



**Universidad Nacional Autónoma De México**

**Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**

**“Efecto comparativo de la nutrición sobre la crianza y calidad del semen de zánganos alimentados de forma natural y artificialmente”**

**TESIS**

Que para optar por el grado de:

**Maestra en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**

PRESENTA:

**Itzel Vasquez Valencia**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**MSc J. René Rosiles Martínez**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, FMVZ, UNAM

**COMITÉ TUTORAL:**

**PhD. Ernesto Guzmán Novoa**

Universidad de Guelph, Ontario, Canadá

**Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, FMVZ, UNAM

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx**

**Abril 2018**



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.

## **Dedicatoria**

A **mis padres**, porque nada en la vida que yo haga sería posible sin todo el amor y la buena educación que me proporcionaron desde pequeña. Porque me educaron para ser fuerte y responsable y sobreponerme a cualquier contrariedad, con su ejemplo y con el de las historias de mis abuelos y familia me enseñaron a ser valiente y levantarme con la frente en alto para enfrentar las dificultades de la vida. Porque a pesar de todo siempre han creído en mí y han apoyado mis decisiones, porque siempre han estado ahí para animarme en días difíciles y para compartir alegrías. Gracias por quererme, soportarme y protegerme con amor y dedicación por tantos años.

A mi **papa**, porque sé que existiendo tú, la vida es un lugar seguro, porque sé que estarás observando mis pasos siempre, por mostrarme que la vida es un reto, un desafío y un regalo, gracias papa.

A mi **mama**, que es uno de mis ejemplos a seguir: una mujer como ninguna, de carácter fuerte y corazón humilde, siempre trabajando para sacarnos adelante y muy a pesar de los malos ratos tu siempre tienes un abrazo y un beso que llegan al alma. Tus consejos e incluso regaños son exactos, de ti aprendí lo importante que es dar siempre tu mayor esfuerzo para uno mismo y nuestros seres queridos. Tú que confías en todo lo que soñé y me ayudaste siempre en lo que necesite.

A mi hermano **Diny**, por enseñarme a luchar hacia adelante, por tu gran corazón y apoyo incondicional, pero sobre todo por enseñarme a ser responsable, gracias a ti he llegado a esta meta.

A cada uno de los integrantes de la familia **VASQUEZ, VALENCIA y GARCÍA**, gracias por verme crecer, por apoyarme, y por estar ahí siempre, los quiero mucho y los llevo presentes en mi vida todos los días.

A ti **Alejo**; es increíble como dos personas tan diferentes los puede unir el amor y la admiración. Gracias por todo este tiempo juntos, por haber regresado a mi vida, por apoyarme en este proceso, aunque muchas veces no sabías de lo que hablaba tu siempre escuchabas atentamente; por compartir momentos maravillosos a tu lado, por tu apoyo incondicional, por no dejarme desistir ante las adversidades y transmitirme fuerza, por todas aquellas locuras que hemos vivido, por comprender mi forma de ser... gracias por ser el perfecto catalizador de mi felicidad y una de las ilusiones más grandes de mi vida.

A mis mejores amigas, confidentes, futboleras y hermanas por elección: **Silvia Viana, Chamú, Luz Galeana, Kenia, Alma, Abad, Blanca, Alejandra y Pris**. Por todas las locuras, consejos, pláticas y experiencias durante estos 18 años. Por cada momento extraordinario a su lado.

Gracias a mis eternos amigos **Anabel, Gloria, Ari, Neyda, Liz, Ivette, Valeria Lalito, Edder, Gerardo, Luis y Julio**. Aún a la distancia, mi vida es hermosa y especial con ustedes en ella. ¡Gracias, amigos!

A **Aldo**, mi hijo adoptivo, a **Yava** y **Héctor Regules**. La perfecta definición de diversión, locura, apoyo y familia son ustedes, gracias por todos los maravillosos momentos. **Aldo** eres un gran pilar en mi vida y un gran ejemplo de fortaleza, hermandad y humildad.

A mi amiga invaluable **Svietta y sus hijas**, porque a través de los años nuestra amistad cada vez es más fuerte.

A **Dios** por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** de la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi segundo hogar. Al financiamiento otorgado a través del proyecto **UNAM-DGAPA-PAPIME PE201115** y a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al **Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos** y al **laboratorio de Toxicología** de la FMVZ-UNAM, por permitirme realizar mi trabajo de tesis y las facilidades otorgadas para ello.

Un agradecimiento especial a mi tutor, el Maestro **René Rosiles Martínez** por la confianza para llevar a cabo esta tesis, por su calidez humana, paciencia, consejos, enseñanzas y todo el apoyo recibido de manera personal y profesional.

A mi **Comité Tutorial**: Al **Dr. Ernesto Guzmán Novoa**, le agradezco infinitamente, por su dedicación, dirección y coordinación del presente trabajo, por abrirme las puertas y darme la oportunidad de desarrollarme en un área en la que disfruto trabajar día a día. A la **Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda** por apoyarme cuando le propuse mi tema de investigación para poder llevarlo a cabo, gracias por formar parte del desarrollo del proyecto, por los consejos y la asesoría y el que permitiera aprender de usted al ver más allá de lo que se podía esperar en cada parte de este proceso.

A mi compañero y maestro **Daniel Prieto Merlos**, por dedicarme su tiempo para mi formación en el área de la ciencia, por su valentía y fungir como padre académico desde la licenciatura, alguien con quien se puede contar y de quien se aprende mucho en todo momento. Gracias por su constante respaldo en las actividades en campo y laboratorio de las que formo parte, por su paciencia, dedicación y compromiso, ya que sin su presencia este trabajo no se habría logrado.

A **Daniel Díaz Espinosa de los Monteros** por su gran ayuda y colaboración en el análisis estadístico y la corrección de imágenes.

A la **Dra. Laura G. Espinosa Montaña** y la **Dra. Nuria Morfin Ramírez**, que de una forma indirecta me dieron su apoyo incondicional y siempre estuvieron disponibles para aclararme cualquier duda.

Al **M en C J. Alberto Balcazar Sánchez**, por su apoyo técnico en el procesamiento y evaluación de las muestras.

A mis **sinodales**: M Sc. René Rosiles Martínez, Dra. Laura G. Espinosa Montaña, Dra. Nuria Morfin Ramírez y el M en A. Liborio Carrillo Miranda, por otorgarme el honor de aceptar este trabajo, empleando parte de su tiempo y sus conocimientos en su revisión, enriqueciendo así su contenido. Gracias por ayudarme a iniciar y concluir mi formación.

