



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA EN Apis mellifera”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

FRANCISCO REYES TORRECILLA

ASESOR:

Dr. Armando Enrique Esperón Sumano

COASESORES:

Dr. Miguel Ángel Carmona Medero

M.A.O. Liborio Carrillo Miranda

M. en C. Crisóforo Mercado Márquez

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos  
comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Morfología espermática en Apis mellifera

que presenta el pasante: Francisco Reyes Torrecilla  
con número de cuenta: 09660774-1 para obtener el título de :  
Médico veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en  
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 4 de Mayo de 2010.

PRESIDENTE Dr. Armando Enrique Esperón Sumano [Signature]

VOCAL MC. César Garzón Pérez [Signature]

SECRETARIO MVZ. Hugo César López Farias [Signature]

PRIMER SUPLENTE MVZ. Alicia Alcantar Rodríguez [Signature]

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Edna Martínez Aguilera [Signature]

## DEDICATORIAS:

### *A Dios*

Por darme la fortaleza necesaria para seguir adelante en todo momento, por permitirme ser mejor cada día y por lograr y alcanzar una de mis mayores metas.

### *A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4*

Estoy agradecido por abrirme las puertas y ser parte fundamental de esta gran institución, por brindarme la maravillosa oportunidad de tener una profesión, orgulloso me siento de ser universitario por siempre “Sangre azul y piel dorada”.

### *A mis padres*

Por su gran apoyo y dedicación y por inculcarme los principios y responsabilidades que me han ayudado para lograr este objetivo importante de mi vida.

### *A mi esposa Reme y mis 2 hijos, Ángel y Francisco*

Quien incondicionalmente han estado conmigo, en este logro ya que también es de ustedes porque son parte de mi vida. Los amo

### *A mi Asesor Dr. A. Enrique Esperón Sumano*

Gracias por su tiempo, apoyo, consejos y por confiar en mi en este trabajo, pero principalmente gracias por su amistad.

### *A mis coasesores Dr. Miguel Ángel Carmona Medero, M. en C. Crisóforo Mercado Márquez, M.A.O. Liborio Carrillo Miranda*

Gracias por su inmenso apoyo, tiempo y dedicación que sin su ayuda no hubiera sido posible concluir este trabajo.

### *A Alejandra Díaz Pascual*

Quien estuvo en todo momento apoyándome en la elaboración de este trabajo de lo cual sin su apoyo esto no hubiera sido posible, gracias por ser quien eres.

### *MVZ. Armando Ramírez*

Quien me ha apoyado en todo momento, gracias por tu amistad

## ÍNDICE

	Páginas
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Objetivos	10
1.2 Justificación	11
2. Ubicación donde se realizo la investigación	12
3. Materiales y métodos	13
3.1 Material biológico	13
3.2 Material para el manejo apícola de campo	13
3.3 Material de laboratorio	13
3.4 Metodología para la obtención de semen	14
3.5 Protocolo de tinciones	14
2.7 Metodología estadística	20
3. Resultados	22
4. Discusión	37
5. Conclusiones	40
6. Bibliografía	41
Anexo 1	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas	
Figura 1.	Zángano mayor de 12 días de edad	2
Figura 2.	Endophallus y sus partes exteriorizadas	3
Figura 3.	Aparato reproductor del macho	4
Figura 4.	Zángano maduro	5
Figura 5.	Zángano inmaduro	5
Figura 6.	Semen de <u>Apis mellifera</u>	7
Figura 7.	Estructura del esperma de <u>Apis mellifera</u>	8
Figura 8.	Núcleo	9
Figura 9.	Esperma de <u>Apis mellifera</u>	9
Figura 10.	Ubicación de la FES Cuautitlán Campo 4	12
Figura 11.	Esquema a escala del interior de la FES Cuautitlán Campo 4	13
Figura 12.	Tinción HE	22
Figura 13.	Tinción HE	23
Figura 14.	Tinción HE	23
Figura 15.	Tinción HE	24
Figura 16.	Tinción HE	24
Figura 17.	Tinción de Giemsa	25
Figura 18.	Tinción de PAS	25
Figura 19.	Tinción de PAS	26
Figura 20.	Tinción de DAPI	26
Figura 21.	Tinción de DAPI	27
Figura 22.	Tinción de DAPI y contraste de fase	27
Figura 23.	Tinción de DAPI y contraste de fase	28
Figura 24.	Tinción de Dipquick	28
Figura 25.	Tinción de Dipquick	29
Figura 26.	Tinción de Dipquick con microscopio de fluorescencia	29
Figura 27.	Tinción de PAS con microscopio de fluorescencia	30
Figura 28.	Tinción de PAS con microscopio de fluorescencia	30
Figura 29.	Tren de tinción Dipquick	31
Figura 30.	Medida espermática de <u>Apis mellifera</u>	31
Figura 31.	Medida del núcleo y acrosoma con el programa Q Capture Pro	32

## ÍNDICE DE CUADROS

	Paginas
Cuadro 1. Estimadores estadísticos que caracterizan cada variable en el primer muestreo	33
Cuadro 2. Estimadores estadísticos que caracterizan cada variable en el segundo muestreo	34
Cuadro 3. Coeficiente de correlación y determinación entre las variables estudiadas en el primer muestreo	35
Cuadro 4. Coeficiente de correlación y determinación entre las variables estudiadas en el segundo muestreo	36

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en la FES Cuautitlán Campo 4 con 12 colmenas tipo jumbo del proyecto PAPIME PE 203605 “Mejoramiento Integral de la Enseñanza Apícola”, de las cuales se obtuvieron 200 zánganos con la finalidad de obtener células espermáticas de Apis mellifera con el objetivo de determinar la morfología celular y obtener la morfometría de los espermatozoides, evaluando las siguientes características: longitud del espermatozoide completo, largo del flagelo, longitud de la cabeza, longitud del acrosoma, largo y ancho del núcleo. Se efectuaron dos muestreos evaluando 100 machos en cada uno. En el primero de ellos se utilizó un microscopio óptico con objetivo 100x midiendo las estructuras con una escala graduada; en el segundo muestreo se utilizó un microscopio de fluorescencia equipado con el programa: “Q Capture Pro” con el cual se obtuvieron las mediciones de cada una de las estructuras espermáticas. Se efectuaron frotis del material seminal fijados con metanol al 50%, procediéndose al lavado y después al proceso de teñido; previamente, se ensayaron diversas tinciones determinando que la tinción Dipquick fue la mejor para observar las estructuras espermáticas. Se determinó una longitud espermática promedio de  $240.95 \pm 13.37 \mu\text{m}$ , la longitud del flagelo fue de  $233.32 \pm 13.31 \mu\text{m}$ , la longitud de cabeza midió  $7.63 \pm 0.80 \mu\text{m}$ , longitud del acrosoma  $3.01 \pm 0.77 \mu\text{m}$ , la longitud del núcleo  $4.62 \pm 0.30 \mu\text{m}$ , el ancho del núcleo  $0.69 \pm 0.10 \mu\text{m}$ .



## 1. INTRODUCCIÓN

Los zánganos tienen la exclusiva misión de producir semen y fecundar a la reina; en la colmena es criado y tolerado sólo durante la época de cría de reinas. Los zánganos permanecen en la colmena hasta el octavo día de vida, sólo entonces inician su vuelo de orientación (Wolfgang, 2001). Hacia los días 9-12 alcanzan su madurez sexual (figura 1), ello dependerá de las condiciones climáticas, así estarán aptos para poder volar hasta los puntos de concentración situados hasta 16 kilómetros de distancia, donde la reina es fecundada en vuelo (Ward, 1992; Schley, 2001; Mendizabal, 2005; Pierre, 2007), muriendo el macho en el momento de la cópula al desprenderse sus estructuras seminales, sin embargo se ha determinado que el promedio de vida de los zánganos es de 50 días (Pierre, 2007; Ward, 1992).

Figura 1. Zángano mayor de 12 días de edad



Fuente: Wolfgang, 2001

Los zánganos tienen la cantidad máxima de células espermáticas hasta los 8 días de edad, pero su esperma en cualquier edad es funcional. La eversión del endophallus y la eyaculación es mejor cuando son mayores de 12 días.

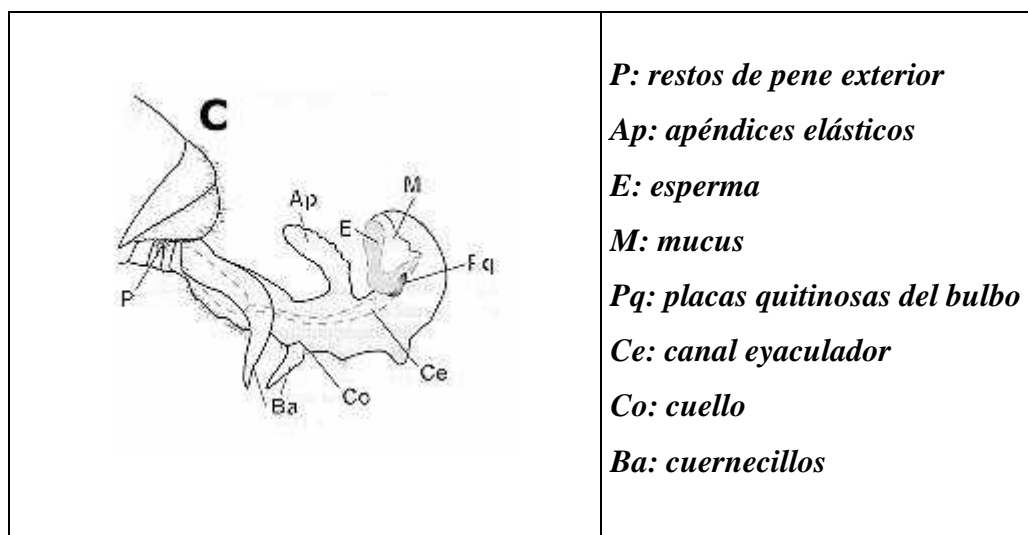
Los zánganos recién nacidos no son maduros desde el punto de vista sexual. Aunque una parte de los espermátocitos se transformaron ya en espermatozoides perfectos, su migración desde los testículos hacia la vesícula seminal acaba de comenzar.

La migración de los espermatozoides comienza a los 2 ó 3 días después de la eclosión. La formación del mucus tiene lugar también después de la eclosión, es por esto que puede provocarse la eversión del endophallus en los zánganos jóvenes, pero sin que estos eyaculen (Ruttner, 1973).

Entre el 8° y 10° día de vida se puede obtener semen de color blanquecino, por lo general mezclado con el mucus aún bastante fluido. Este esperma se coagula enseguida y no sirve para la inseminación. El semen maduro de color crema no mezclado con mucus se puede obtener mediante la eversión artificial, sólo de zánganos de 12 días de edad o mayores (Ruttner, 1973; Mackensen y Tucker, 1989).

En la mayoría de los insectos el aparato reproductor del macho contiene numerosas glándulas accesorias de origen mesodérmico o ectodérmico y se comunican con los conductos deferentes o conducto eyaculador, respectivamente (figura 2). En diferentes grupos de insectos estas glándulas varían considerablemente de tamaño, forma, cantidad y origen embriológico (Lien *et al*, 2005).

