a la observada cuando se utilizó glicerina, que fue de $55.39 \pm 4.64\%$.

Para el análisis estadístico de los resultados de viabilidad del semen posdescongelado, cuando se congeló a -20°C , se comprobó el cumplimiento de los supuestos (ANEXO 21 y

ANEXO 22) y, mediante el análisis de la varianza (ANEXO 23) a un nivel de significancia de 0.05, se puede afirmar que no existe interacción entre el crioprotector utilizado y el dilutor ($p = 0.2239$), igualmente no hay diferencia estadística en el uso de una u otra proporción de dilución del semen en el dilutor ($p = 0.6381$). Así, hay suficiente evidencia estadística para afirmar que el efecto del crioprotector sobre la viabilidad del semen posdescongelado se cumple para ambos insumos ($p = 0.4527$).

Los resultados de viabilidad del semen posdescongelado, congelado a -40°C , cumplen con los supuestos (ANEXO 24 y ANEXO 25), por lo que el análisis de la varianza (ANEXO 26) demostró que, a un nivel de significancia de 0.05, no existe interacción entre los crioprotectores utilizados y los diferentes grados de dilución del semen en el dilutor ($p = 0.4693$), igualmente existe suficiente evidencia para afirmar que no hay diferencia estadística en el uso de las diferentes proporciones de dilución del semen en el dilutor ($p = 0.9192$). Asimismo, no hay diferencia del efecto de los crioprotectores sobre la viabilidad posdescongelamiento del semen ($p = 0.1588$).

Los resultados promedio de viabilidad posdescongelamiento, del semen congelado a -20°C , son inferiores a lo reportado por Rousseau *et al.*, (2015), Kachura *et al.*, (1997) y Paillard *et al.*, (2017), y superior a lo obtenido por Taylor *et al.*, (2009). Sin embargo, el promedio de viabilidad obtenido cuando el semen se congeló a -20°C es menor a lo recomendado por Hopkins & Herr (2010), quienes consideran que un método es exitoso, si la viabilidad está por encima del 50% posdescongelamiento.

Los resultados promedio de viabilidad del semen posdescongelado, cuando es congelado a -40°C , son inferiores a los reportados por Paillard *et al.*, (2017), quienes obtuvieron $76 \pm 5\%$, al cabo de 330 días de haber sido congelado el semen utilizando DMSO, y Kachura *et al.*, (1997), quienes obtuvieron un promedio entre 60 – 80%, para un periodo de tiempo semejante; y superiores a los registrados por Taylor *et al.*, (2009) quienes obtuvieron $49.32 \pm 2.28\%$, utilizando DMSO, y $45.47 \pm 1.69\%$ con glicerina. Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación se aproximan a lo reportado por Alçay *et al.*, (2015), quienes usando glicerina presentaron valores de viabilidad de $51.8 \pm 3.6\%$, mientras que, usando DMSO, de $69.5 \pm 3.2\%$.

Con el semen congelado a -40°C se obtuvo mejor respuesta de viabilidad posdescongelamiento con el DMSO que con la glicerina, coincidiendo con los resultados obtenidos por Harbo (1979), Taylor *et al.*, (2009) y Hopkins & Herr (2010). Asimismo, se puede afirmar que el método de enfriamiento a -40°C y luego sumergirlo en nitrógeno

líquido es exitoso, pues los promedios de viabilidad para ambos crioprotectores en los dos diferentes grados de dilución del semen en el dilutor, supera el 50%, tal como lo consideran Hopkins & Herr (2010).

No se aprecia diferencia en el uso de los diferentes grados de dilución del semen en el dilutor, demostrando lo propuesto por Taylor *et al.*, (2009), quienes obtuvieron que diluyendo el semen en proporción de 1:9 o 1:12, los resultados de viabilidad no tenían diferencia significativa.

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones que se realizó el presente trabajo se concluye que:

1. El uso del DMSO como crioprotector muestra mejores resultados de viabilidad espermática frente al uso de la glicerina, en cualquiera de los dos grados de dilución del semen en el dilutor.
2. Los valores observados de viabilidad espermática posdescongelamiento tuvieron mejores resultados cuando el semen se congeló a -40°C en comparación a lo observado cuando el semen se congeló a -20°C .