Agradezco el apoyo técnico que me brindaron las siguientes personas durante el desarrollo de este trabajo en campo y en laboratorio: **M en C Mariana Partida, M en C Sergio Joao Sánchez, MVZ. Nadia Albor, MVZ. Rafael A. Navarrete y pMVZ. Marcos Flores.**

A **marquitos**, gracias por ser mi compañero durante la tesis, hiciste que los momentos malos se volvieran más livianos y siempre nos hacías reír... eres una persona muy capaz, inteligente y con un gran corazón.

A la **Dra. Adriana**, en primer lugar me gustaría agradecerle por brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo, por compartir conmigo su experiencia, por la confianza que siempre me ofrece, por tomarse el tiempo de corregir mis errores y tratar de transmitirme sus conocimientos. Pero sobre todo le agradezco el ser mi amiga y preocuparse no solo de mi desarrollo profesional, sino también personal. Hemos vivido momentos buenos y malos, pero siempre estaré agradecida por conocerla. Espero poder contar siempre con su amistad, siempre tendrá mi agradecimiento, admiración y respeto.

A mi familia del **Departamento de Abejas**: Dra. Adriana, Dra. Laura, Dr. Ángel, Dr. Daniel, Angy, Richy, Esperancita, Carlos, Mariana, Nadia, Kike, Rafa, Alan y Fer. Gracias a todos porque aprendo mucho de ustedes y nos divertimos harto.

Con una especial dedicación a la **Dra. Hilda Jandete, Dr. Ángel García, Dr. Angel López y Bio. Esperanza Ochoa**, por regalarme tardes de plática y agradables historias, por brindarme sus enseñanzas, su orientación, su amistad sincera y hacer ameno este trabajo, son un gran ejemplo a seguir. Siempre adelante...

A **Mariana Carbajal y Richy** por ser mis compañeros de batallas y cómplices...

## Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto que tiene el uso de un suplemento alimenticio comercial sobre la producción de zánganos, su morfometría (peso e índices corporales) así como su relación con la calidad del semen de acuerdo a características como: volumen de eyaculado, concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática. De igual forma se determinó la concentración de minerales en semen y en vesículas seminales relacionados con la calidad del semen. Se utilizaron 4 colmenas productoras de zánganos las cuales se asignaron de forma aleatoria a dos dietas alimenticias durante 5 semanas. El grupo control recibió una alimentación semanal a base de jarabe de azúcar, mientras que el grupo suplementado recibió además de jarabe de azúcar un suplemento alimenticio en dos ocasiones. A la par se criaron zánganos, los cuales se dejaron madurar sexualmente para su colecta. Para comparar el efecto del suplemento se realizaron estadísticos descriptivos así como una prueba de t- Student.

Entre las variables evaluadas se encontró diferencia estadística en cuanto a la producción de zánganos ( $p < 0.05$ ), siendo la producción menor en el grupo suplementado. El peso promedio de zánganos suplementados fue mayor en un 10.5% ( $p < 0.001$ ), de la misma forma el índice del tórax también fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ). Por otra parte, el índice abdominal presentó valores similares entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ). En cuanto a la calidad de semen, se encontró que el uso del suplemento incremento la mayoría de las variables, se encontraron diferencias significativas en cuanto a concentración espermática ( $p < 0.001$ ) y viabilidad ( $p < 0.05$ ). Respecto a la motilidad masal, esta se observó con un movimiento con ondas vigorosas y remolinos rápidos en todas las muestras de semen; la motilidad espermática a las 24 horas fue de más de un 50% de espermatozoides con movimiento circular y movimiento progresivo, posteriormente en un lapso de una semana la motilidad disminuyó en todas las muestras. Se observaron anomalías en cuanto a la morfología espermática, para el grupo control se encontraron espermatozoides con cabezas grandes (3.5%), colas enrolladas (13.5%) y colas fragmentadas (6%), mientras que para el grupo suplementado se observaron menores porcentajes de anomalías; estas fueron de igual forma cabezas grandes (1.5%), colas enrolladas (9.5%) y colas fragmentadas (4%).

Se determinaron las siguientes concentraciones de minerales en semen de zánganos sin suplementar: Selenio (199.79 ng/g), magnesio (27.51  $\mu\text{g/g}$ ), cobre (50.72  $\mu\text{g/g}$ ), zinc (19.85  $\mu\text{g/g}$ ) y fósforo (1875.73  $\mu\text{g/g}$ ). Para las muestras con complemento se obtuvo: Selenio (186.08 ng/g), magnesio (22.94  $\mu\text{g/g}$ ), cobre (29.01  $\mu\text{g/g}$ ), zinc (22.15  $\mu\text{g/g}$ ) y fósforo (2552.67  $\mu\text{g/g}$ ). Para las vesículas se obtuvieron las siguientes concentraciones: Selenio (420.1 ng/g), magnesio (138580.1  $\mu\text{g/g}$ ), cobre (63.3  $\mu\text{g/g}$ ), zinc (56.5  $\mu\text{g/g}$ ), calcio (7.9  $\mu\text{g/g}$ ) y fósforo (4206.73  $\mu\text{g/g}$ ). Para las muestras con complemento se obtuvo: Selenio (458.72 ng/g), magnesio (106503.21  $\mu\text{g/g}$ ), cobre (26.82  $\mu\text{g/g}$ ), zinc (44.44  $\mu\text{g/g}$ ), calcio (3.4  $\mu\text{g/g}$ ) y fósforo (8317.47  $\mu\text{g/g}$ ).

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que la utilización del suplemento alimenticio mejoró aspectos morfométricos de los zánganos que se reflejó en la calidad del semen; sin embargo la presencia de minerales en semen y en las vesículas seminales en conjunto no influyó sobre la calidad del semen.

**Palabras clave:** zánganos, semen, suplemento alimenticio, vesículas seminales, minerales

## Abstract

The objective of this study was to analyze the effect of the use of a dietary supplement on honey bee drone production and drone morphometry (weight and body indices), and its relationship with semen quality according to characteristics such as volume of ejaculate, concentration, motility, viability and sperm morphology. Also, the concentration of minerals in semen and seminal vesicles, which are related to semen quality was determined. Four drone rearing colonies were randomly assigned to two different diets and fed for 5 weeks. The control group was fed only sugar syrup, and the treatment group was fed sugar syrup and food supplement twice during the experiment. At the same time, drones were reared and allowed to reach sexual maturity before their collection. Descriptive statistics and t-Student tests were used to analyze the effect of the supplement on drone production, drone morphometry and semen quality. In the evaluated variables, statistical difference was found in the production of drones ( $p < 0.05$ ), with the lowest production in the supplemented group. The average weight of supplemented drones was significantly higher by 10.5% ( $p < 0.001$ ). Also, the chest index was significantly higher ( $p < 0.001$ ). However, the abdominal index presented similar values between both groups ( $p > 0.05$ ). Moreover, the supplement increased most of the variables used to assess semen quality, including sperm concentration ( $p < 0.001$ ) and viability ( $p < 0.05$ ). Mass motility was observed as vigorous waves and rapid swirls in all semen samples; sperm motility at 24 h included more than 50% of the spermatozoa, showing circular and progressive movements. After one week the motility decreased in all samples. Abnormalities in sperm morphology in the control group included spermatozoa with large heads (3.5%), rolled tails (13.5%) and fragmented tails (6%). A lower percentage of anomalies were found in the treatment group, including large heads (1.5%), rolled tails (9.5%) and fragmented tails (4%).