Figura 2. Endophallus y sus partes exteriorizadas

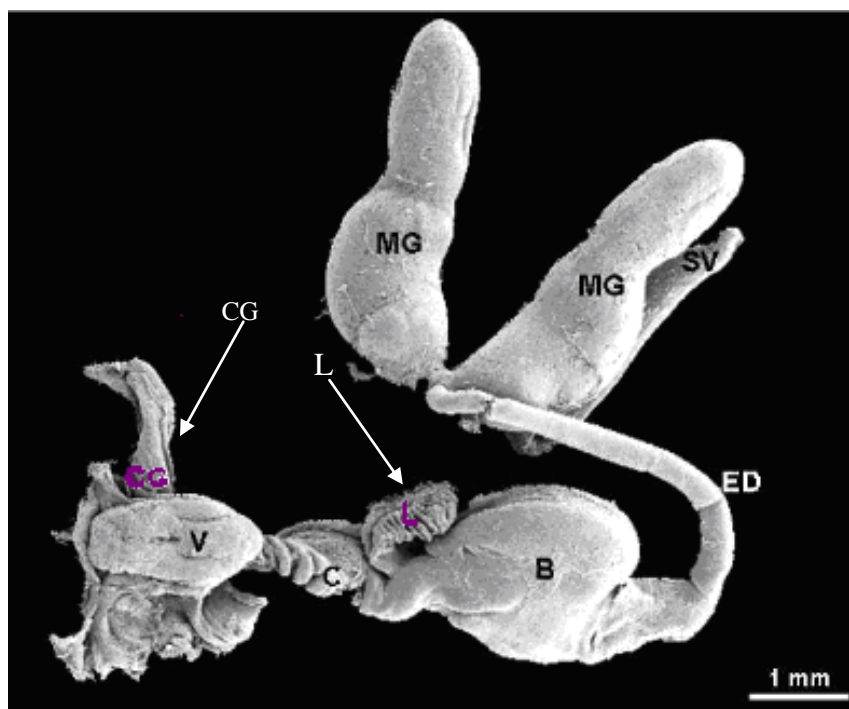


Fuente: Mackensen y Tucker, 1989

### Endophallus:

Es un saco blando membranoso, con varios apéndices y zonas velludas (Figura 3). Está invaginado en el abdomen como el dedo de un guante, siendo casi igual su longitud a la del abdomen del zángano (Martínez, 2004; Valega, 2007). El largo conducto eyaculador liga al endophallus con los testículos y las glándulas mucosas. Debido a su longitud, los órganos de acoplamiento de los zánganos tienen la forma de una “S”: la parte inferior de la “S” está formada por el endophallus, la parte media por el conducto eyaculador y la parte superior por los testículos y las glándulas mucosas.

Figura 3. Aparato reproductor del macho



Fuente: Lien *et al*, 2005

MG: glándula mucosa; SV: vesícula seminal; B: bulbo; C: cervix; L: lóbulo; CG: glándula cornual;  
V: vestíbulo; ED: ducto eyaculador, testículos y ducto deferente son removidos

El endophallus se puede ver mejor cuando está completamente fuera del abdomen, situación que se puede obtener empujando ligeramente el tórax de un zángano maduro. La porción más ancha del endophallus es la base (vestíbulo), de donde salen dos cuernos que en el zángano maduro son observados de color naranja intenso (figura 4) y en el zángano

inmaduro son observados de color transparente (figura 5) (Valega 2007). Estas carúnculas permiten mantener abierta la vagina de la reina durante el acoplamiento (López, 1986). El endophallus en eversión es transparente y está lleno de aire y hemolinfa. En su interior se puede observar el conducto eyaculador (Valega, 2007).

Figura 4. Zángano maduro



Fuente: Valega, 2007

Figura 5. Zángano inmaduro



Fuente: Valega, 2007

### **Testículos:**

Son órganos pares, ovalados, de color crema, situados muy anteriormente en el abdomen, a una parte y otra del intestino. Son cuerpos blandos, esponjosos de 5 a 6 milímetros de longitud en el zángano recién nacido; se componen de cerca de 200 testiolos (tubos espermáticos) en los cuales se desarrollan los espermatogonios (Ruttner, 1973).

Cada testículo de Apis mellifera tiene una túnica exterior dentro, donde hay numerosos túbulos al final de los tubos deferentes, mientras que Apis meliponini solamente tiene cuatro túbulos pequeños y relativamente gruesos.

Dentro de los túbulos las celdas son organizadas en quistes, envueltas en una pared fina, que parecen llevar las funciones de secreción y servir de soporte (Da Crux-Landim *et al*, 1980).

### **Vaso deferente:**

Sigue un trayecto en forma de “S”, es elástico y de color blanco brillante, está formado por una musculatura muy fuerte, en su porción mediana el vaso deferente se ensancha formando la vesícula seminal en forma de botella.

**Vesícula seminal:**

Es el lugar donde los espermatozoides complementan su estado de maduración y permanecen almacenados hasta el momento del acoplamiento (Ruttner, 1973). Están conectadas con dos grandes glándulas mucosas que se unen para formar al conducto eyaculador, que se comunica con el pene o endophallus (Martínez, 2004).

En la vesícula seminal de un adulto se puede observar que el epitelio está muy plegado internamente. En los animales jóvenes los pliegues son aun más cerrados debido a la falta de espermatozoides. Las células son largas y muy angostas, por lo tanto, los núcleos son alargados, atestados y movidos en diferentes niveles por lo que se observa un epitelio de tipo pseudoestratificado. En los adultos los espermatozoides están distendidos por las paredes del lumen y empujan las celdas contra la membrana basal.

Las células epiteliales de las vesículas seminales son muy altas, en forma columnar, casi filiformes. En las pupas el promedio es de 30  $\mu\text{m}$  de alto y 2.5-3  $\mu\text{m}$  de ancho; en los adultos 20  $\mu\text{m}$  de alto y 3-5.4  $\mu\text{m}$  de ancho. Destaca el largo del lumen formando la membrana apical, las microvellosidades son más largas (1-1.5  $\mu\text{m}$ ) la mayor cantidad se forma en el estado de pupa (Da Crux-Landim *et al*, 1969).

**Glándulas mucosas:**

Son órganos pares, situados en el segmento inferior del vaso deferente, están unidas en la parte posterior formando un cuerpo en forma de “U”, siendo la parte mayor y más evidente de todo el aparato genital del zángano. Está formada por una musculatura fuerte, de 2 ó 3 capas. Hacia el lumen hay una capa de células epiteliales con función secretora, estas segregan una sustancia mucosa que al contacto con el aire se solidifica, este moco es producido durante los primeros 7 días de vida como insecto adulto. Tiene como función empujar al semen a través del conducto eyaculador (Chavacan, 2006).

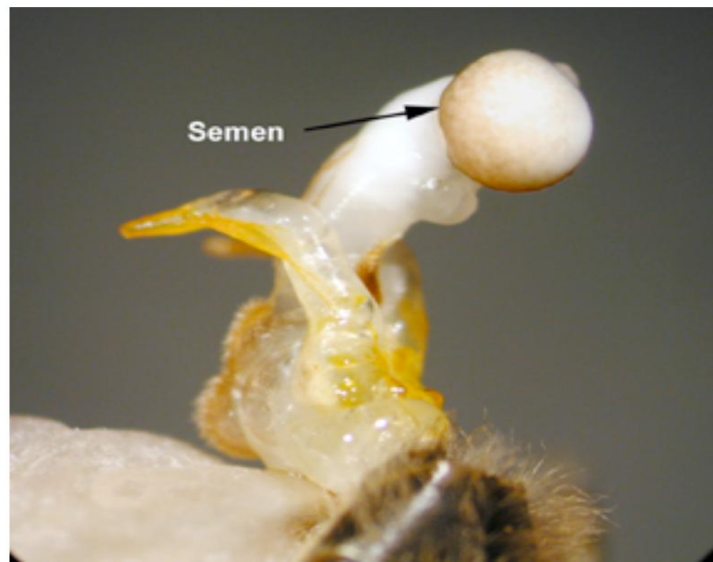
**Esperma:**

Está formado de dos componentes según su procedencia:

- a) Los espermatozoides procedentes de los testículos, los cuales son filamentos de 250  $\mu\text{m}$ , que en estado vivo tiene movimientos serpenteantes. Los espermatozoides muertos se enrollan juntos formando pequeños grupos. El eyaculado se divide en dos fracciones: fluidos de glándulas y células espermáticas, en una relación desde 1:1, hasta 1:2.
- b) Los espermatozoides procedentes de la vesícula seminal y del endophallus se pueden diferenciar del mucus por su color amarillento y por su viscosidad (figura 6).

Están dispuestos en grupos; cuanto más elevado es el contenido de espermatozoides, más intenso será el color y mayor la viscosidad (Ruttner, 1973).

Figura 6. Semen de Apis mellifera

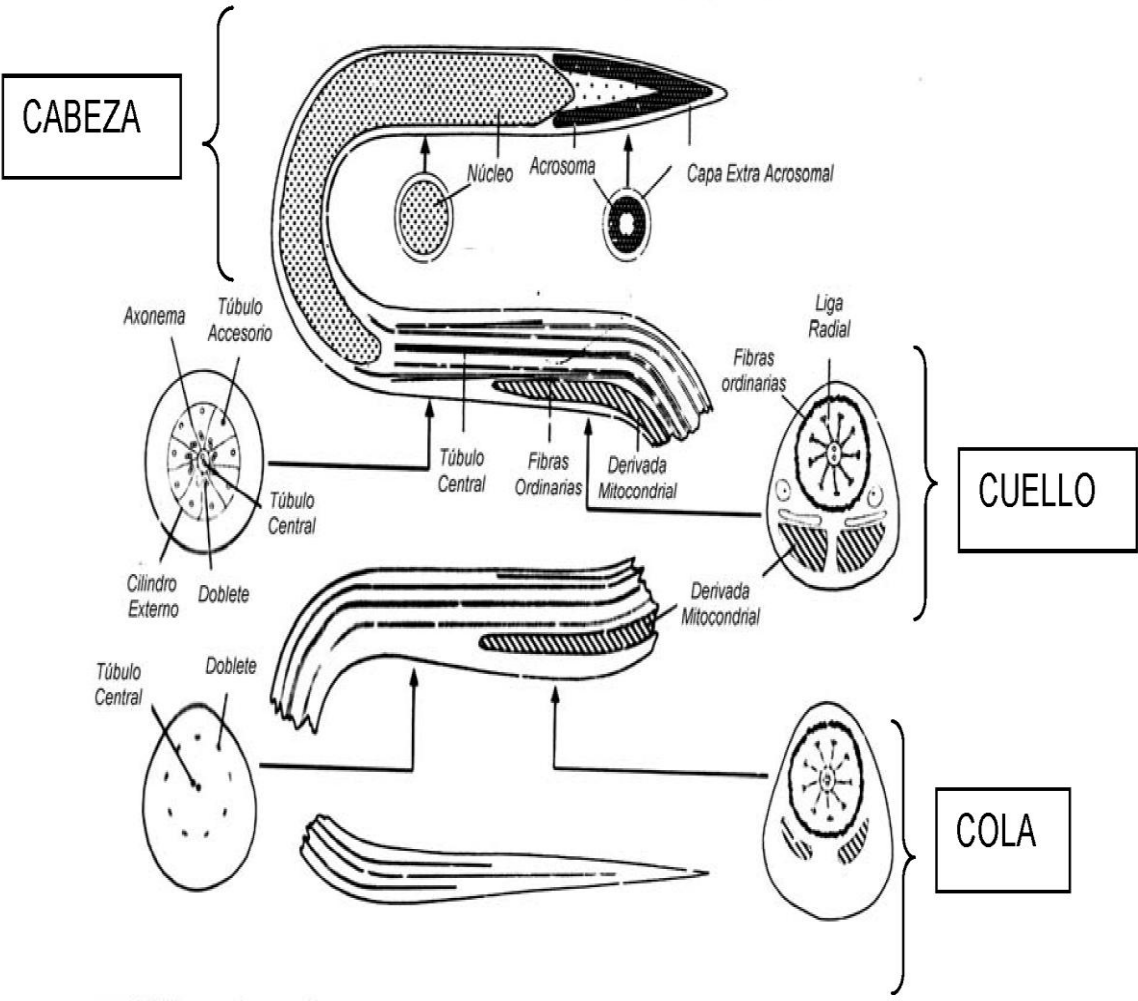


Fuente: Ruttner, 1973

La cabeza del espermatozoide es una estructura elongada, asimétrica y está compuesta por el acrosoma o perforatorium y el núcleo. El acrosoma forma el complejo acrosomal, en su extremo apical se encuentra una estructura en forma de túbulo la cual es el apéndice acicular; posterior a éste, el complejo acrosomal comienza a diferenciarse en una región esférica y alargada.