VI. RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones del presente trabajo se recomienda:

1. Congelar el semen a -40°C para luego criopreservarlo, asimismo utilizar como crioprotector el DMSO, diluyendo el semen en cualquiera de las dos proporciones de dilución en el dilutor.
2. Obtener respuestas de fertilidad en reinas usando semen congelado a -40°C utilizando DMSO.
3. Trabajar con zánganos de la misma edad y evitar el intercambio de estos entre las colmenas, utilizando rejillas o poblaciones aisladas.
4. Difundir entre los apicultores el uso de herramientas reproductivas, a fin de mejorar la producción apícola en las diferentes regiones de nuestro país.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alçay, S. Üstüner, B. Çakmak, I. Çakmak, S. Nur, Z. (2015). Effects of Various Cryoprotective Agents on Post-Thaw Drone Semen Quality. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21(1): 31-3.
2. Alins, E. (1986). Cría de reinas. Zaragoza, España: Síntesis.
3. Ávila-Portillo, L. Madero, J. López, C. León, M. Acosta, L. Gómez, C. Delgado, L. Gómez, C. Lozano, J. Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4): 291-300.
4. Balzarini M. Gonzalez L. Tablada M. Casanoves F. Di Rienzo J. Robledo C. (2008). Manual del Usuario. Córdoba, Argentina: Brujas.
5. Barrera, A. Romero, E. (2014). Manual de cría de abejas reinas. (4° ed.). México: SAGARPA.
6. Benedetti, L. Pieralli, L. (1990). Apicultura. Barcelona, España: Omega.
7. Borges, D. (2012). Desempenho reprodutivo com inseminação artificial em suínos com doses homospermicas e heterospermicas (Tesis de maestría, Universidade Federal de Pelotas). Recuperada http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/bitstream/123456789/2467/1/Dissertacao_daniel_savio.pdf
8. Borst, P. (2015). Honey bee genetics. *American Bee Journal*, 155(10): 1091-1096.
9. Büchler, R. Andonov, S. Bienefeld, K. Costa, C. Hatjina, F. Kezic, N.....Wilde, J. (2013). Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* Queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1-30.
10. Burley, L. Fell, R. Saacke, R. (2008). Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Incubated at Room Temperature from Drones Exposed to Mitocides. *Journal of Economic Entomology*, 101(4): 1081-1087.
11. Caballero, A. (2002). Inseminación artificial de abejas reinas (*Apis mellifera*) en el Perú (Tesis de ingeniero) Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

12. Cobey, S. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38: 390-410.
13. Cobey, S, Tarpy, D. Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* Queens. *Journal of Apicultural Research*, 52 (4).
14. Collins, A. Donoghue, A. (1999). Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*, 51: 1513-1523.
15. Córdova, A. Ruiz, C. Córdova, C. Córdova, M. Guerra, J. Rodríguez, B. Arancibia, K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1): 01-38.
16. Dadkhah, F. Nehzati-Paghaleh, G. Zhandi, M. Emamverdi, M. Hopkins, 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.
17. Dávila, M. (1984). Principios de apicultura: Crianza de abejas, producción de miel, polen y cera. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
18. Dugo, A. (16 de enero de 2014). Re: ¿Por qué son tan importantes las abejas en la vida del ser humano? [Mensaje en un blog]. Recuperado de <https://www.eoi.es/blogs/andresdugo/2014/01/16/%C2%BFporque-son-tan-importantes-las-abejas-en-la-vida-del-ser-humano/>
19. Durval, J. (1981). Inseminação artificial Da Abeja Rainha. (9° ed.). São Paulo, Brazil: Agronômica.
20. Fernandes, E. Regina, M. de Oliveira, L. Fernando, W. Vieira, V. (2011). Influence of Climate Factors on Flight Activity of Drones of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 57(1).
21. Fert, G. (1997). Breeding queens. Francia: Echauffour.
22. Galindo, A. Quiroga, O. Bianchi, E. Ayup, M. (2017). Primer reporte de un área de congregación de zánganos de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) de Argentina. *Revista de la sociedad entomológica Argentina*, 76(1-2): 50-53.
23. Garau, J. (1990). Curso superior de apicultura. Palma de Mallorca, España, Taller Grafic Ramon – Balmes.
24. Gençer, H. Kahya, Y. (2011). Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *Journal of Apicultural Research*, 50(2): 130-137.