The mineral concentration in drone semen from control colonies were the following: selenium (199.79 ng/g), magnesium (27.51  $\mu\text{g/g}$ ), copper (50.72  $\mu\text{g/g}$ ), zinc (19.85  $\mu\text{g/g}$ ) and phosphorus (1875.73  $\mu\text{g/g}$ ). The mineral concentrations in drone semen supplemented were the following: selenium (186.08  $\mu\text{g/g}$ ), magnesium (22.94  $\mu\text{g/g}$ ), copper (29.01  $\mu\text{g/g}$ ), zinc (22.15  $\mu\text{g/g}$ ) and phosphorus (2552.67  $\mu\text{g/g}$ ). The mineral concentrations from seminal vesicles of drones from control colonies were: selenium (420.1 ng/g), magnesium (138580.1  $\mu\text{g/g}$ ), copper (63.3  $\mu\text{g/g}$ ), zinc (56.5  $\mu\text{g/g}$ ), calcium (7.9  $\mu\text{g/g}$ ) and phosphorus (4206.73  $\mu\text{g/g}$ ). The mineral concentrations from seminal vesicles of drones from supplemented were: selenium (458.72  $\mu\text{g/g}$ ), magnesium (106503.21  $\mu\text{g/g}$ ), copper (26.82  $\mu\text{g/g}$ ), zinc (44.44  $\mu\text{g/g}$ ), calcium (3.4  $\mu\text{g/g}$ ) and phosphorus (8317.47  $\mu\text{g/g}$ ).

With the results obtained in the present study, it can be concluded that the use of the nutritional supplement improved morphometric aspects of the drones that was reflected in the quality of the semen; however, the presence of minerals in semen and in the seminal vesicles as a whole did not influence semen quality.

**Keywords:** drones, semen, food supplement, seminal vesicles, minerals

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1 Producción natural de zánganos	4
1.1.1 Biología reproductiva	4
1.1.2 Producción y características de los espermatozoides	10
1.2 Cría artificial de zánganos	13
1.3 Nutrición y alimentación artificial en abejas	14
1.4 Evaluación de la calidad del semen	21
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
5.1 Localización del área de estudio	26
5.2 Establecimiento del apiario experimental	26
5.3 Establecimiento de las colonias experimentales	27
5.4 Cría de zánganos	28
5.5 Manejo de las colonias experimentales	29
5.6 Colecta de zánganos	30
5.7 Toma de muestras	31
5.8 Evaluaciones	33
5.9 Análisis estadístico	42
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
6.1 Evaluación de la cría de zánganos y morfología	43
6.2 Evaluación de la calidad del semen	46
6.3 Evaluación de minerales en semen y vesículas seminales	49
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>61</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>71</b>

## Lista de Figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Morfología y características principales de las abejas de acuerdo a las castas.	5
<b>Figura 2.</b> Morfología del aparato reproductor del zángano.	9
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la espermatogénesis en zánganos.	10
<b>Figura 4.</b> Fotografías representativas de espermatozoides filamentosos de zángano teñidos con tinción específica para contrastar sus estructuras.	12
<b>Figura 5.</b> Ubicación geográfica del Apiario “San Juan”, en San Juan Ixtayopan en la Delegación Tláhuac dentro de la Ciudad de México.	27
<b>Figura 6.</b> Cría de zánganos.	28
<b>Figura 7.</b> Enjaula de bastidor con cría de zángano e introducción de jaula de confinamiento	29
<b>Figura 8.</b> Alimentación con jarabe y suplemento en forma de torta.	30
<b>Figura 9.</b> Proceso de colecta de semen de zánganos.	32
<b>Figura 10.</b> Evaluación de cría de zánganos.	34
<b>Figura 11.</b> Pesaje de zánganos.	34
<b>Figura 12.</b> Medición del IA.	34
<b>Figura 13.</b> Cámara de Neubauer Improved (hemocitómetro) para el conteo.	36
<b>Figura 14.</b> Tinción Eosina-Nigrosina, espermatozoides vivos y muertos.	38
<b>Figura 15.</b> Diseño experimental.	41
<b>Figura 16.</b> Promedio ( $\pm$ DE) de celdas de zángano de colonias sin suplemento (control) y con suplemento.	44
<b>Figura 17.</b> Comparación de las características morfológicas de los zánganos de ambos grupos.	45
<b>Figura 18.</b> Comparación de la calidad del semen de zánganos sin suplementar y suplementados.	47
<b>Figura 19.</b> Viabilidad y ejemplos de alteraciones morfológicas de espermatozoides de zánganos.	48

## Lista de Cuadros

		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Características de los órganos reproductivos del zángano	8
<b>Cuadro 2.</b>	Régimen de Alimentación (Dieta)	30
<b>Cuadro 3.</b>	Referencia para la evaluación de motilidad masal	36
<b>Cuadro 4.</b>	Referencia para la evaluación de motilidad espermática	37
<b>Cuadro 5.</b>	Contenido de elementos minerales en semen de zánganos suplementados y sin suplementar	49
<b>Cuadro 6.</b>	Contenido de elementos minerales en vesículas seminales de zánganos suplementados y sin suplementar	49

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>°C</b>	grados centígrados	<b>Mn</b>	Manganeso
<b>Ca</b>	Calcio	<b>Mg</b>	miligramos
<b>Cu</b>	Cobre	<b>ml</b>	mililitros
<b>cm</b>	centímetros	<b>mm</b>	milímetros
<b>EM</b>	elementos minerales	<b>mOsm</b>	miliosmoles
<b>EN</b>	eosina-nigrosina	<b>Ng</b>	nanogramos
<b>EROS</b>	especies reactivas de oxígeno	<b>Na</b>	Sodio
<b>g</b>	Gramo	<b>P</b>	Fosforo
<b>IA</b>	índice abdominal	<b>Ppm</b>	Partes por millón
<b>K</b>	Potasio	<b>Se</b>	Selenio
<b>km</b>	kilómetros	<b>µl</b>	microlitros
<b>kg</b>	kilogramos	<b>µm</b>	Micras
<b>L</b>	Litros	<b>Ug</b>	microgramos
<b>m</b>	Metros	<b>Zn</b>	Zinc
<b>Mg</b>	magnesio		