El acrosoma mide 1  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.25  $\mu\text{m}$  de ancho éste se amplia en su parte posterior y forma la galea. Posteriormente la forma de la cabeza comienza a tornarse ovalada para formar el núcleo (figura 7) (Chavacan, 2006).

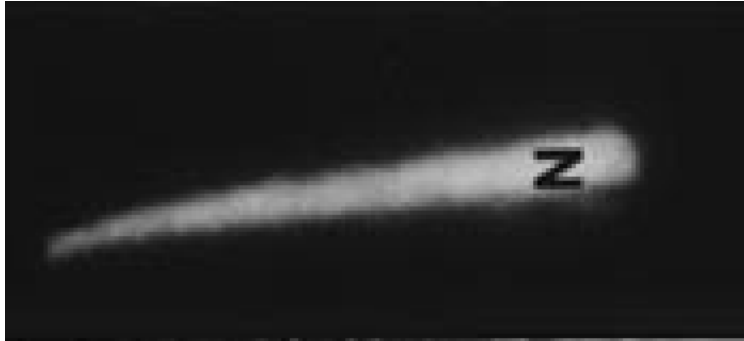
Figura 7. Estructura del espermatozoide de *Apis mellifera*



Fuente: Chavacan, 2006

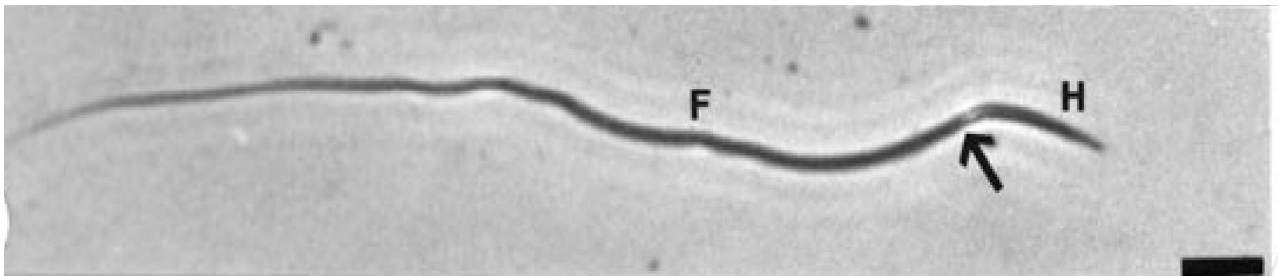
El núcleo es grande de forma esférica u ovoide, dependiendo de la edad (figuras 8 y 9). Generalmente tiende a ser esférico en adultos (Da Crux-Landim *et al*, 1969). En la parte posterior del núcleo se forma una región entre la cabeza y la cola a la cual se le denomina cuello (Chavacan, 2006).

Figura 8. Núcleo



Fuente: Da Crux-Landim *et al*, 1969

Figura 9. Esperma de *Apis mellifera*, la flecha indica donde empieza el núcleo



**H:** núcleo; **F:** flagelo

Fuente: Da Crux-Landim *et al*, 1969



## 1.1 OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

- Caracterizar las estructuras que integran al esperma de Apis mellifera

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Identificar las estructuras citológicas del esperma de Apis mellifera utilizando microscopía óptica.
- Evaluar diferentes métodos de tinción para los espermatozoides de Apis mellifera, seleccionando el más apropiado para la observación de las estructuras que integran al esperma.
- Obtener los estimadores estadísticos que caracterizan las siguientes estructuras espermáticas: longitud del esperma completo, largo del flagelo, longitud de la cabeza, longitud del acrosoma, largo y ancho del núcleo.

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

En México no se han efectuado investigaciones relativas a la morfología espermática de Apis mellifera por lo que este estudio pretende dar a conocer mediante microfotografía óptica las características morfológicas y morfométricas de los espermatozoides de los zánganos y que ello sirva de base para futuros trabajos de investigación.

## 2. UBICACIÓN DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se efectuó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, ubicado en el municipio de Cuautitlán Izcallí, Estado de México, en el Laboratorio de Reproducción Animal, y en el Centro de Enseñanza Agropecuaria (Figuras: 10 y 11).

El municipio de Cuautitlán Izcallí tiene una extensión territorial de 109.9 km<sup>2</sup> por lo que representa el 0.5% de la superficie del estado. La orografía consiste en lomeríos suaves localizados al norte, centro y este que ocupan el 66.66% y llanuras con lomeríos al sur y oeste que abarcan el resto del territorio municipal. El clima es templado subhúmedo, la temperatura media anual asciende a 15.6° C media mensual, el promedio anual de la precipitación pluvial es de 677.38 mm., en el mes mas lluvioso julio con 136.24 mm., y el más seco es enero con 5.73 mm.

([www.es.wikipedia.org/.../Cuautitlán\\_\(Estado\\_de\\_México\)\)](http://www.es.wikipedia.org/.../Cuautitlán_(Estado_de_México))))

Figura 10. Ubicación de la FES Cuautitlán Campo 4



Fuente: Google Earth

Figura 11. Esquema a escala del interior de la FES-Cuautitlán Campo 4



Fuente: <http://www.cuautitlan.unam.mx/ubicacion.php>

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 *Material biológico:*

Se utilizaron 12 colmenas tipo jumbo del proyecto PAPIME PE 203605 “Mejoramiento Integral de la Enseñanza Apícola”, de las cuales se obtuvieron 100 zánganos maduros tanto en el primer y el segundo muestreo, extrayendo de ellos el material seminal.

#### 3.2 *Material para el manejo apícola de campo:*

Equipo de protección: overol, chamarra de velo apícola, guantes, botas, gorra, ahumador, cuña, jaulas para zánganos.

#### 3.3 *Material de laboratorio:*

Microscopio óptico, microscopio de fluorescencia, cubreobjetos, portaobjetos, colorantes, alcohol metílico, citrato de sodio, agua bidestilada desionizada, jeringa, capilares de vidrio, toallas de papel, canastilla de tinción, micro pipeta Gilson, puntas para micro pipetas Gilson (200mcl).

### **3.4 Metodología para la obtención de semen**

Se capturaron 100 zánganos maduros en cada uno de los dos muestreos, de los cuales se obtuvo el material seminal efectuando frotis del mismo; para la eyaculación y eversión del endophallus se toma al zángano con los dedos pulgar e índice de la mano izquierda ejerciéndose una presión ascendente hacia la cabeza y la porción anterior del tórax, una vez producida la eversión parcial del endophallus se sigue apretando el abdomen y la base del endophallus hasta exponerlo completamente y empieza a salir el líquido seminal. Para la toma del semen se succiona con un tubo capilar diluyéndose en una proporción 1:1 con agua bidestilada; para evitar la deshidratación del tejido celular se coloca un tapón de petrolatum en ambos extremos del tubo (Schley P, 2001).

### **3.5 Protocolo de tinciones**

Se evaluaron cinco tinciones con la finalidad de elegir aquella que permitiera la mejor observación de los espermatozoides. Las tinciones utilizadas y el protocolo de las mismas fueron las siguientes:

#### **1) TINCIÓN DE PAS**

Fijación metanol absoluto al 25, 50, 75%

Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Modificación del procedimiento de Mc Manus de AFIP

Solución ácido peryódico al 0.5%

Ácido peryodico \_\_\_\_\_ 0.5g

Agua destilada \_\_\_\_\_ 100ml

Solución de ácido clorhídrico 1N

Ácido clorhídrico g.esp.1.19 \_\_\_\_\_ 83.5ml

Agua destilada \_\_\_\_\_ 916.5ml

Reactivo Schiff de Coleman

Fuisina básica \_\_\_\_\_ 1.0g

Agua destilada 60°C \_\_\_\_\_ 200ml

Llevarlo a punto de ebullición

Dejarlo enfriar y luego agregar

Metabisulfito de potasio \_\_\_\_\_2g

Ácido clorhídrico 1N \_\_\_\_\_10ml

Dejarlo aclarar durante 24 hrs y luego agregar carbón activado \_\_\_\_\_0.5grs

Agitar durante un minuto, luego filtrarlo a través de papel filtro grueso.

Repetir la filtración hasta que la solución aparezca incolora, mantenerlo en refrigeración.

Solución de hematoxilina de mayer (c.9) o Solución de hematoxilina de harris (c.9)

### PROCEDIMIENTO

- 1) Hidratar hasta llegar al agua destilada.
- 2) Oxidar en la solución de ácido peryódico durante 5 minutos.
- 3) Enjuagar en agua destilada.
- 4) Colocar en el reactivo de Schiff de Coleman durante 15 minutos.
- 5) Lavar con agua corriente tibia durante 10 minutos.
- 6) Contrastar con la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 minutos o la solución de hematoxilina de Harris durante 6 minutos.
- 7) Lavar con agua corriente tibia durante 15 minutos.
- 8) Deshidratar y aclarar a través del alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y Xileno, dos cambios, dos minutos cada uno.
- 9) Montar con un medio resinoso.
- 10) Montar en alcohol ácido y deshidratar

### RESULTADO DE LA REACCIÓN:

Glucógeno, mucina y algunas membranas basales \_\_\_\_\_ de rojo a púrpura

Hongos \_\_\_\_\_ de rojo a púrpura

Núcleos \_\_\_\_\_ azul

Glicoproteínas \_\_\_\_\_ rosa

Nota: La muestra control que debe considerarse en el reactivo de Schiff no lleva un tiempo específico ya que puede transcurrir 15 minutos o mas y esta muestra control se tiñe de rosa, de esta forma se determina que el reactivo funciona correctamente en la muestra en cuestión. (Bob Mills *et al*, 1995)

2) **MÉTODO DE HEMATOXILINA-EOSINA** (hematoxilina de Harris-eosina alcohólica)

- 1) Material biológico fijado con metanol 25%, 50% y 75%
- 2) Hidratar la muestra hasta llegar al agua destilada
- 3) Teñir con hematoxilina de Harris de 1-3 minutos
- 4) Lavar con agua corriente
- 5) Lavar con agua destilada para detener el viraje
- 6) Deshidratar con alcoholes de 50° y 70°, por tres minutos en cada uno
- 7) Teñir con eosina alcohólica de 1-3 minutos
- 8) Deshidratar con alcoholes de 96° (2 cambios) y absoluto durante 5 minutos en cada alcohol
- 9) Cubrir con bálsamo de Canadá o resina

**PREPARACIÓN DEL COLORANTE**

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina (Merck) \_\_\_\_\_ 1.0g

Oxido rojo de mercurio \_\_\_\_\_ 0.5g

Sulfato de aluminio y

Amonio o potasio (alumbre) \_\_\_\_\_ 20g

Alcohol etílico absoluto \_\_\_\_\_ 10cc

Agua destilada \_\_\_\_\_ 200cc

Disolver la hematoxilina en alcohol absoluto, calentando al baño maría y tapando; en otro recipiente disolver el alumbre en 100cc de agua destilada; se mezclan las dos soluciones y se añaden los 100cc del agua restante. Se hierve la mezcla lo más rápido posible, y se agrega cuidadosamente el óxido rojo de mercurio (puede explotar) hasta que tome un color rojo púrpura; en seguida se enfría con hielo a baño maría y se filtra 10 veces. Se le agregan de 3 a 5 gotas de ácido acético por cada 10cc de solución.

Nota: Debe filtrarse cada vez que se vaya a usar y debe guardarse en frasco ámbar

Eosina alcohólica

Eosina azulosa \_\_\_\_\_ 1.0g

Orange G \_\_\_\_\_ 1.0g

Alcohol de 70° \_\_\_\_\_ 100cc

Se mezcla todo en frío y se filtra. No debe prepararse demasiado porque las soluciones de mucho tiempo se alteran. Filtrar cada vez que se use.

Nota: El método combinado de hematoxilina-eosina puede hacerse también utilizando otros tipos de hematoxilina, como la Ehrlich, de Delafield, etc; variando el tiempo de teñido o la dilución del colorante para que el teñido sea más lento y controlable, mediante pruebas. Si la coloración de la hematoxilina es excesiva puede rebajarse con alcohol o agua acidulada (unas gotas de ácido clorhídrico en 100cc de agua destilada o alcohol de 96°) y enjuagar abundantemente en agua una vez obtenida la coloración deseada.