25. Gençer, H. Kahya, Y. Woyke, J. (2014). Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. *Apidologie*, 45:757-770.
26. Gul, A. Şahinler, N. Onal, A. Hopkins, B. Sheppard, W. (2017). Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, 101: 109-113.
27. Guth, J. (1990). *Elevage, Selection et Insemination Instrumentale Des Reines D`Abeillas*. París, Francia: Syndicat National d'Apiculture.
28. Hafez, E. Hafez, B. (2011). *Reproducción e inseminación artificial en animales (7° ed.)*. Ciudad de México, México: McGraw Hill.
29. Harbo, J. (1977). Survival of honey bee spermatozoa in liquid nitrogen. *Annals of the entomological society of America*, 70(2): 257-258.
30. Harbo, J. (1979). Storage of honeybee spermatozoa at -196°C . *Journal of Apicultural Research*, 18(1): 57-63.
31. Hassan, A. (1997). Mantenimiento de los zánganos y su efecto en el rendimiento y comportamiento de las colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera carnica*). En Verheyen, R. (presidencia), Simposio llevado a cabo en el 35 Congreso internacional de apicultura, Amberes, Bélgica.
32. Herrera, J. (2005). *Criopreservación y evaluación fisiológica y reproductiva de espermatozoides de tres especies de aves (Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana)*. Recuperada <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI12026.pdf>
33. Hopkins, B. Herr, C. (2010). Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*, 41: 548.
34. Hopkins, B. Herr, C. Sheppard, W. (2012). Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction Fertility and Development*, 24(8): 1079.
35. Hopkins, B. Cobey, S. Herr, C. Sheppard, W. (2016). Gel-coated tubes extend above-freezing storage of honey bee (*Apis mellifera*) semen to 439 days with production of fertilised offspring. CSIRO PUBLISHING. doi: <http://dx.doi.org/10.1071/RD16087>
36. Jean-Prost, P. Médori, P. (2007). *Apicultura, Conocimiento de la abeja, manejo de la colmena (7° ed.)*. Madrid, España: Mundi-Prensa.

37. Jerebkin, MV. (1976). Influencia de las condiciones ecológicas en el nivel de la actividad de la catalasa de las glándulas rectales. En Stănculescu, G. (trad.), Simposio llevado a cabo en el 1 Congreso internacional de apicultura, Moscú. Unión de las Repúblicas Socialistas Soviéticas.
38. Kachura, V. Melesko, A. Badiuk, L. Lazareva, L. (1997). Vitalidad de espermatozoides de abejas después de su congelación y conservación en nitrógeno líquido. En Verheyen, R. (presidencia), Simposio llevado a cabo en el 35 Congreso internacional de apicultura, Amberes, Bélgica.
39. Kaftanoglu, O. (1981). Técnica de lavado para recolectar grandes cantidades de espermatozoides en vista de la inseminación instrumental de las reinas. En Stănculescu, G. (trad.). Simposio llevado a cabo en el 28 Congreso internacional de apicultura, Acapulco, México.
40. Kelley, W. (1986). Apicultura lucrativa (3° ed.). Kentucky, Estados Unidos de América: s.e.
41. Kepeña, L. Kopernicky, J. (1973). Efecto del alimento sobre la madurez sexual de los zánganos. En Stănculescu, G. (trad.). Simposio llevado a cabo en el 24 Congreso internacional de apicultura, Buenos Aires, Argentina.
42. Li-Byarlay, H. Hua Huang, M. Simone, M. Strand, M. Tarpy, D. Rueppell, O. (2016). Honey bee (*Apis mellifera*) drones survive oxidative stress due to increased tolerance instead of avoidance or repair of oxidative damage. *Experimental Gerontology*, 83: 15-21
43. Mace, H. (1985). Manual completo de apicultura (2° ed.). Calzada de Tlalpan, México: Continental.
44. Mackensen, O. (c1992). Determinación del sexo. In McGregor, S. (trad.). Apicultura (8° ed.). México: Editorial Limusa.
45. Marín, P. (2016). Efecto de los polisacáridos ficoll y dextrano en el medio de congelación sobre la viabilidad y fecundidad del semen de conejo (Tesis de licenciatura, Universidad Politécnica de Valencia). Recuperada <https://riunet.upv.es/handle/10251/68579?show=full>
46. Martínez, J. Merlo, F. (2014). Importancia de la diversidad de abejas (Hymenoptera: Apoidea) y amenazas que enfrenta en el ecosistema tropical de Yucatán, México. *J Selva Andina Animal Science*, 1(2): 28-34.
47. Mattila, H. Seeley, T. (2007). Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science*, 317: 362-364.