# 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la apicultura mexicana ha comenzado a desarrollarse por medio de grandes productores, los cuales tienen una relevante participación en el mercado internacional. México ocupó en el 2016 el octavo lugar mundial en producción de miel, con 55 358 mil toneladas y el tercer lugar como exportador, cuyo destino principal es el mercado europeo (SIAP 2016). De forma directa la actividad apícola beneficia a 45,000 apicultores y de forma indirecta a 400,000 personas, además se estiman valores de más de \$26,400 millones de pesos por el concepto de la polinización proporcionada por las abejas, principalmente por cultivos hortícolas y frutícolas. Todos estos datos hacen pensar que la apicultura en México tiene un enorme potencial, para ello es necesario mantener la producción anual de miel, e inclusive incrementarla, además de desarrollar una apicultura intensiva que compense los altos costos de los productos apícolas, así como los costos que causa la abeja africanizada como lo es el cambio de reinas anual, las reubicaciones de los apiarios y la mano de obra.

Una de las principales herramientas para lograrlo es mediante el mejoramiento genético, por medio del cual se pueden indentificar a las colonias que tienen el mejor valor genético para la característica que nos interese mejorar en las poblaciones de abejas como son la producción de miel, docilidad y reistencia a enfermedades principalmente.

En el mejoramiento genético de las abejas se ha puesto más atención en la selección de las reinas y poca a los zánganos por la dificultad de determinar los caracteres de éste que están más correlacionados con las buenas características de la colonia; sin embargo, los zánganos son una parte fundamental en las cuestiones reproductivas por lo que es forzoso realizar mejoras en la producción de ello. Una forma de solucionar este problema, ha sido utilizando colonias seleccionadas como productoras de zánganos, que se aparean con las reinas vírgenes procedentes de madres seleccionadas.

Existen metodologías bien desarrolladas de cría de reinas, pero falta perfeccionar el proceso de cría de zánganos para que estos existan en cantidad abundante durante todo el año y que sean maduros sexualmente en el momento en que las reinas estén listas para la fecundación natural o inseminación.

También es preciso desarrollar e implementar metodologías para evaluar la calidad del semen de los zánganos que se utilicen para estos fines.

Uno de los principales problemas de la cría de zánganos es que se dificulta su producción en épocas fuera de la temporada natural de reproducción de las abejas, debido a la falta de alimento. Por esta razón el tipo de alimentación que se les proporcione debe contener los nutrientes necesarios para lograr un buen desarrollo de los zánganos, es decir, para que estos presenten características reproductivas deseables como un adecuado tamaño corporal y que el semen que produzcan sea de calidad (Estrada, 2013).

Es así que la nutrición es un factor determinante en la apicultura, primordialmente para las abejas reinas y los zánganos, los cuales deben ser capaces de reproducirse, generando grandes poblaciones de abejas que resistan incluso a factores de estrés (Brodschneider y Crailsheim, 2010) debido a la necesidad de producir grandes poblaciones de abejas,). De forma general, debido a la pérdida masiva de colonias de abejas que se inició a informar a nivel mundial desde el año 2006, se han comenzado a estudiar en todo el mundo los efectos de una buena nutrición en esta especie; este fenómeno es conocido como “Síndrome del Colapso de las Colonias” (o *Colony Collapse Disorder, CCD*, por sus siglas en inglés) en el cual se ha mencionado que la nutrición es un factor asociado estrictamente con este síndrome (Neuman y Carreck, 2010).

De acuerdo a estudios realizados en cuanto a nutrición se ha logrado determinar que entre las causas principales se encuentran la inanición, la cual se presenta cuando existen largos períodos sin floraciones o cuando se hallan infestaciones parasitarias elevadas, lo cual hace que las abejas no puedan desarrollarse al no contar con reservas alimenticias (Higes et al., 2008). Otro problema son los monocultivos ya que las abejas característicamente recogen mezclas de polen de muchas especies diferentes obteniendo una dieta equilibrada y diversa, sin embargo las colonias utilizadas para la polinización se enfrentan a una alimentación menos diversificada de pólenes, y esta dieta en particular puede no proporcionar todos los nutrientes esenciales, asimismo existen productos transgénicos en muchos de los cultivos donde las abejas colectan alimento, estos transgénicos contienen toxinas de *Bacillus thuringiensis* o inhibidores de proteasa, que afectan de forma crónica a las abejas (Neuman y Carreck, 2010). De igual

forma pueden llegar a encontrarse dentro del néctar o polen de las flores residuos de plaguicidas como los neonicotinoides, los cuales afectan de forma gradual la salud de las abejas. También se hallan ciertos tóxicos naturales, los cuales pueden ser azúcares como la galactosa, arabinosa, manosa y xilosa, los cuales forman parte de la composición química del néctar de las flores y de ciertos pólenes e inclusive en sustitutos de polen como la harina de soya (Brodschneider y Crailsheim, 2010).

Por otro lado existen diversas enfermedades causadas por bacterias, virus, parásitos y hongos, los cuales ocasionan estrés nutricional, por ejemplo, las obreras infectadas con hongos por *Nosema ceranae* o *N. apis* muestran elevados niveles de hambre y cambios en el comportamiento en la trofolaxia, la cual ocasiona un aumento en el consumo de alimento, que a su vez incrementa la necesidad de la colonia de obtener recursos, contribuyendo a que las abejas no puedan suministrar el alimento necesario. Todos estos problemas han tenido efectos diversos en cada una de las castas, no obstante, es trascendental conocer que en una colonia de abejas, los niveles nutricionales están estrechamente conectados a través de numerosas interacciones que involucran a toda la colonia completa.

La nutrición debe mantenerse adecuadamente en cada etapa desde la cría hasta las abejas adultas, ya que los trastornos en cada etapa afectan a etapas posteriores y viceversa (Brodschneider y Crailsheim, 2010). La nutrición de las abejas es un proceso complejo ya que los requerimientos nutricionales, la ingesta, digestión y absorción del alimento dependen de factores sociales o de comportamiento; en este sentido se hace referencia principalmente al papel de cada casta dentro de la colonia (hembras y machos) ya que varía de acuerdo con la edad y la función que necesiten realizar en ciertos momentos de su vida.