La eosina puede ser alcohólica o acuosa (se prepara de la misma manera, sustituyendo el alcohol por agua destilada). Cuando se utiliza la eosina acuosa se elimina el paso 6 y el paso 8. Se deshidrata desde alcoholes 50, 70°.

#### RESULTADO DE LA REACCIÓN:

Núcleos \_\_\_\_\_ azul a morado

Citoplasma \_\_\_\_\_ rosa a rojo

(Elvira E *et al*, 1982).

### 3) MÉTODO COLORACIÓN DE NÚCLEOS CON DAPI

1. Fijar las células en paraformaldehído 4% en PBS por 5 minutos.
2. Lavar con PBS dos veces.
3. Permeabilizar con tritón X-100 (0.5% en PBS) por 5 minutos.
4. Lavar con PBS dos veces.
5. Bloquear con albúmina sérica bovina (1% en PBS) por 20 minutos.
6. Lavar con PBS dos veces.
7. Lavar con PBS, dos veces y una vez con agua bidestilada (lavado final).
8. Montar con solución de montaje Ultra Cruz TM For Fluorescent with DAPI (Santa Cruz Biotechnology).
9. Cubrir con un cubreobjetos.



10. Sellar los bordes con barniz de uñas.
11. Dejar secar por 5 minutos en oscuridad.
12. Observar al microscopio de fluorescencia.

(Bob Mills *et al*, 1995; Elvira E *et al*, 1982).

#### 4) TINCIÓN DE GIEMSA

1. Fijar los frotis en alcohol metílico, durante 5 minutos.
2. Cubrir los frotis con la solución de Wright, de 1 a 3 minutos.
3. Agregar agua destilada con una solución amortiguadora de fosfato a pH 6.5, durante 10 minutos. Esto se hace para diluir el colorante, es recomendable añadir 2cc por cada frotis.
4. Lavar con agua destilada o con solución buffer, hasta que los frotis tomen un color rosa. En caso de que los resultados no sean buenos volver a empezar la tinción con el colorante, o con el colorante diluido, según la intensidad de color que se quiera dar.
5. Secar al aire o deshidratar si se prefiere
6. Cubrir con bálsamo de Canadá o con resina o también dejarlo sin cubrir.

#### RESULTADOS

Eritrocitos \_\_\_\_\_ rojo amarillento

Neutrófilos:

Núcleo\_\_\_\_\_rojo oscuro

Gránulos \_\_\_\_\_lila

Citoplasma\_\_\_\_\_rosa pálido

Eosinofilos:

Núcleo\_\_\_\_\_rojo oscuro

Gránulos\_\_\_\_\_rojo

Citoplasma\_\_\_\_\_rosa pálido

Basofilos:

Núcleo\_\_\_\_\_púrpura o azul oscuro

Gránulos\_\_\_\_\_púrpura oscuro o negros

Linfocitos:

Núcleo\_\_\_\_\_púrpura oscuro

Citoplasma\_\_\_\_\_azul cielo

Monolitos:

Núcleo\_\_\_\_\_ azul

Citoplasma\_\_\_\_\_ azul cielo

Plaquetas\_\_\_\_\_ violeta o púrpura

Preparación del colorante

Colorante Wright:

Wright en polvo\_\_\_\_\_ 0.3g

Fosfato de Sodio\_\_\_\_\_ 1.8g

Fosfato de Potasio monobásico\_\_\_\_\_ 1.2g

Metanol\_\_\_\_\_ 100cc

(Bob Mills *et al*, 1995; Elvira E *et al*, 1982).

## 5) TINCIÓN DE DIPQUICK

La solución consta de una solución fijadora y dos soluciones colorantes amortiguadores, cuyos componentes dan por resultado una tinción clásica de tipo Romanowsky que permite diferenciar la célula espermática en 15 segundos.

Esta solución también puede ser utilizada para teñir células que por su morfología y composición fisicoquímicas, necesitan dos colorantes de contraste para poder identificar las diferentes estructuras celulares y así reconocer procesos patológicos. Los tres frascos permiten la inmersión directa de los portaobjetos.

REACTIVOS:

Solución fijadora\_\_\_\_\_ 1 x 100ml

Hemocolorante 1\_\_\_\_\_ 1 x 100ml

(Reactivo de coloración rojo)

Hemocolorante 2\_\_\_\_\_ 1 x 100ml

(Reactivo de coloración azul)

## PROCEDIMIENTO:

1. Hacer un frotis de células espermáticas y secarlo al aire.
2. Sumergir el frotis en la solución fijadora 5 veces durante un segundo cada vez, dejar escurrir el excedente.
3. Sumergir el frotis en el hemocolorante uno, 5 veces durante un segundo cada vez, dejar escurrir el excedente.
4. Sumergir el frotis en el hemocolorante dos, 5 veces durante un segundo cada vez, dejar escurrir el excedente.
5. Lavar con agua destilada y dejar secar.
6. Observar al microscopio.

(Gradwohl & Jarett, 1986).

En base a la observación de las estructuras espermáticas se determinó que el colorante que mejor las tiñe fue el de Dipquick.

En el primer muestreo se utilizó un microscopio óptico con un objetivo 100x evaluándose las siguientes características: longitud del esperma completo, largo del flagelo, longitud de cabeza, longitud del acrosoma, largo y ancho del núcleo.

En el segundo muestreo se utilizó un microscopio de fluorescencia equipado con el programa: “Q Capture Pro” con el cual se obtuvieron las mediciones de cada una de las estructuras espermáticas.

### **3.6 Metodología estadística.**

En el apiario se efectuó un muestreo aleatorio simple para coleccionar los zánganos maduros de las 20 colmenas, coleccionándolos en la entrada de la colmena; el semen extraído de ellos se mezcló para efectuar las diluciones correspondientes con la tinción Dipquick, haciendo 80 frotis en cada muestreo, en los cuales se midieron 100 espermatozoides que representan un muestreo aleatorio de los gametos.

Cada variable se caracterizó de acuerdo a los siguientes estimadores estadísticos: media, desviación estándar, coeficiente de variación, error estándar, intervalo de confianza y límites de confianza superior e inferior. (Carmona, 2002).

Para obtener los límites de confianza se utilizó la siguiente expresión:

$$\bar{X} + Z_{\alpha/2} (S/\sqrt{n}) > \mu > \bar{X} - Z_{\alpha/2} (S/\sqrt{n})$$

Donde:

$\bar{X}$  = representa la media de la muestra

$Z = 1.96$

$\alpha/2 = 0.05$

$(S/\sqrt{n})$  = error estándar de la media

$\mu$  = representa la media poblacional

Se obtuvo el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación entre las variables estudiadas. (Wayne, 2002)

#### 4. RESULTADOS

De todas las tinciones efectuadas para observar las estructuras espermáticas la que mejor permitió su visualización fue la de Dipquick; por lo que ésta se utilizó en ambos muestreos. En las fotografías siguientes se muestra las estructuras espermáticas tal y como se visualizaron con las diversas tinciones utilizadas.

- En las figuras 12-16 se muestran microfotografías con la tinción de HE.