48. Metz, B. Tarpy, D. (2019). Reproductive senescence in drones of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insects*, 10: 11.
49. MINAG (Ministerio de Agricultura). (2010). *Apicultura, buenas prácticas en la producción apícola y gestión en apicultura*. Lima, Perú, s.e.
50. Moritz, R. (1984). The Effect of Different Diluents on the Insemination Success in Honey-bee Using mixed Semen. *Journal of Apicultural Research*, 23:164-167.
51. Moritz, R. (1991). *Manual del apicultor aficionado*. Barcelona, España: Ediciones Martínez Roca S.A.
52. Nates, G. (2011). Genética del comportamiento: abejas como modelo. *Acta Biológica*, 16(3): 213-229.
53. Ordetx, G. Espina, D. (1966). *La apicultura en los trópicos*. México: Imprenta Aldina.
54. Ostiguy, N. Drummond, F. Aronstein, K. Eitzer, B. Ellis, J. Spivak, M. Sheppard, W. (2019). Honey Bee Exposure to Pesticides: A Four-Year Nationwide Study. *Insects*, 10 (13).
55. Padilla, F. Flores, J. Pérez, A. (2007). El comportamiento de apareamiento en las abejas de la miel. *El Colmenar*. 85: 32-40.
56. Paillard, M. Rousseau, A. Giovenazzo, P. Bailey, J. (2017). Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *Journal of Economic Entomology*, 110(4): 1412-1418.
57. Persano, A. (1980). *Apicultura práctica*. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur.
58. Pettis, J. 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).
59. Philippe, J. (1990). *Guía del apicultor*. Madrid, España: Mundi – Prensa.
60. Piana, G. D'albore, G. Isola, A. (1989). *La miel: Alimento de conservación natural, origen – recolección y comercialización*. Madrid, España: Mundi – Prensa.
61. Ravazzi, G. (1995). *Curso de apicultura*. Barcelona, España: De Vecchi.
62. Rhodes, W. (2008). Semen Production in Drone Honeybees. RIRDC 08(130). Recuperado de <https://www.agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/08-130.pdf>
63. Ritter, W. (2001). *Enfermedades de las abejas*. Zaragoza, España: Acribia.
64. Robles, E. Salvachúa, J. (1999). *Alimentación de las abejas: aplicación práctica de los fundamentos fisiológicos de la nutrición*. España: Egido – Almazán.

65. Root, A. (1985). ABC y XYZ de la Apicultura. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio del sur.
66. Rousseau, A. Fournier, V. Giovenazzo, P. (2015). *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. Entomological Society of Canada, 00: 1-10.
67. Ruttner, F. Drescher, W. Fresnaye, J. Mackensen, O. Schneider, H. Tryasko, V. Woyke, J. (1976). Inseminación artificial de las reinas de abejas. México: Apimondia.
68. Salas, R. (2000). Manual de apicultura para el manejo de abejas africanizadas. Programa para el desarrollo de la pequeña y mediana industria apícola en Honduras. Honduras: EAP-Zamorano.
69. SADA (Sociedad Argentina de Apicultores). (1981). Manual de apicultura (5° ed.). Buenos Aires, Argentina: s.e.
70. Sáinz, C. Gómez, C. (2000). Mielles españolas: Características e identificación mediante el análisis del polen. Madrid, España: Mundi – Prensa.
71. Schlüns, H. Schlüns, E. van Praagh, J. Moritz, R. (2003). Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*, 34: 577 – 584.
72. Sirera, A. y Cañas, S. (1996). Aparato de Inseminar y lugar de Trabajo. Apuntes de Apicultura. *Revista Vida Apícola*. 78(1).
73. Socorro, O. Espinar, M. (1998?). Estudio del polen con interés en apiterapia. España: Comares.
74. Solé, M. Boada, M. Coroleu, B. (2009). Criopreservación de gametos y embriones. *In* Bajo, J. Coroleu, B. (eds.). Fundamentos de reproducción. Madrid, España: Médica Panamericana.
75. Standifer, L. (c1992). Nutrición de la abeja melífera. *In* McGregor, S. (trad.) Apicultura (8° ed.). México: Limusa.
76. Stefan, C. (2013). The Applicability of Semen Collection in Drones of *Apis Melifera Carpatica*. *Indian journal of applied research*, 3(7): 630-632.
77. Taber, S. (1977) Cría de abejas planificada. *En* Stănculescu, G. (trad.) simposio llevado a cabo en el 26 Congreso internacional de apicultura, Adelaida, Australia.
78. Tarpy, D., vanEngelsdorp, D. Pettis, J. (2013). Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften*, 100: 723.