## Revisión de literatura

### 1.1 Producción natural de zánganos

Como se mencionó, dentro de la cría de reinas se deberán incluir colonias seleccionadas específicamente para producir zánganos con el objetivo de que saturen las zonas de congregación y fecunden a las abejas reinas. En este sentido, la participación reproductiva de los zánganos es primordial ya que aportan el 50% del material genético, el cual repercutirá para las siguientes generaciones de abejas (Laidlaw y Page, 1984). Su aportación reproductiva depende de su habilidad para poder aparearse una sola vez con una abeja reina y de la calidad de su semen; esto último se ve reflejado en la producción promedio de espermatozoides y en su viabilidad. En algunos estudios se ha referido que los espermatozoides son viables hasta por 5 años, una vez se encuentran dentro de la espermoteca de la reina (Guzmán, 2012).

#### 1.1.1 Biología reproductiva

Para empezar la crianza de zánganos es necesario conocer la biología reproductiva de las abejas. Las abejas son insectos eusociales, esto quiere decir que viven en colonias que se componen de dos castas, machos y hembras (a su vez, las hembras pueden ser obreras o reinas). Las colonias están conformadas por miles de obreras, cientos de zánganos (alrededor del 10% de los habitantes totales de la colonia) y de una reina. Cada casta cumple una función específica dentro de la colonia (**Figura 1**). Las obreras realizan diferentes labores dentro de la colmena, éstas actividades van desde la limpieza de celdas, alimentación de larvas, pecoreo y defensa de la colmena.

Las abejas reinas y los zánganos cumplen con las funciones reproductivas. La abeja reina nace a partir de un huevo fecundado cuya larva es alimentada con jalea real por las obreras nodrizas. El desarrollo de la reina tiene una duración promedio de 16 días, posteriormente a los 7 días después de emerger, alcanza la madurez sexual para salir de la colmena y aparearse con los zánganos.

Los zánganos son los individuos machos dentro de las colonias, tienen una vida media de 50 días aproximadamente. Los zánganos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados puestos por reinas u obreras, por lo tanto tienen un solo juego de cromosomas (16n). El desarrollo de un zángano o metamorfosis tarda 24 días

aproximadamente, periodo más largo que el de las obreras y reinas. Dentro de sus características morfológicas es que su cuerpo no está desarrollado para recolectar alimento, tampoco poseen un aguijón como sistema de defensa. El principal propósito de los zánganos es producir semen y fecundar a las abejas reinas lo cual ocurre en un vuelo. Los zánganos de todas las especies de *Apis*, mueren durante su primera y única cópula, debido a la eversión irreversible del endófalco que causa una parálisis.

<b>Casta</b>	<b>Morfología</b>	<b>Función</b>	<b>Tiempo vida</b>
Obrera		Hembra no fértil - Cuidado de cría - Limpieza - Construcción de nido - Defensa y forrajeo	45 - 90 días aproximadamente
Reina		Hembra fértil - Puesta de huevos	5 años en vida silvestre  1 - 2 años vida productiva
Zángano		Macho - Apareamiento con reinas - Fecundación	6 meses aproximadamente

**Figura 1. Morfología y características principales de las abejas de acuerdo a las castas.**

(Modificada de <https://www.zzzangano.com/tipos-abejas-zanganos-reina-obreras.>)

En las colmenas los zánganos son criados y tolerados principalmente en épocas de abundante floración; el mayor número coincide con el pico máximo de disponibilidad de recursos (McNally y Schneider, 1994; Seeley, 2002) y con las mejores épocas para la cría de reinas. Las obreras regulan su población en las colonias ya sea limitando la cantidad de panales construidos o inclusive desalojando a los zánganos adultos de la colonia. La abundancia de los recursos, el comportamiento de enjambrazón y la población de obreras en la colonia son algunos de los factores que intervienen en la producción de zánganos (Pratt, 1998; Pratt, 2004).

Así, las poblaciones de zánganos fluctúan con las estaciones, siendo más populosos en primavera y en los primeros meses de verano, posteriormente en otoño cuando los recursos son escasos, son expulsados de las colonias, alcanzando su punto más bajo poblacional en invierno (Peng et al., 1993; Winston, 1991).

Durante su desarrollo, los zánganos requieren alimentos (polen y miel) para el crecimiento y maduración de las células y de los órganos reproductivos (Laidlaw y Page, 1997). Los zánganos permanecen en la colmena hasta el octavo día aproximadamente, posteriormente inician vuelos de orientación, sucesivamente hacia los días 12-20 alcanzan la madurez sexual. Cuando los zánganos maduran sexualmente realizan vuelos de apareamiento. Estos vuelos generalmente ocurren entre las 14:00 y las 16:00 horas del día, aunque los horarios son flexibles y se adaptan a la situación climática. El tiempo que duran los vuelos es variable, pero generalmente tardan de 25 a 32 minutos. Los zánganos pueden realizar de tres a cinco vuelos en un día, teniendo periodos de descanso de 15 minutos. En los vuelos de apareamiento las reinas y los zánganos se dirigen a áreas geográficas denominadas zonas de congregación, en donde confluyen reinas y zánganos de colonias diferentes. Estos lugares se encuentran en promedio a 2 km de distancia de su colonia. En una zona de congregación se pueden observar zánganos volando en una área de 30 a 200 metros de diámetro y a una altura de 10 a 40 metros (Koeninger et al., 2005a) estimaron que en una zona de congregación se pueden encontrar en promedio hasta 11, 750 zánganos de más de 200 colonias.

Cuando una reina vuela en un área de congregación, los zánganos la perseguirán en grupo, formando como cometas. Los machos son atraídos por la presencia de la feromona mandibular de la reina y mediante señales visuales (Gary, 1963; Strang, 1970). Una vez que el zángano alcanza a una reina, éste se engancha a ella con el primer par de patas, el segundo par de patas se coloca sobre el tórax y el tercer par sobre el abdomen, de manera que queda posado sobre el dorso de la abeja reina. El apareamiento dura menos de cinco segundos, durante este periodo el zángano curva el abdomen mientras que la reina abre la cámara del aguijón permitiendo la entrada del endófalo del zángano, el zángano cae hacia atrás por la presión que ejerce la hemolinfa, el abdomen se contrae provocando la eyaculación.

Una vez que sucede la eyaculación, el zángano se separa de la reina quedando parte del endófalo dentro de la vagina y el zángano muere. El éxito de apareamiento de los zánganos con una reina es apenas equivalente a 1 % del total de los zánganos presentes, sin embargo los zánganos que se han apareado mueren.