Figura 12. Tinción HE

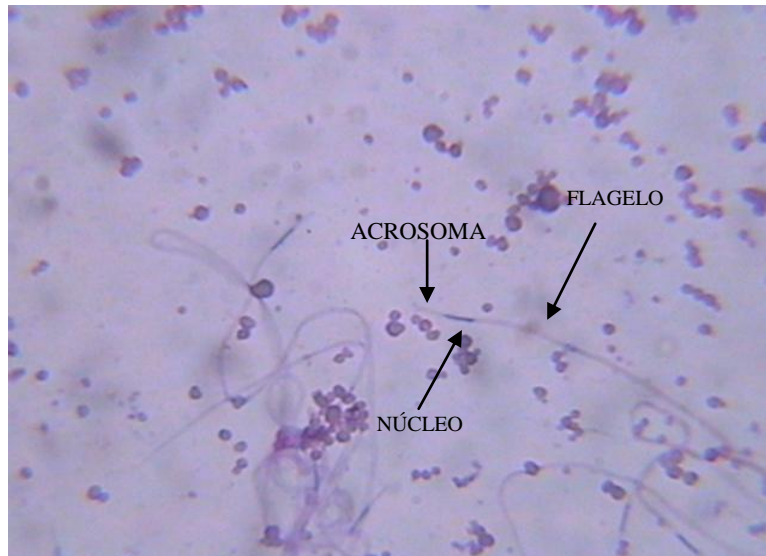


Figura 13. Tinción HE

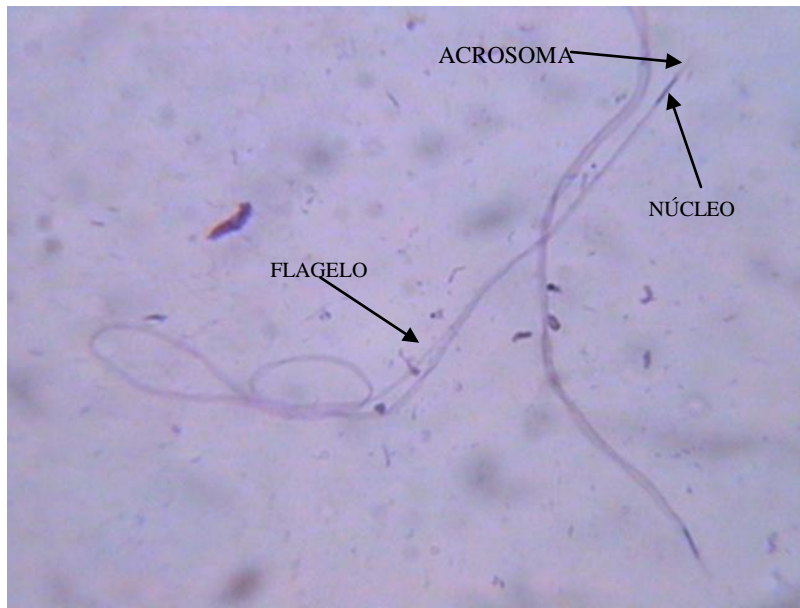


Figura 14. Tinción HE

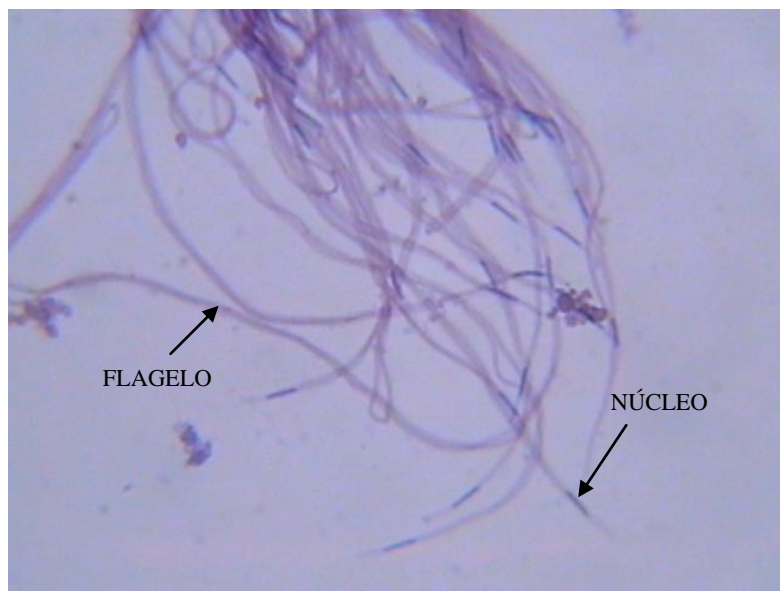


Figura 15. Tinción HE

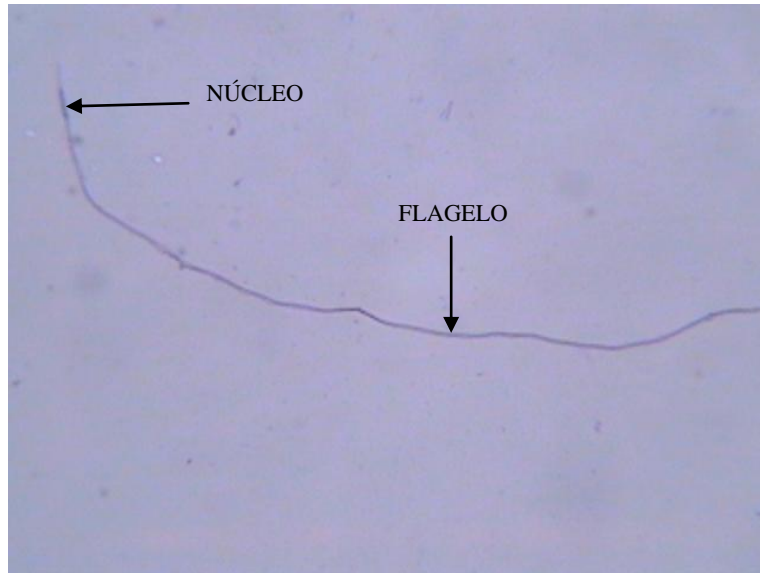
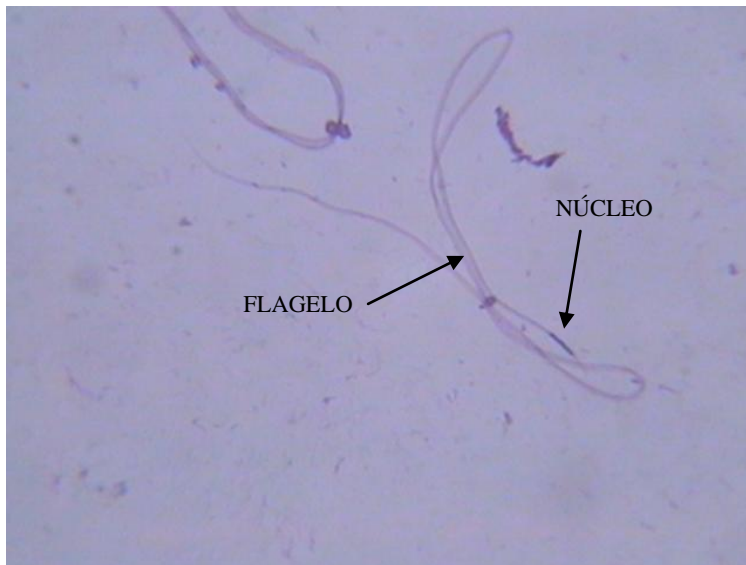
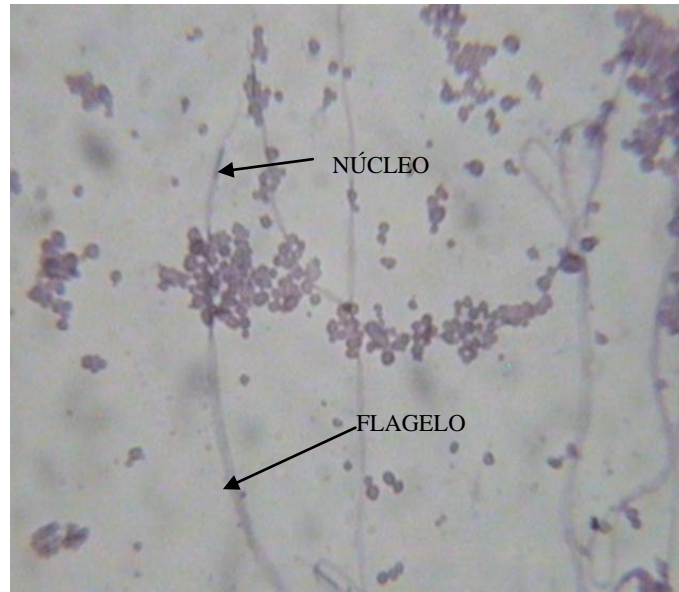


Figura 16. Tinción HE



- En la Figura 17 se muestra microfotografía con tinción de Giemsa.

Figura 17. Tinción de GIEMSA



- En las Figuras 18–19 se muestran microfotografías con tinción de PAS.

Figura 18. Tinción de PAS

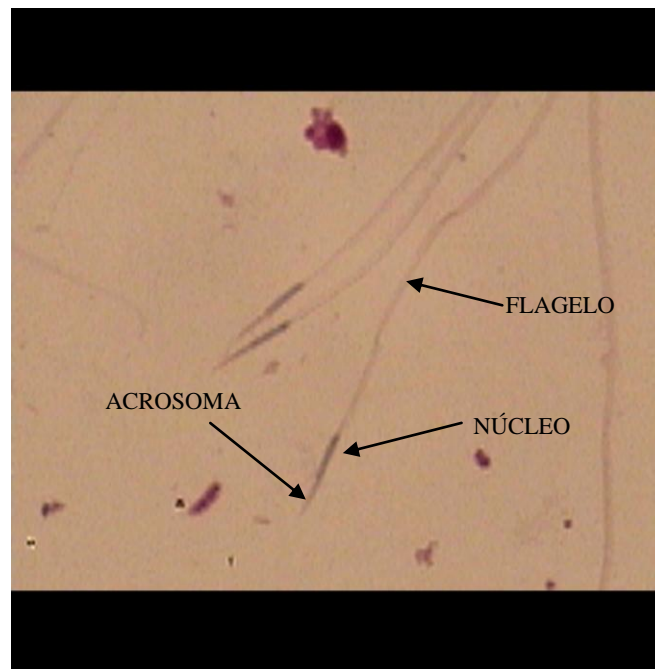
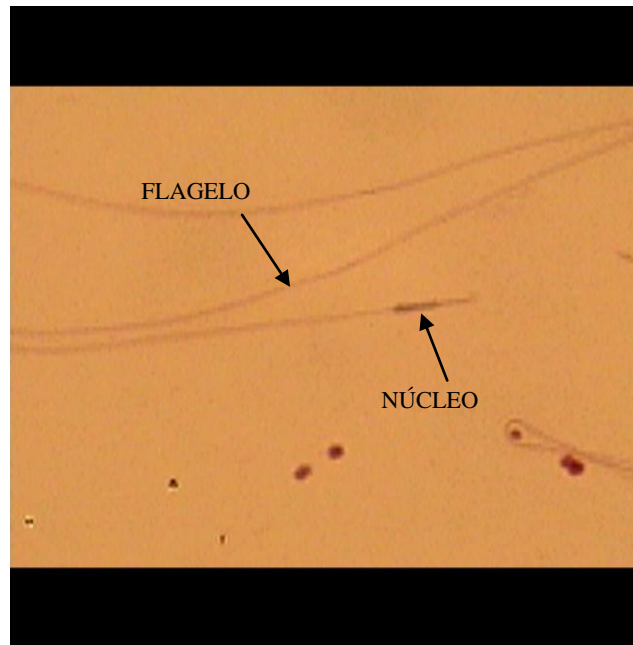




Figura 19. Tinción de PAS



- En las Figuras 20-21 se muestran microfotografías con tinción de DAPI.

Figura 20. Tinción de DAPI

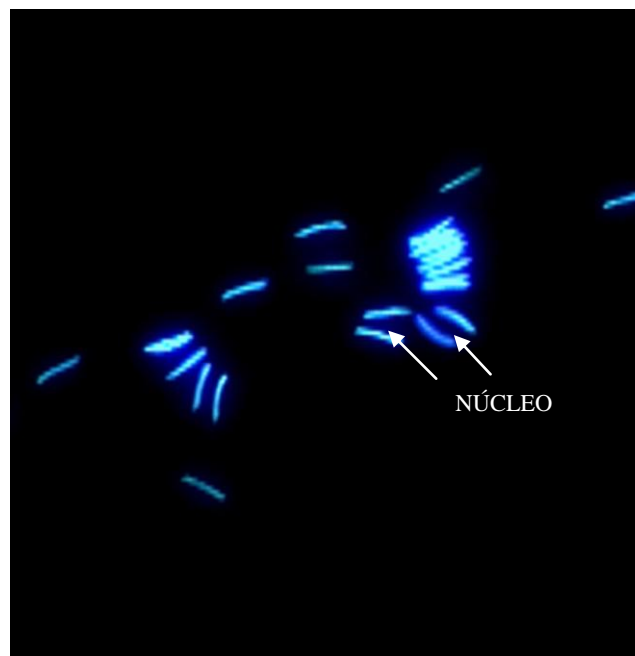
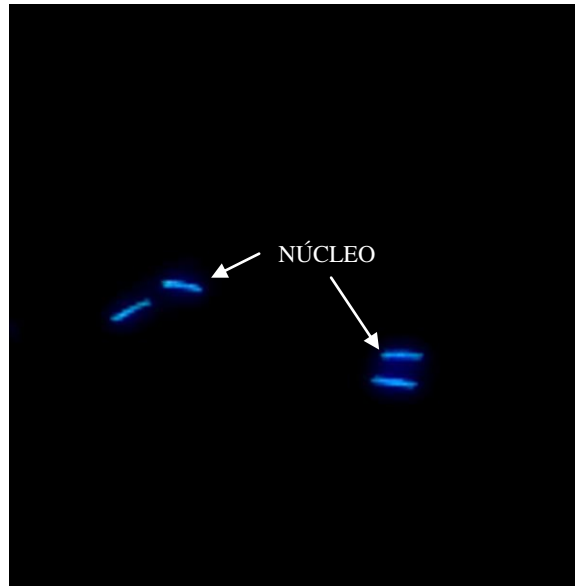


Figura 21. Tinción de DAPI



- En las Figuras 22–23 se muestran microfotografías con tinción de DAPI y Contraste de fase.

Figura 22. Tinción de DAPI y Contraste de fase

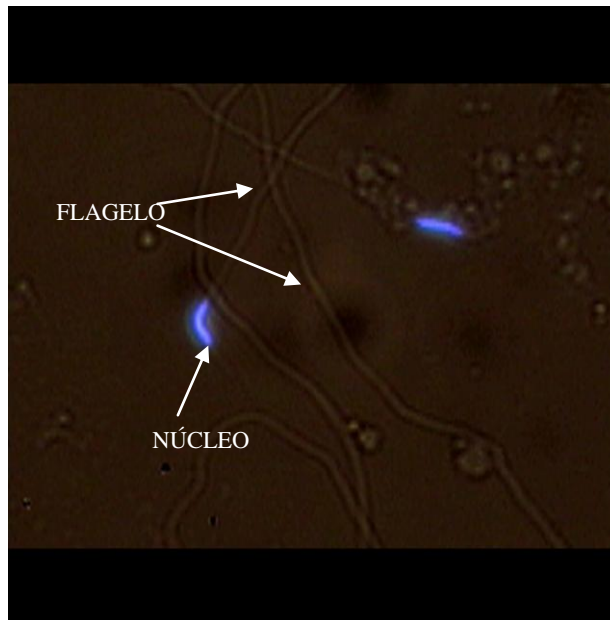
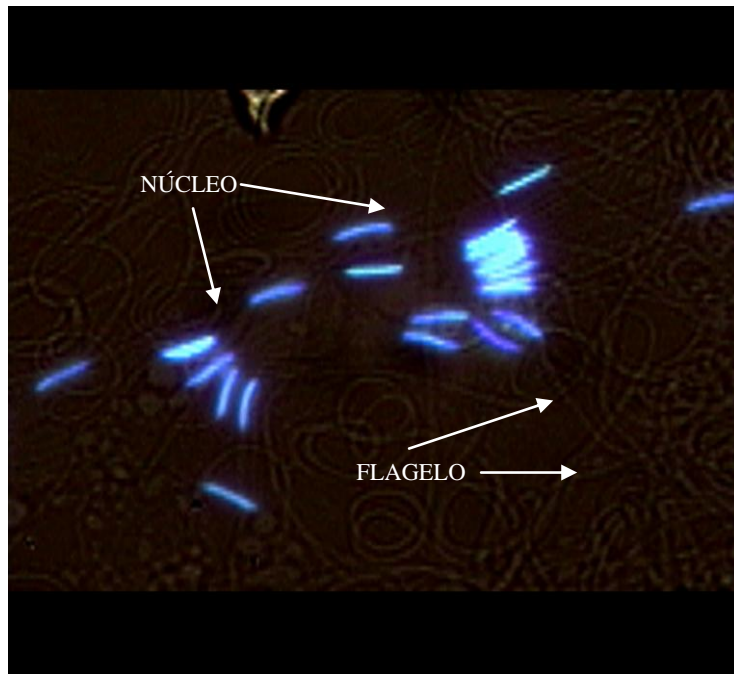


Figura 23. Tinción de DAPI y Contraste de fase



- En las Figuras 24–25 se muestran microfotografías con tinción de Dipquick.