79. Taylor, M. Guzmán-Novoa, E. Morfin, N. Buhr, M. (2009). Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72: 149-159.
80. Valega, O. (2007). *Cría de Reinas*. Argentina: apícola Don Guillermo
81. Verma. L. (1976). Efecto de los iones del líquido de la espermateca y del almacenamiento sobre el consumo de oxígeno y la motilidad de los espermatozoides en la abeja mellifera. En Stănculescu, G. (trad.) Simposio llevado a cabo en el 1 Congreso Internacional de Genética, Selección y Reproducción de las Abejas, Moscú, Unión de las Repúblicas Socialistas Soviéticas
82. Von Frisch, K. (1999). *La vida de las abejas*. Argentina: Hemisferio Sur.
83. White, J. (c1992). Composición y propiedades de la miel. *In* McGregor, S. (trad.). *Apicultura* (8° ed.). México: Limusa.
84. Wegener, J. Bienefeld, K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77: 600-607.
85. Wegener, J. May, T. Kamp, G. Bienefeld, K. (2014). A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, 69: 236-242.
86. Weiss, K. (1986). *Práctique de L`élevage en apiculture. Question, et réponses*. Francia: Editions Européennes, apicoles

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Resultado de las colectas de semen

Zánganos capturados	Zánganos que sí eyacularon	%	Volumen (μ l) de semen/capilar	μ l/zángano que sí eyaculó	μ l/zánganos capturados
36	18	50.00	13.35	0.74	0.37
23	11	47.83	6.28	0.57	0.27
45	22	48.89	17.28	0.79	0.38
31	11	35.48	7.07	0.64	0.23
50	29	58.00	24.74	0.85	0.49
64	23	35.94	19.24	0.84	0.30
62	24	38.71	21.76	0.91	0.35
66	35	53.03	21.21	0.61	0.32
29	15	51.72	8.72	0.58	0.30
51	30	58.82	17.28	0.58	0.34
45	25	55.56	14.53	0.58	0.32
39	22	56.41	10.05	0.46	0.26
41	25	60.98	19.95	0.80	0.49
37	25	67.57	14.84	0.59	0.40
48	25	52.08	14.22	0.57	0.30
48	25	52.08	14.14	0.57	0.29
80	25	31.25	12.49	0.50	0.16
31	19	61.29	8.80	0.46	0.28
48	25	52.08	15.87	0.63	0.33
51	20	39.22	14.22	0.71	0.28
31	25	80.65	10.29	0.41	0.33
31	20	64.52	12.57	0.63	0.41
51	29	56.86	13.27	0.46	0.26
38	25	65.79	12.64	0.51	0.33
32	25	78.13	10.84	0.43	0.34
33	25	75.76	10.68	0.43	0.32
50	25	50.00	13.43	0.54	0.27
47	28	59.57	14.92	0.53	0.32
56	25	44.64	15.79	0.63	0.28
48	26	54.17	12.49	0.48	0.26
52	25	48.08	19.01	0.76	0.37
55	37	67.27	30.71	0.83	0.56
71	45	63.38	39.19	0.87	0.55
53	25	47.17	23.48	0.94	0.44
47	25	53.19	21.05	0.84	0.45
37	25	67.57	22.93	0.92	0.62
46	32	69.57	29.30	0.92	0.64
57	30	52.63	23.56	0.79	0.41
72	40	55.56	28.35	0.71	0.39

ANEXO 2: Concentración espermática

n	lado a	lado b	\bar{X}
1	3 120 000	2 652 000	2 886 000 \pm 330 925.97
2	2 946 000	4 008 000	3 477 000 \pm 750 947.40
3	4 254 000	3 950 100	4 102 050 \pm 214 889.75
4	4 830 000	3 840 000	4 335 000 \pm 700 035.71
5	3 762 000	3 852 000	3 807 000 \pm 63 639.61
6	4 284 000	2 970 000	3 627 000 \pm 929 138.31
7	2 982 000	2 844 000	2 913 000 \pm 97 580.74
8	4 626 000	5 430 000	5 028 000 \pm 568 513.85
9	4 404 000	4 068 000	4 236 000 \pm 237 587.88
10	4 254 000	3 516 000	3 885 000 \pm 521 844.80
11	5 676 000	3 726 000	4 701 000 \pm 1 378 858.22
12	4 044 000	3 750 000	3 897 000 \pm 207 889.39

ANEXO 3: Valores observados de motilidad en las muestras en fresco combinadas con DMSO y glicerina en sus respectivos grados de dilución

Capilar	crioprotector y dilución			
	DMSO 1:9	DMSO 1:12	glicerina 1:9	glicerina 1:12
1	4	3	4	4.5
2	4	3.5	4.5	3
3	4	4.5	4	3.5
4	3	2.5	4	4
5	4	3	3.5	4.5
6	3	3.5		3.5
7	2.5	3	3	4
8		4	3.5	4.5
9	3	2	4	4
10	3	3.5	4.5	4
11	4	3	4	3.5
12	4	4	4.5	4.5
13	4	3.5	4.5	4
14	2.5	3	4.5	4
15	3	4	4.5	4
\bar{X}	3.42 \pm 0.62	3.33 \pm 0.65	4.07 \pm 0.47	3.97 \pm 0.44