Las reinas pueden aparearse durante un solo periodo de su vida, que dura de 14 a 21 días después de alcanzar la madurez sexual, en promedio se aparean con 1 a 17 zánganos en promedio. Las reinas almacenan el semen de los zánganos con los que se aparean en la espermateca, en este órgano el semen de los zánganos se mezcla y permanece viable durante toda la vida de la reina (Winston, 1991).

El eyaculado de un zángano contiene entre 6.1 y 11.9 millones de espermatozoides (Schlüns et al., 2003), sin embargo sólo entre un 2.5% - 5% de estos espermatozoides son almacenados en la espermateca, el resto son expulsados por la reina a través de la vagina. Las reinas son capaces de almacenar un total de entre 4.7 y 8.0 millones de espermatozoides en la espermateca por cinco años y con una capacidad potencial para dejar hasta 1.7 millones de descendientes (Baer, 2005).

Una vez que la reina ha realizado su último vuelo de apareamiento, después de un promedio de 3 a 5 días, empieza a ovopositar. Una reina pone alrededor de 1,500 huevos diariamente. Los huevos fértiles darán origen a individuos hembras, los huevos que no se fertilizaron dan origen a individuos machos (un número haploide de cromosomas).

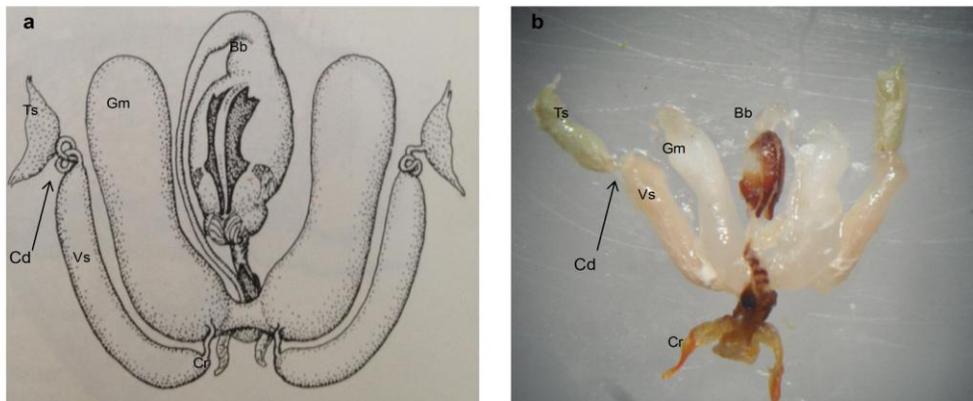
Los órganos reproductivos del macho incluyen un par de testículos, los conductos deferentes que se ensanchan en las vesículas seminales, un par de glándulas del moco, un conducto eyaculador y un pene o endófalo (**Figura 2**); en el **Cuadro 1**, se mencionan las características de cada estructura.

**Cuadro 1. Características de los órganos reproductivos del zángano**

Estructura	Características
<b>Testículos</b>	Son órganos pares, ovalados, de color crema, situados muy anteriormente en el abdomen. Son cuerpos blandos, esponjosos de 5 – 6 mm de longitud en el zángano recién emergido; se componen de cerca de 200 testíolos (tubos espermáticos) en los cuales se desarrollan los espermatogonios. Cada testículo tiene una túnica exterior, dentro de los túbulos, las celdas son organizadas en quistes, envueltas en una pared fina, que parecen llevar funciones de secreción y servir de transporte.
<b>Conductos deferentes</b>	Siguen un trayecto en forma de “S”, son elásticos y de color blanco brillante, están formado por una musculatura muy fuerte, en su porción mediana el vaso deferente se ensanchan formando la vesícula seminal en forma de botella.
<b>Vesículas seminales</b>	Es el lugar donde los espermatozoides complementan su estado de maduración y permanecen almacenados hasta el momento del acoplamiento. Están conectadas con las glándulas mucosas que se unen para formar el conducto eyaculador, que se comunica con el endófalo. En las vesículas de zánganos maduros sexualmente se puede observar que el epitelio está muy plegado internamente. En los jóvenes los pliegues son aún 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 son muy altas, en forma columnar, casi filiformes. En las pupas el promedio es de 30 $\mu\text{m}$ de alto y 2.5 $\mu\text{m}$ de ancho; en los adultos 20 $\mu\text{m}$ de alto y de 5-5.4 $\mu\text{m}$ 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.
<b>Glándulas del moco</b>	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 al aparato reproductor del zángano. Están formadas por una musculatura muy fuerte, de dos a tres capas. Hacia el lumen hay una capa de células epiteliales con función secretora, estas segregan una sustancia mucosa que al contacto con el aire solidifica, este moco es producido durante los primeros 7 días de vida como adulto. Tienen como función empujar al semen a través del conducto eyaculador (Chavacán, 2006).
<b>Endófalo</b>	Es un saco blando membranoso, con varios apéndices y zonas velludas. Es el órgano de copulación y consiste en un tubo largo complejo en el interior del abdomen. Está invaginado en el abdomen, simula una silueta en forma de dedo, siendo casi igual su longitud a la del abdomen del zángano. El largo conducto eyaculador liga al endófalo 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 endófalo, la parte media por el conducto eyaculador y la parte inferior por los testículos y las glándulas mucosas. El endófalo 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 endófalo (bulbo), de donde salen dos cuernos o cornículas que en el zángano maduro son observador de color naranja intenso y el zángano inmaduro es observado de color transparente. Estas cornículas permiten mantener abierta la vagina de la reina durante el acoplamiento. El endófalo en eversión es transparente y está lleno de aire y hemolinfa. En su interior se puede observar el conducto eyaculador.

(Modificado de Reyes, 2010)



**Figura 2. Morfología del aparato reproductor del zángano.**

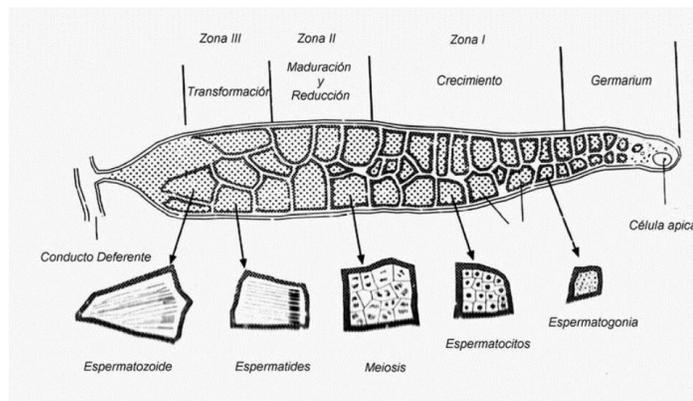
En **a**: se observa el esquema del aparato reproductor del zángano (Dade, 1994) y en **b** se muestra una fotografía representativa del aparato reproductor del zángano. En ambas ilustraciones se muestran los órganos con los siguientes letras: Ts = testículos, Vs = Vesícula seminal, Gm =Glándula productora de moco, Cr = Cornículas, Bb = Bulbo, Cd = Conducto deferente.