Figura 24. Tinción de Dipquick

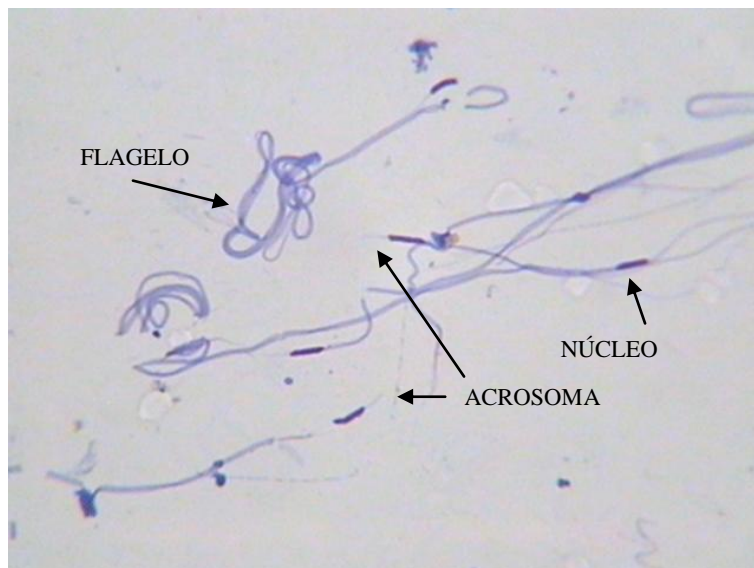
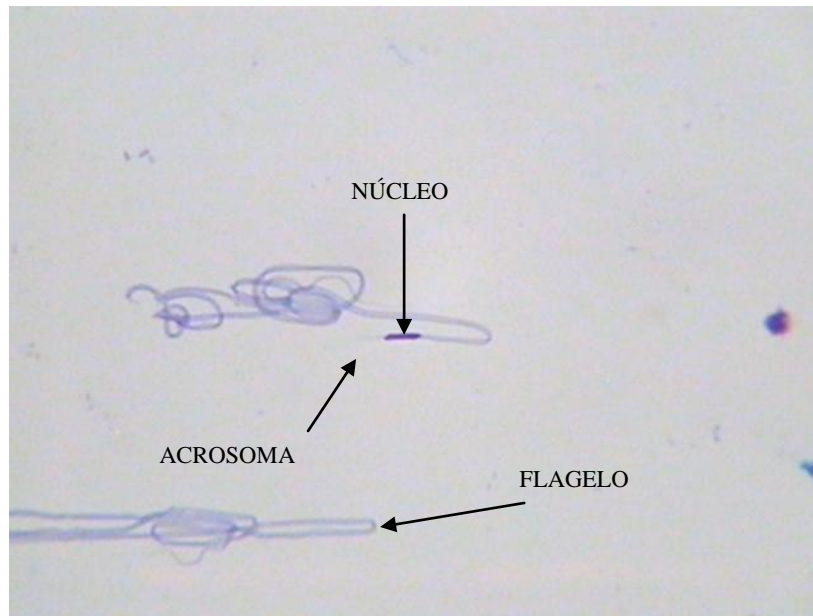


Figura 25. Tinción de Dipquick



- En las Figuras 26-28 se muestran microfotografías con tinciones de Dipquick y PAS vistas en el microscopio de fluorescencia.

Figura 26. Tinción de Dipquick con microscopio de fluorescencia

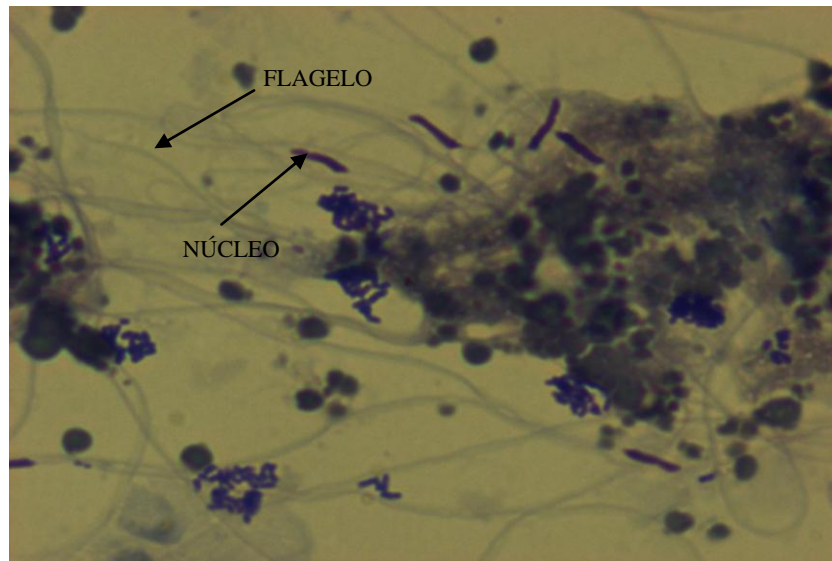


Figura 27. Tinción de PAS con microscopio de fluorescencia

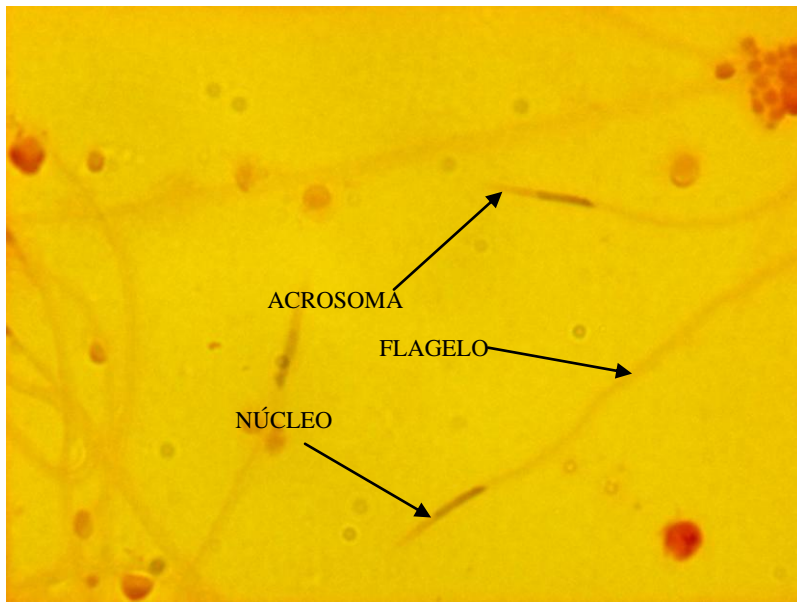
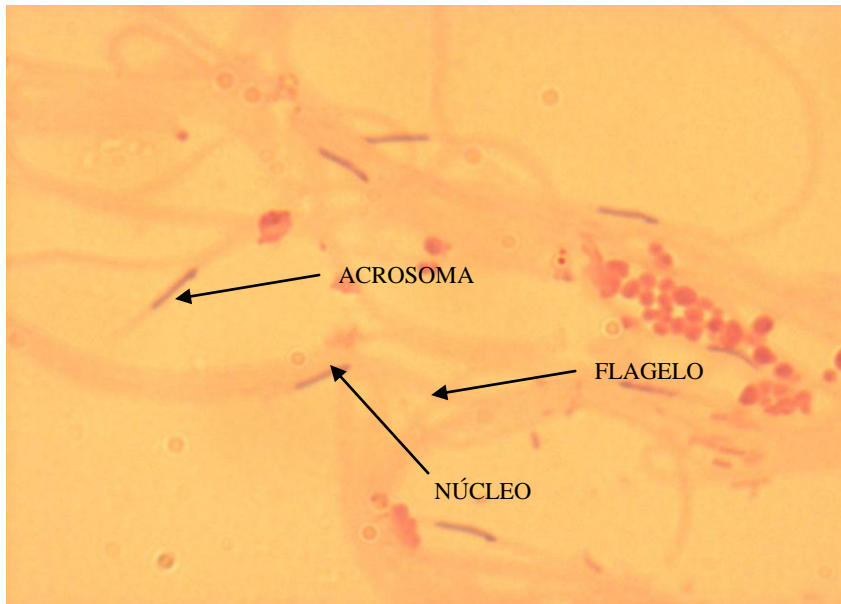


Figura 28. Tinción de PAS con microscopio de fluorescencia



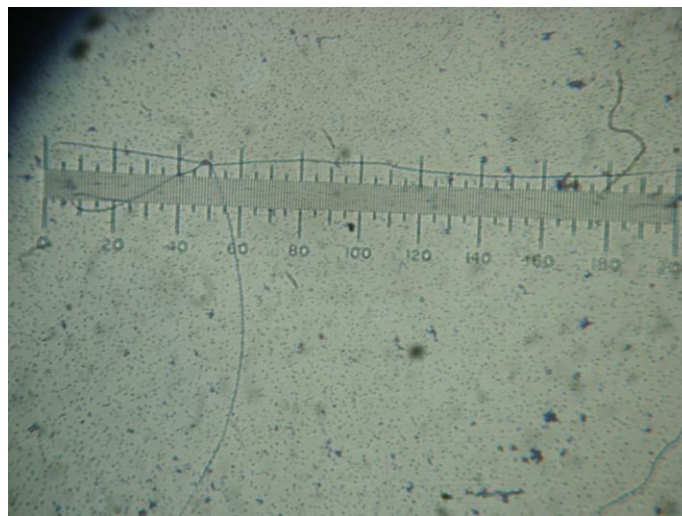
- En la figura 29 se muestra microfotografía que representa el tren de tinción Dipquick.

Figura 29. Tren de tinción Dipquick



- En la figura 30 se muestra microfotografía que representa la medida espermática de Apis mellifera en microscopio óptico con regleta

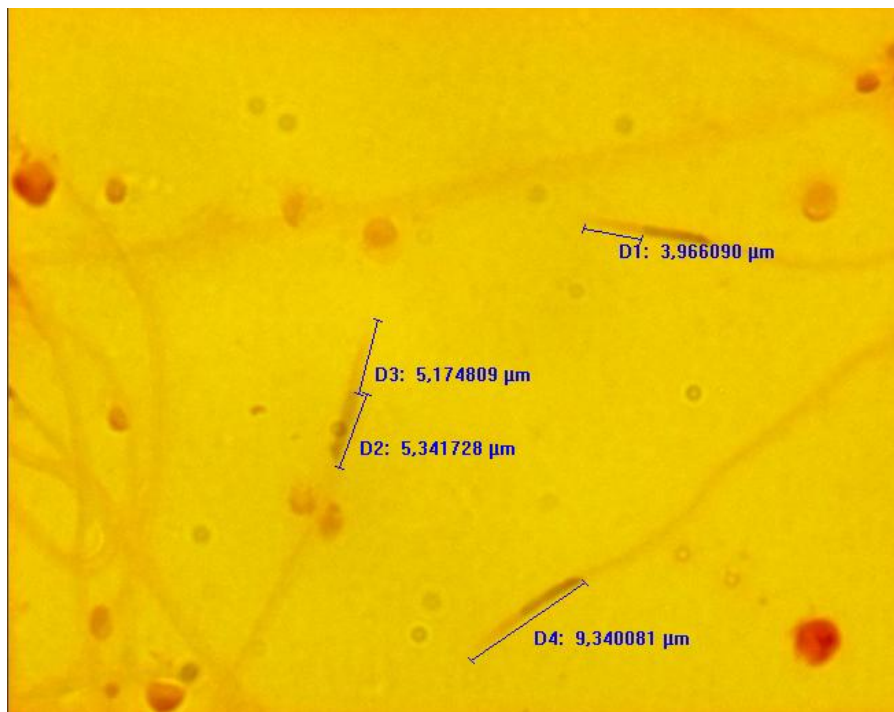
Figura 30. Medida espermática de Apis mellifera





- En la figura 31 se muestra microfotografía de fluorescencia que representa las medidas del núcleo y acrosoma con el programa Q Capture Pro

Figura 31. Medidas de núcleo y acrosoma con el programa Q Capture Pro



- El tamaño del espermatozoide en el primer muestreo tuvo una media de  $193.09 \pm 9.6 \mu\text{m}$ , con límites de confianza entre  $195 \mu\text{m}$  y  $191 \mu\text{m}$ ; los estimadores estadísticos se presentan en el cuadro 1; observándose una variación de 17.23% en el acrosoma seguida por un coeficiente de variación en el núcleo de 11.07%; el coeficiente de variación, tanto del flagelo como del espermatozoide completo fue de 5%.