ANEXO 4: Prueba de normalidad de Kolgomorov – Smirnov, para la motilidad del semen precongelado

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO LOG10 motilidad	Normal(0,1)	0.00	0.01	58	0.43	<0.0001

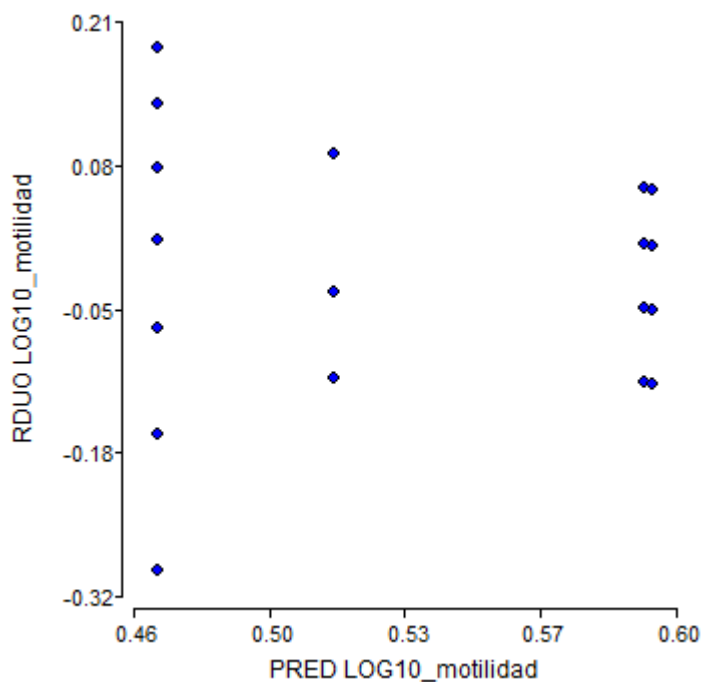
ANEXO 5: Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, para la motilidad del semen precongelado

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS LOG10 motilidad	58	0.1594535	0.1127564	79.0832623

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.0252061	3	0.0084020	3.4146386	0.0237
Crioprotector	0.0221314	1	0.0221314	8.9943460	0.0041
Dilución	0.0000003	1	0.0000003	0.0001230	0.9912
Crioprotector*dilución	0.0025285	1	0.0025285	1.0275999	0.3152
Error	0.1328718	54	0.0024606		
Total	0.1580779	57			

ANEXO 6: Gráfico de dispersión de puntos de la motilidad del semen precongelado



ANEXO 7: Prueba de Friedman para la motilidad precongelmiento de todas las muestras

DMSO 1:9	DMSO 1:12	GLICERINA 1:9	GLICERINA 1:12	T ²	p
2.04	1.73	3.35	2.88	6.80	0.0010

Mínima diferencia significativa entre suma de rangos = 10.668

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
DMSO 1:12	22.50	1.73	13	A
DMSO 1:9	26.50	2.04	13	A B
GLICERINA 1:12	37.50	2.88	13	C
GLICERINA 1:9	43.50	3.35	13	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.050)

ANEXO 8: Prueba de comparación para la motilidad precongelmiento de todas las muestras

Comparaciones	R _i - R _j	ALS(Fr)	Significancia
DMSO 1:9 vs DMSO 1:12	4	10.668	n.s
DMSO 1:9 vs glicerina 1:9	17	10.668	*
DMSO 1:9 vs glicerina 1:12	11	10.668	*
DMSO 1:12 vs glicerina 1:9	21	10.668	*
DMSO 1:12 vs glicerina 1:12	15	10.668	*
glicerina 1:9 vs glicerina 1:12	6	10.668	n.s

El * indica la significancia de la diferencia

ANEXO 9: Valores observados de motilidad en las muestras posdescongelmiento, congeladas a - 20°C

Capilar	Crioprotector y dilución			
	DMSO 1:9	DMSO 1:12	glicerina 1:9	glicerina 1:12
1	2.5	2.5	3	0
2	0.5	2.5	3	2.5
3	2	1.5	0	3
4		1	3.5	3.5
5	0.5	1	0	
\bar{X}	1.38±1.03	1.7±0.76	1.9±1.75	2.25±1.55