Durante la eyaculación, el semen del endófalo debe salir fuera del abdomen. Este proceso comienza a partir de un incremento de presión en el interior del endófalo parcialmente evertido, las paredes del conducto dorsal se abren, el interior del cuello se agranda y el bulbo pasa a través de él, lográndose la eversión total. El aumento de la presión dentro del endófalo, provoca la expulsión de semen y moco con fuerza en la extremidad del endófalo en zánganos maduros (Woyke, 2008).

### 1.1.2 Producción y características de los espermatozoides

La espermatogénesis o producción de espermatozoides se lleva a cabo en el *germarium* dentro de la parte distal de los testículos (**Figura 3**), durante la fase de pupa (14 ½ días). El *germarium* se divide en tres zonas en específico:

- Zona de crecimiento (I): Las células germinales haploides (16n) se dividen generando espermatogonias, las cuales se dividen e incrementan de tamaño para formar los espermatocitos.
- Zona de maduración y reducción (II): Los espermatocitos se dividen por meiosis dando origen a las espermatídes.
- Zona de transformación (III): Las espermatídes darán origen a los espermatozoides. Posteriormente, se lleva a cabo la espermiogénesis antes de emerger de la celda.



**Figura 3. Representación esquemática de la espermatogénesis en zánganos.**

(Tomada de Chapman, 1998)

Consecutivamente los espermatozoides se desplazan hasta las vesículas seminales dos ó tres días después de su emergencia como adultos (Woyke, 1985), y permanecerán en las vesículas seminales hasta el apareamiento. Los zánganos al emerger de sus celdas como adultos poseen el mismo número de espermatozoides que tendrán el resto de su vida a diferencia de los mamíferos, donde la producción de espermatozoides se da hasta la pubertad (Reyes, 2010).

En el caso del zángano no se produce reducción divisional durante la espermatogénesis, por lo que todos los espermatozoides haploides son genéticamente idénticos. Las células espermáticas sufren un segundo estadio de maduración, que finaliza a los 10 a 12 días, momento en el que los machos están maduros sexualmente (Koeniger et al., 2005a). Los zánganos tienen la cantidad máxima de células espermáticas hasta los 8 días de edad, pero sus espermatozoides a cualquier edad son funcionales. La eversión del endófalo y la eyaculación es mejor cuando son mayores de 12 días. Cada zángano produce entre 1.50 y 1.75  $\mu\text{l}$  de semen que contiene aproximadamente 11 millones de espermatozoides (Woyke, 1962). La cantidad de espermatozoides que produce un zángano es dependiente de su peso, de la longitud abdominal y de su procedencia, es decir si fueron generados por una abeja reina ó una obrera. Diversos estudios señalan que la producción de espermatozoides es menor cuando estos han sido criados por obreras ponedoras (Schlüns et al., 2003).

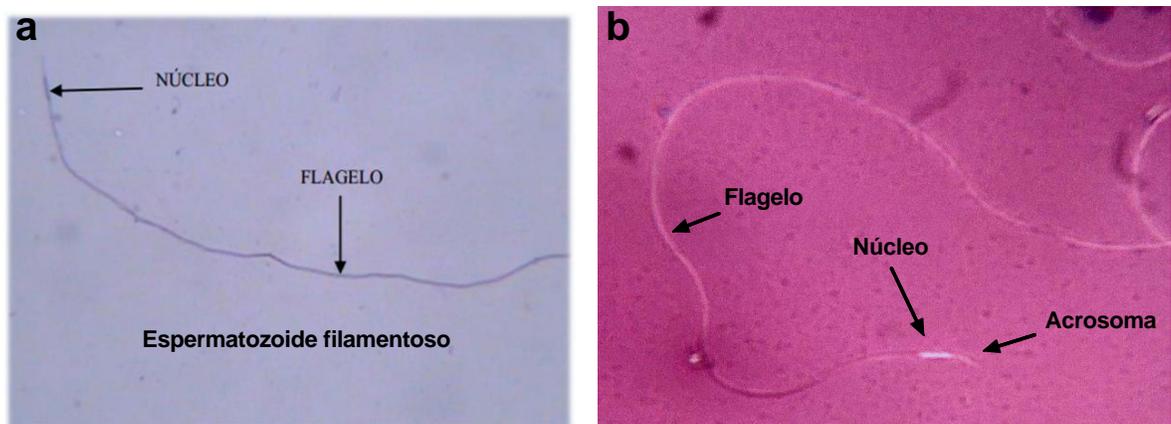
Los espermatozoides son filamentosos, con una cabeza elongada y una cola considerablemente larga (250-270  $\mu\text{m}$  de largo y 0.7  $\mu\text{m}$  de ancho), se asemejan a los espermatozoides de otros insectos y son más largos y delgados en comparación a los espermatozoides de los mamíferos (Verma, 1974); se componen de las siguientes estructuras: cabeza, cuello y flagelo (**Figura 4**). Su principal característica es que su cabeza es cilíndrica y poco distinguible de la cola o flagelo. La falta de demarcación entre la cabeza y la cola acompañada por su longitud extrema hacen que los espermatozoides sean difíciles de observar con microscopios de campo claro, por ello es importante evidenciar el núcleo mediante algunas tinciones.

**a) Cabeza:** La cabeza del espermatozoide mide aproximadamente 12.2  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, es una estructura elongada, asimétrica y está compuesta por el acrosoma o *perforatorium* y el núcleo (**Figura 4**). El acrosoma forma el complejo acrosomal, en su extremo apical se encuentra una estructura en forma de túbulo la cual es el apéndice acicular; posteriormente a éste, el complejo acrosomal comienza a diferenciarse en una región esférica y alongada. El acrosoma mide 1  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.25  $\mu\text{m}$  de ancho, éste se amplía en su parte posterior y forma la galea. Posteriormente la forma de la cabeza comienza a tornarse ovalada para formar el núcleo. El núcleo es grande de forma esférica u ovoide, que mide 5

$\mu\text{m}$  de longitud y  $0.3 \mu\text{m}$  de espesor dependiendo de la edad. Generalmente es esférico en adultos. En la parte posterior del núcleo se forma una región entre la cabeza y la cola a la cual se le denomina cuello. También la parte final del núcleo da origen a los derivados mitocondriales. El complejo acrosomal está compuesto por las siguientes estructuras: el apéndice acicular anterior, la región esférica (contiene material extra acrosomal), la vesícula acrosomal, el corpúsculo central interno, la barra interna acrosomal y la cavidad subacrosomal.