Cuadro 1. Estimadores estadísticos que caracterizan cada variable estudiada en el primer muestreo.

	Longitud del espermatozoide completo ( $\mu\text{m}$ )	Longitud del Flagelo ( $\mu\text{m}$ )	Longitud de la Cabeza ( $\mu\text{m}$ )	Longitud del Acrosoma ( $\mu\text{m}$ )	Longitud del Núcleo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho del núcleo ( $\mu\text{m}$ )
<b>Tamaño de muestra</b>	100	100	100	100	100	100
<b>Media</b>	193.09	185.02	8.07	3.54	3.54	1.46
<b>Desviación estándar</b>	9.59	9.20	0.87	0.61	0.50	0.24
<b>Coefficiente de variación</b>	4.96	4.97	10.89	17.23	11.07	16.69
<b>Error estándar</b>	0.95	0.92	0.08	0.06	0.05	0.02
<b>Z</b>	1.96	1.96	1.96	1.96	1.96	1.96
<b>Intervalo de confianza</b>	1.88	1.80	0.17	0.11	0.09	0.04
<b>Límite de confianza superior</b>	194.97	186.82	8.24	3.65	4.62	1.51
<b>Límite de confianza inferior</b>	191.20	183.21	7.89	3.42	4.43	1.41
<b>Valor máximo</b>	215	207	10	5	5	2.1
<b>Valor mínimo</b>	180	170	7	3	4	1.07



- El tamaño del esperma en el segundo muestreo tuvo una media de  $240.95 \pm 13.37$   $\mu\text{m}$ , con límites de confianza entre  $243.57 \mu\text{m}$  y  $238.33 \mu\text{m}$ ; los estimadores estadísticos se presentan en el cuadro 2; observándose una variación de 25.47% en el acrosoma seguida por un coeficiente de variación en el ancho del núcleo de 15.97%; el coeficiente de variación, tanto del flagelo como del esperma completo fue de 5.6%.

Cuadro 2. Estimadores estadísticos que caracterizan cada variable estudiada en el segundo muestreo

	Longitud del esperma completo ( $\mu\text{m}$ )	Longitud del Flagelo ( $\mu\text{m}$ )	Longitud de la Cabeza ( $\mu\text{m}$ )	Longitud del Acrosoma ( $\mu\text{m}$ )	Longitud del Núcleo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho del núcleo ( $\mu\text{m}$ )
<b>Tamaño de muestra</b>	100	100	100	100	100	100
<b>Media</b>	240.95	233.31	7.63	3.01	4.62	0.68
<b>Desviación estándar</b>	13.37	13.31	0.80	0.76	0.30	0.10
<b>Coefficiente de variación</b>	5.55	5.70	10.48	25.47	6.54	15.12
<b>Error estándar</b>	1.33	1.33	0.08	0.07	0.03	0.01
<b>Z</b>	1.96	1.96	1.96	1.96	1.96	1.96
<b>Intervalo de confianza</b>	2.62	2.61	0.15	0.15	0.05	0.02
<b>Límite de confianza superior</b>	243.57	235.92	7.79	3.16	4.68	0.70
<b>Límite de confianza inferior</b>	238.33	230.70	7.47	2.86	4.56	0.66
<b>Valor máximo</b>	277.37	269.78	8.79	4.06	5.03	0.92
<b>Valor mínimo</b>	219.47	213	5.49	1.38	3.53	0.42

- El coeficiente de correlación y determinación entre las características espermáticas estudiadas en el primer muestreo se presenta en el cuadro 3.
- El coeficiente de correlación y determinación entre las características espermáticas estudiadas en el segundo muestreo se presenta en el cuadro 4.

Cuadro3. Coeficiente de correlación y determinación entre las variables estudiadas en el primer muestreo

<b>VARIABLE</b>	<b>CORRELACIÓN (r)</b>	<b>COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r<sup>2</sup>)</b>
longitud espermática - flagelo	1.00	0.99
longitud espermática - cabeza	0.48	0.23
longitud espermática - acrosoma	0.50	0.25
longitud espermática - longitud del núcleo	0.23	0.05
longitud espermática - ancho del núcleo	-0.03	0.00
longitud del flagelo - longitud de cabeza	0.40	0.16
longitud del flagelo - longitud de acrosoma	0.44	0.19
longitud del flagelo - longitud del núcleo	0.17	0.03
longitud del flagelo - ancho del núcleo	-0.02	0.00
longitud de cabeza - longitud del acrosoma	0.83	0.69
longitud de cabeza - longitud del núcleo	0.74	0.55
longitud de cabeza - ancho del núcleo	-0.13	0.02
longitud del acrosoma - longitud del núcleo	0.24	0.06
longitud del acrosoma - ancho del núcleo	-0.16	0.02
longitud del núcleo - ancho del núcleo	-0.03	0.00

Cuadro 4. Coeficiente de correlación y determinación entre las variables estudiadas en el segundo muestreo

<b>VARIABLE</b>	<b>CORRELACIÓN (r)</b>	<b>COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r<sup>2</sup>)</b>
longitud espermática - flagelo	1.00	1.00
longitud espermática - cabeza	0.10	0.01
longitud espermática - acrosoma	0.20	0.04
longitud espermática - longitud del núcleo	-0.25	0.06
longitud espermática - ancho del núcleo	-0.09	0.01
longitud del flagelo - longitud de cabeza	0.04	0.00
longitud del flagelo - longitud de acrosoma	0.15	0.02
longitud del flagelo - longitud del núcleo	-0.27	0.07
longitud del flagelo - ancho del núcleo	-0.08	0.01
longitud de cabeza - longitud del acrosoma	0.93	0.86
longitud de cabeza - longitud del núcleo	0.30	0.09
longitud de cabeza - ancho del núcleo	-0.10	0.01
longitud del acrosoma - longitud del núcleo	-0.08	0.01
longitud del acrosoma - ancho del núcleo	-0.06	0.00
longitud del núcleo - ancho del núcleo	-0.10	0.01

## 5. DISCUSIÓN

De todas las tinciones efectuadas para observar las estructuras espermáticas la que mejor permitió su visualización fue la de Dipquick; por lo que ésta se utilizó en ambos muestreos, habiéndose efectuado una dilución 1:1 con solución Harman y la fijación con metanol al 50%, ello permitió conservar a detalle las estructuras celulares y visualizar para su medición el flagelo con el objetivo 40x y con el objetivo 100x el acrosoma y el núcleo; si este último objetivo se utiliza para visualizar el flagelo la estructura se sale del campo óptico teniendo que recorrerse la laminilla para su medición completa; cabe señalar que el acrosoma es poco visible al microscopio óptico ya que sólo se observa como un desprendimiento de membrana.

La tinción de Dipquick no ha sido considerada en estudios realizados por otros autores y se considera por los resultados que no es necesario utilizar la técnica de fluorescencia para la observación espermática al microscopio óptico.

En el primer muestreo se observó que las células espermáticas son estructuras largas y filamentosas tal y como lo describen diferentes autores, sin embargo en cuanto a la longitud total ésta fue más pequeña obteniéndose una media de  $193.09 \pm 9.6 \mu\text{m}$ , con límites de confianza entre  $194.97 \mu\text{m}$  y  $191.20 \mu\text{m}$ . Phillips 1970, describe que el espermatozoide de Apis mellifera es una estructura larga, filamentososa y mide 250 a 270  $\mu\text{m}$ . Ruttner 1973, también investigó que los espermatozoides de los testículos son filamentosos y miden 250  $\mu\text{m}$ ; en estado vivo tienen movimientos serpenteantes. Jamienson 1999 investiga que el espermatozoide es largo y filamentososo de 250 a 270  $\mu\text{m}$ . Mackensen 1964 describe al espermatozoide con el mismo diámetro, 1  $\mu\text{m}$  en cabeza y acrosoma. Estos autores en sus investigaciones no describen la técnica de tinción utilizada, ni hacen referencia al tamaño de muestra cuantificado para estimar el promedio en la longitud espermática que reportan, tampoco hacen referencia alguna a los estimadores estadísticos que caractericen el conjunto de espermatozoides estudiados, sin embargo ante la evidencia observada en esta investigación respecto al menor tamaño de los espermatozoides, se procedió a efectuar un segundo muestreo del esperma de Apis mellifera.

Los investigadores referidos comentan que es difícil observar con claridad al microscopio óptico la célula espermática de no ser con el objetivo de 100x y recomiendan para la observación la tinción de fluorescencia; sin embargo en la presente investigación, utilizando el mismo objetivo (100x) y el mismo observador, se detectó que las medidas efectuadas no son precisas, ello se demuestra al comparar los resultados entre el primero y segundo muestreo siendo las medidas obtenidas en este último de mayor exactitud, dado que el microscopio utilizado permitió que el programa de computo (Q Capture Pro) con el que está equipado, evita los errores ópticos del observador; en el segundo muestreo se obtuvo una media de  $240.95 \pm 13.37 \mu\text{m}$ , con límites de confianza entre  $243.57 \mu\text{m}$  y  $238.33 \mu\text{m}$ . Medición ligeramente más pequeña al rango de los  $250 \mu\text{m}$  a  $270 \mu\text{m}$  reportados por Phillips 1970, Ruttner 1973, Jamienson 1999, Mackensen 1964; no obstante el valor máximo observado en un espermatozoide fue de  $277.37 \mu\text{m}$ ; en la gráfica 1 se dividió en 5 clases el largo del esperma completo, observándose que la moda se encuentra en la clase 2 que tiene una amplitud de  $231.42$  a  $241.61 \mu\text{m}$ ; de los espermatozoides medidos en el segundo muestreo 19 de ellos están acorde con los promedios reportados por esos investigadores; por lo que es de suponerse que tal vez ellos hayan seleccionado para su medición los espermatozoides más largos, dado que no dan medidas de variación.

En el anexo 1 se presentan las gráficas 2 al 6 en donde puede observarse la distribución en clases de cada una de las estructuras medidas en el segundo muestreo.

Comparando los resultados entre el primero y segundo muestreo se observa que la media en el primer muestreo es significativamente ( $p < 0.05$ ) más pequeña que la obtenida en el segundo muestreo evidenciándose con ello que existe un error en la primera medición de aproximadamente 20% atribuido a errores ópticos del observador, dado el microscopio utilizado, por lo que se sugiere que en nuevas contribuciones sobre este tema se utilice el microscopio equipado con el programa de computo Q Capture Pro para obtener mediciones precisas.

Respecto a la longitud del flagelo en el segundo muestreo este representa el 96.83% de la longitud total del esperma completo y la cabeza representa el 3.17%; respecto a la longitud de la cabeza el 39.45% corresponde al largo del acrosoma y el 60.55% al largo del núcleo; es notoria la elevada correlación ( $r = 1.0$ ) entre el flagelo y el esperma completo así como la correlación entre la longitud de cabeza y la longitud del acrosoma ( $r = 0.93$ ). La correlación entre las otras características evaluadas no es significativa ( $p > 0.05$ ).