ANEXO 10: Valores observados de motilidad en las muestras posdescongelamiento, congeladas a – 40°C

crioprotector y dilución				
Capilar	DMSO 1:9	DMSO 1:12	GLICERINA 1:9	GLICERINA 1:12
1			2	2
2		1	2	2
3		3.5	1.5	1
4	2.5	1	2.5	3
5	0.5	2	0	3
6	3.5	2.5		2.5
7	2	2	3.5	
8		3	1.5	3.5
9	1.5	2.5	2.5	2.5
10	2	3.5	1.5	0.5
\bar{X}	2.00±1.00	2.33±0.94	1.89±0.96	2.22±0.97

ANEXO 11. Prueba de normalidad de Shapiro – Wilks modificado, de la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO LOG10 motilidad	15	0.00	0.21	0.94	0.5704

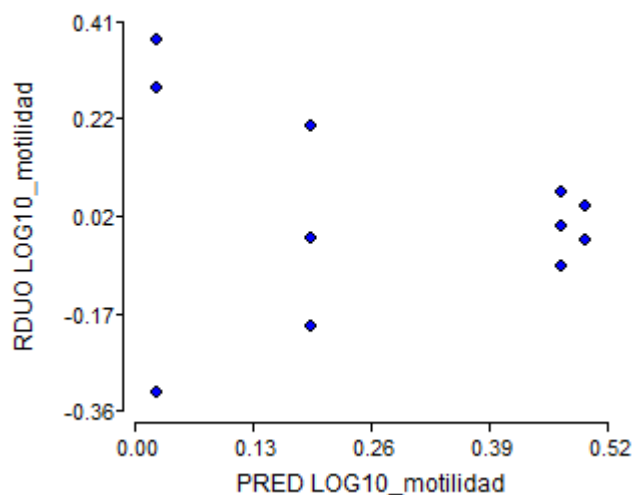
ANEXO 12: Prueba de homogeneidad de varianza de Levene, de la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS LOG10 motilidad	15	0.85	0.81	35.63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.20	3	0.07	20.92	0.0001
Crioprotector	0.15	1	0.15	47.72	<0.0001
Dilución	0.02	1	0.02	5.78	0.0349
Crioprotector*dilución	0.03	1	0.03	9.56	0.0102
Error	0.03	11	3.1E-03		
Total	0.23	14			

ANEXO 13: Gráfico de dispersión de puntos de la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C



ANEXO 14: Prueba de Friedman para la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C

DMSO 1:9	DMSO 1:12	GLICERINA 1:9	GLICERINA 1:12	T ²	p
2.17	2.33	3.00	2.50	0.18	0.9050

Mínima diferencia significativa entre suma de rangos = 8.766

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n
DMSO 1:9	6.50	2.17	3 A
DMSO 1:12	7.00	2.33	3 A
GLICERINA 1:12	7.50	2.50	3 A
GLICERINA 1:9	9.00	3.00	3 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.050)

ANEXO 15: Prueba de normalidad de Shapiro – Wilks modificado, para la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 40°C

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO LOG10 motilidad	32	0.00	0.22	0.89	0.0050

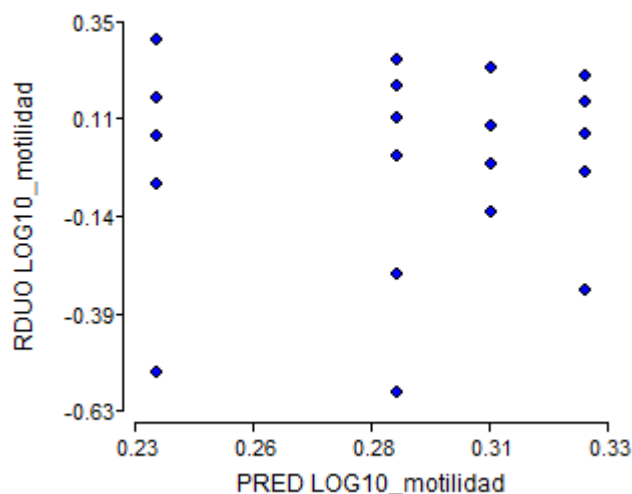
ANEXO 16: Prueba de homogeneidad de varianza de Levene, de la motilidad posdescongelamiento del semen congelado a – 40°C

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS LOG10 motilidad	32	0.07	0.00	88.87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.05	3	0.02	0.73	0.5435
Crioprotector	0.01	1	0.01	0.33	0.5691
Dilución	0.01	1	0.01	0.24	0.6253
Crioprotector*dilución	0.03	1	0.03	1.62	0.2131
Error	0.59	28	0.02		
Total	0.63	31			

ANEXO 17. Gráfico de dispersión de puntos de la motilidad del semen posdescongelado, congelado a – 40°C



ANEXO 18. Prueba de Friedman para la motilidad poscongelamiento del semen, congelado a – 40°C

DMSO 1:9	DMSO 1:12	GLICERINA 1:9	GLICERINA 1:12	T ²	p
2.13	2.75	2.13	3.00	0.47	0.7099

Mínima diferencia significativa entre suma de rangos = 8.295

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n
DMSO 1:9	8.50	2.13	4 A
GLICERINA 1:9	8.50	2.13	4 A
DMSO 1:12	11.00	2.75	4 A
GLICERINA 1:12	12.00	3.00	4 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.050)

ANEXO 19: Valores observados de viabilidad, en porcentaje, de las muestras posdescongelamiento, congeladas a – 20°C

repeticiones	crioprotector y dilución			
	DMSO 1:9	DMSO 1:12	GLICERINA 1:9	GLICERINA 1:12
1	41.84	17.24	34.85	
2	42.40	35.44	47.86	44.46
3	51.38	46.71	7.00	46.25
4		59.89	40.88	39.28
5	45.99	42.42	32.65	
\bar{X}	45.40±4.39	40.34±15.69	32.65±15.51	43.33±3.62

ANEXO 20: Valores observados de viabilidad, en porcentaje, de las muestras posdescongelamiento, congeladas a – 40°C

Capilar	crioprotector y dilución			
	DMSO 1:9	DMSO 1:12	GLICERINA 1:9	GLICERINA 1:12
1			59.98	55.44
2		63.52	58.49	59.73
3		60.01	52.34	51.67
4	62.95	62.73	58.73	59.58
5	57.31	49.36	45.39	59.83
6	43.60	70.00		56.82
7	51.75	59.95	54.40	
8		31.49	38.42	49.12
9	63.04	60.61	52.19	58.18
10	78.48	61.61	43.66	48.10
\bar{X}	59.52±11.85	57.70±11.19	52.62±8.33	55.39±4.64

ANEXO 21: Prueba de comprobación de la normalidad de los residuales de Shapiro-Wilks modificado, de la viabilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Acos viabilidad	17	0.00	0.13	0.88	0.0793

ANEXO 22: Prueba de comparación de la homogeneidad de la varianza de la viabilidad del semen posdescongelado, congelado a – 20°C

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Acos viabilidad	17	0.259	0.088	104.853

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.037	3	0.012	1.513	0.2577
Crioprotector	2.3E-05	1	2.3E-05	0.003	0.9584
Dilución	2.6E-04	1	2.6E-04	0.032	0.8600
Crioprotector*dilución	0.036	1	0.036	4.483	0.0541
Error	0.106	13	0.008		
Total	0.143	16			

ANEXO 23: Cuadro de análisis de varianza de la viabilidad posdescongelamiento, de muestras de semen congeladas a – 20°C

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Acos viabilidad	17	0.173	0.000	16.064

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.056	3	0.019	0.904	0.4659
Crioprotector	0.012	1	0.012	0.599	0.4527
Dilución	0.005	1	0.005	0.232	0.6381
Crioprotector*dilución	0.034	1	0.034	1.631	0.2239
Error	0.269	13	0.021		
Total	0.325	16			

ANEXO 24: Prueba de comprobación de la normalidad de los residuales de Shapiro-Wilks modificado, de la viabilidad del semen posdescongelado, congelado a – 40°C

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Acos viabilidad	33	0.00	0.09	0.95	0.3940

ANEXO 25: Prueba de comparación de la homogeneidad de la varianza de Levene, de la viabilidad del semen posdescongelado, congelado a – 40°C.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Acos viabilidad	33	0.107	0.014	86.319

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.012	3	0.004	1.156	0.3433
Crioprotector	0.007	1	0.007	2.221	0.1469
Dilución	0.003	1	0.003	1.048	0.3145
Crioprotector*dilución	0.001	1	0.001	0.202	0.6568
Error	0.097	29	0.003		
Total	0.108	32			

ANEXO 26. Análisis de varianza de la viabilidad posdescongelamiento de muestras de semen congeladas a – 40°C

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Acos viabilidad	33	0.0802	0.0000	12.9685

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.0223	3	0.0074	0.8429	0.4816
Crioprotector	0.0185	1	0.0185	2.0919	0.1588
Dilución	0.0001	1	0.0001	0.0105	0.9192
Crioprotector*dilución	0.0047	1	0.0047	0.5375	0.4693
Error	0.2558	29	0.0088		
Total	0.2781	32			