En esta investigación destacan como contribuciones científicas el haber determinado la mejor tinción para observar las células espermáticas además de contribuir al estudio de la variación de los espermatozoides basándose en métodos estadísticos.

Sería deseable que otros investigadores pudiesen verificar la consistencia de los datos reportados con respecto al estudio de otras poblaciones de diversas zonas apícolas del país, dado que la diferencia de menor tamaño observada con respecto a lo publicado con otros autores puede atribuirse a la diversidad de razas mezcladas que existen en México, mientras que en otros países en donde los autores referidos investigaron, existe la certeza de que sus poblaciones apícolas son de razas puras.

## 6. CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides de Apis mellifera tienen una longitud promedio de 240.95  $\mu\text{m}$  y una desviación estándar de 13.37  $\mu\text{m}$ , con límites de confianza que fluctúan entre 238.33  $\mu\text{m}$  y 243.57  $\mu\text{m}$  y un coeficiente de variación de 5.55%.
2. La tinción que mejor permite la visualización de las estructuras espermáticas fue la de Dipquick.
3. La utilización del microscopio de la marca NIKON equipado con el programa de computo Q Capture Pro permite mediciones más precisas de las estructuras espermáticas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

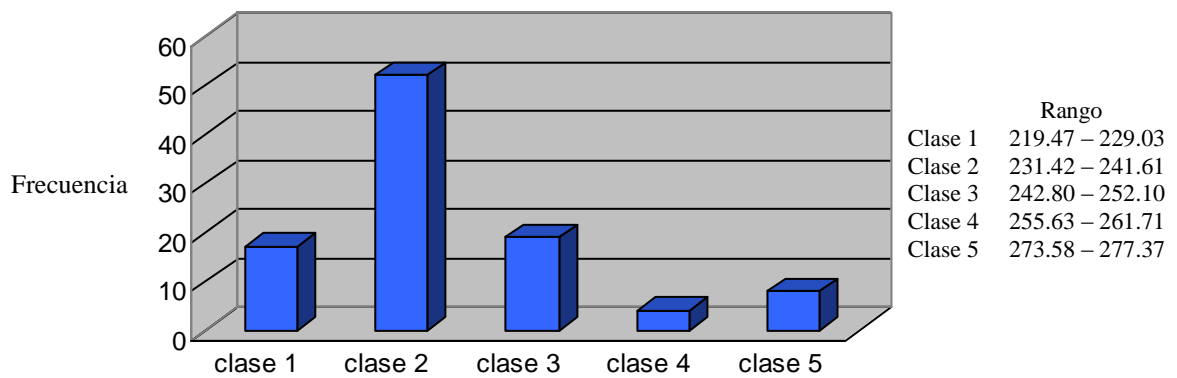
1. Bob Mills J. B., Arrington L. H., Sobin M. D. 1995. Métodos Histotecnológicos. Edit. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) Washington. D.C.
2. Carmona M, Rubio T, C., Lemus F, C. 2002. Curso-taller Estadística Aplicada a la Investigación Programa Institucional en Ciencias Pecuarias. Facultad de Agricultura Autónoma de Nayarit. México
3. Chavacan A. M. L. 2006. Informe final del trabajo profesional en la modalidad de producción apícola; práctica al extranjero. Guelph, Canadá, Avances en la criopreservación del semen de zángano (Apis mellífera). México. 25
4. Da Crux-Landim C., Beig D. and Regina L.M Silva de Morales. 1980. The process of differentiation during spermatogenesis in bees (hymenoptera, apidae, meliponini); Caryologia. Vol.33,n.1:1-15
5. Da Crux-Landim C, Da Cruz-Hofling M. A. 1969. Electron microscope observations on honeybee seminal vesicles (apis mellifera adansonii, hymenoptera, apidae). PAPEIS AVULSOS Zool. S. Paulo. Vol. 22, art.14:145-151, pls.1-11 1.IV
6. Elvira E. F., Zamora L. P., Manzano P. R. 1982. Manual de técnicas histológicas. Edit. A.G.T, 1ª edición, S.A. México. 59, 631
7. Gradwohl, S & Jarett. 1986. Métodos y Diagnósticos de Laboratorio Clínico. Edit. Medica Panamericana, 8ª edición. México
8. Lien M., Spaas O., Koeniger G., Billen J. 2005. Morphological and ultrastructural changes in the mucus glands of Apis mellifera drones during pupal development and sexual maturation. Apidologie. 36:245-254
9. López, M. M. 1986. Tratado sobre las abejas. Edit. Albatros, 1ª edición. Buenos Aires, Argentina. 267.
10. Mackensen, O., Tucker, KW. 1989. Instrumental Insemination of Queen Bees. USDA. Washington. 25-26.



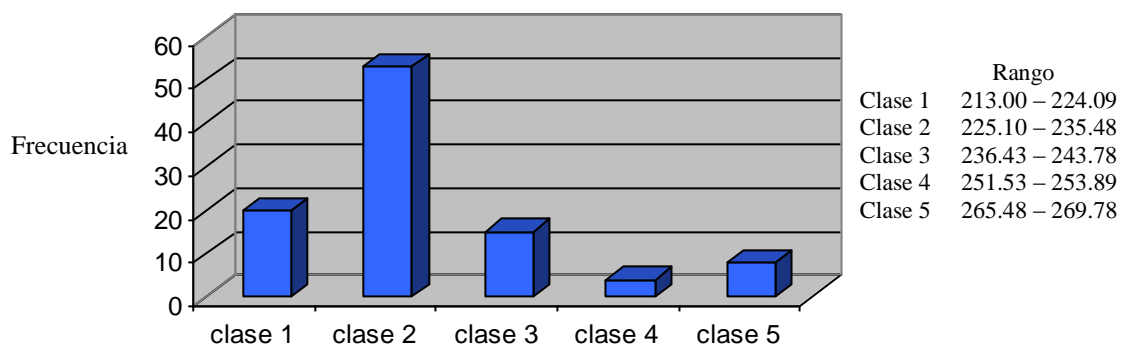
11. Martínez, U.M. 2004. Evaluación de la inseminación instrumental como técnica para la selección genética de abejas Apis mellifera en base al comportamiento higiénico. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco Chile. 6
12. Mendizabal M. F. 2005. Abejas. Edit. Albatros, 1ª edición, Buenos Aires, Argentina. 51-52.
13. Pierre J. P. 2007. Apicultura. Edit. Mundi Prensa, 4ª edición. Madrid España. 137
14. Ruttner F. 1973. Inseminación artificial de las reinas. Edit. España, 2ª edición. 6, 19-21, 81, 82.
15. Schley P. 2001. Guía práctica para inseminación instrumental de reinas de abejas con equipo de diseño. México. 1-5.
16. Valega O. 2007. Fecundación controlada de abejas reinas. De Apícola Don Guillermo.
17. Ward L. L. 1992. Manual completo de Apicultura. Edit. Continental, 1ª edición, México. 140-141.
18. Wayne W. D. 2002. Bioestadística bases para el análisis de las ciencias de la salud. Edit. Limusa Wiley, 4ª edición, México.
19. Wolfgang R. 2001. Enfermedades de las abejas. Edit. Acribia, Zaragoza, 1ª edición, España. 13

**Anexo 1.** Gráficas que muestran la variación en clases de cada una de las estructuras espermáticas evaluadas.

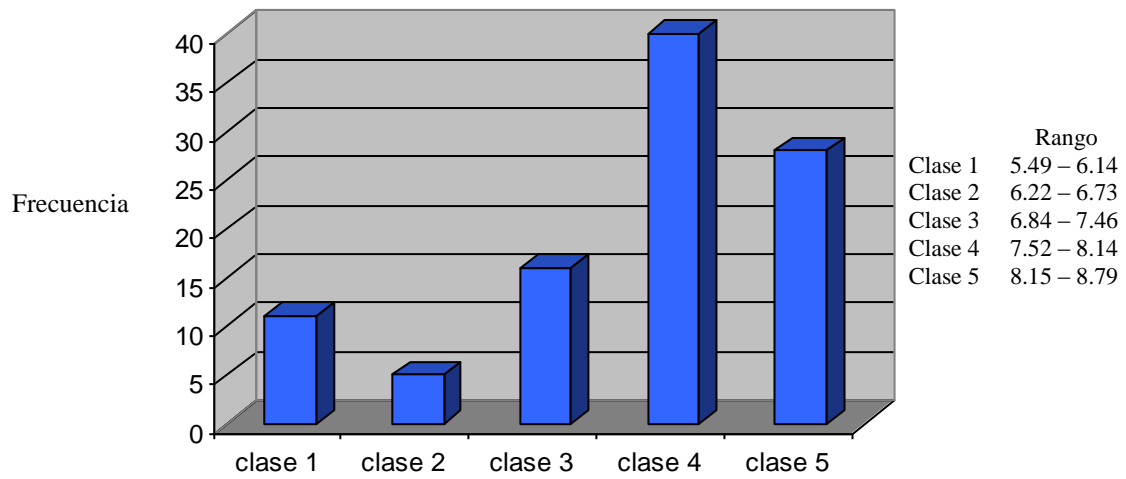
**Gráfica 1. Longitud del Esperma Completo  $\mu\text{m}$**



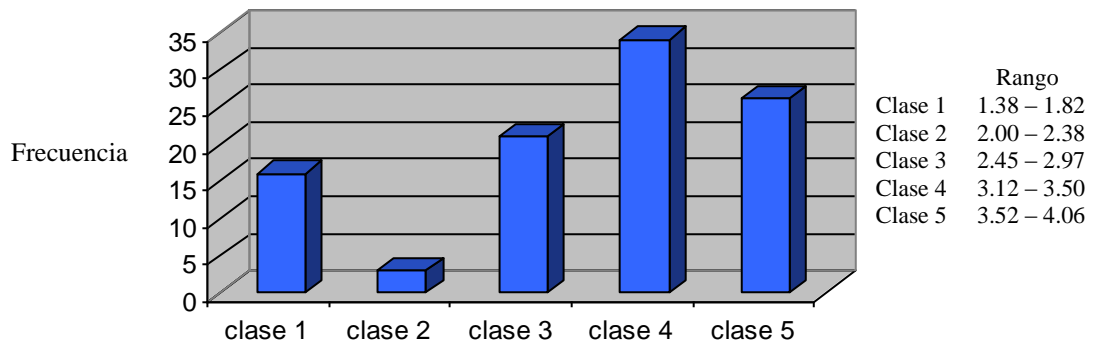
**Gráfica 2. Longitud del Flagelo  $\mu\text{m}$**



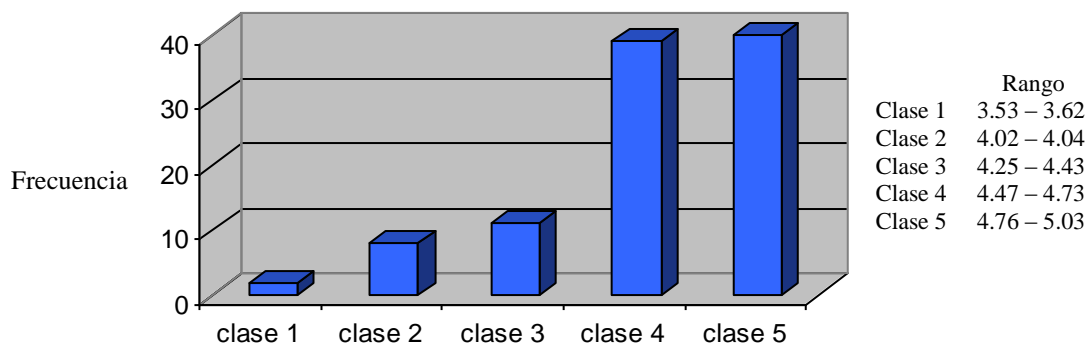
**Gráfica 3. Longitud de Cabeza  $\mu\text{m}$**



**Gráfica 4. Longitud del Acrosoma  $\mu\text{m}$**



**Gráfica 5. Longitud del Núcleo  $\mu\text{m}$**



**Gráfica 6. Ancho del Núcleo  $\mu\text{m}$**