**b) Cuello:** La región del cuello es una estructura que une al núcleo con el axonema y los derivados mitocondriales de la cola. En la porción anterior de los derivados mitocondriales se encuentra el cuerpo triangular, que probablemente funciona como el centriolo descrito en los espermatozoides de otros insectos.

**c) Flagelo:** Consiste en dos derivados mitocondriales, un axonema y dos cuerpos accesorios de forma triangular. Los derivados mitocondriales son de diferente tamaño y se encuentran paralelos al axonema (**Figura 4**).



**Figura 4. Fotografías representativas de espermatozoides filamentosos de zángano teñidos con tinción específica para contrastar sus estructuras: a) Tinción Hematoxilina-Eosina (las flechas señalan el flagelo y el núcleo que demarca la cabeza respectivamente, tomada de Reyes, 2010) y b) Tinción Eosina-Nigrosina (las flechas señalan el flagelo y la cabeza formada por el núcleo y el acrosoma, en este caso el núcleo contrasta para observar el acrosoma).**

Los espermatozoides junto con el plasma seminal componen el semen. El semen de zángano, es un líquido de color crema que contiene dos elementos: plasma seminal y espermatozoides, en una proporción 1:1 o 2:1. El pH del espermatozoides eyaculado varía de 6.0 a 7.1 (Verma, 1973) tiene una osmolaridad de  $467 \pm 13 \text{ mOsmol/ml}$ . Contiene azúcares como fructosa, glucosa y trehalosa (Blum et al., 1962; Verma 1974), aminoácidos (como cistina, metionina, tirosina, entre otros), fosfolípidos, triglicéridos, ácidos grasos libres, minerales como Mg, Ca, Na, Fe, Mn y Cu (Verma, 1973), enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión S-transferasa y superóxido dismutasa) así como compuestos de  $\alpha$ -glicerolfosfato, lactato,  $\text{NADH}_2$ ,  $\text{NADPH}_2$ , glucosa-6-fosfatasa,  $\beta$ -hidroxibutirato, isocitrato, glutamato y malato.

## **1.2 Cría artificial de zánganos**

La producción intensiva de zánganos es un factor importante en la cría de reinas y en la inseminación artificial, ya que de los zánganos seleccionados se obtendrán las características genéticas de las siguientes generaciones. Las colonias productoras de zánganos deben seleccionarse con base a características como producción de miel, docilidad y alta resistencia a enfermedades.

Los zánganos se deben producir dos meses antes de la cría de reinas, esto es para garantizar el tener zánganos adultos y maduros en el momento que salen las primeras reinas a fecundarse, para ello las colmenas criadoras de zánganos deben encontrarse a una distancia menor de 5 km de las zonas de apareamiento. La cantidad de zánganos a producir dependerá de las reinas, por ejemplo es necesario de dos a tres colmenas criadoras de zánganos por cada 100 reinas (espacios de fecundación).

Otro de los aspectos más relevantes en la producción de zánganos es la presencia de la enfermedad conocida como varroasis, la cual es causada por el agente etiológico *Varroa destructor*, el cual tiende a crecer de una forma exponencial ya que el periodo de metamorfosis de los zánganos (24 días) permite la reproducción del ácaro sin mayor problema perpetuando la enfermedad. Es por esto que es común medicar a este tipo de colmenas dos veces al año, o bien cambiar cada año a las colmenas productoras de zánganos.

El principal método para inducir la cría de zánganos es suministrar a la colonia seleccionada panales con celdas solo de zángano (bastidor con cera estampada para zángano) o panales normales de celdas de obrera que contengan sectores de celdas de zángano. Estos panales se colocan en el centro de la cámara de cría de la colonia seleccionada o criadora. Normalmente la producción de zánganos requiere además de los bastidores especiales para zánganos un estímulo parecido a la enjambrazón, el cual es promovido por una sobrepoblación de la colmena como resultado de la abundancia de polen y néctar (Estrada 2013); por ello se menciona que una buena colonia productora de zánganos se debe alimentar adecuadamente con polen y miel. También debe de considerarse que la cantidad de cría de zánganos y el número de zánganos adultos esta positivamente correlacionado con el número de obreras de las colonias, pues la cantidad de cría de zánganos se incrementa con el tamaño de la población de esta.

Asímismo, en estas colmenas, las reservas de alimento deben ser suficientes, si es posible deben tener alzas con miel y aunado a ello es de suma importancia proporcionar de forma artificial alimento energético y proteico.

### **1.3 Nutrición y alimentación artificial en abejas**

La nutrición es un proceso biológico a partir del cual el organismo asimila los alimentos y los líquidos necesarios para el crecimiento, funcionamiento y mantenimiento de las funciones vitales. Existen seis requerimientos básicos de nutrientes esenciales para las abejas, estos son: los carbohidratos, las proteínas, lípidos, vitaminas, minerales y agua. La mayoría de estos son adquiridos a través del consumo natural del alimento, llamado “pan de abejas”, el cual es una mezcla de miel y polen. Su consumo varía según la edad de la abeja y la disponibilidad dentro de la zona florística (Crailsheim et al., 1992).

- **Carbohidratos:** Son uno de los nutrientes más importantes y abundantes en la alimentación de las abejas, siendo el néctar la principal fuente de energía. El néctar (el cual es pecoreado por abejas obreras a partir de diversas flores, transportandolo a la colmena y finalmente sea almacenado en celdas para convertirlo en miel).

El néctar está compuesto por agua (40 a 80 %) y azúcares (7 al 60 %), como sacarosa, aceites esenciales, sales minerales y ácidos orgánicos (cítrico, fórmico, acético, butírico, entre otros). Las proporciones de estos compuestos varían dependiendo de la especie vegetal, de las condiciones del suelo y del ambiente en general (DeGrandi-Hoffman y Hagler, 2000).

Las abejas adultas requieren en promedio consumir 4 mg de azúcares al día para sobrevivir como mínimo, aunque este puede variar hasta los 128 mg cuando las abejas obreras realizan muchas actividades. En el caso de las larvas, durante los primeros tres días requieren entre un 18% - 45% de azúcares, equivalente a 60 mg de azúcares en obreras y para zánganos 98.2 mg de azúcares (Brodschneider y Crailsheim 2010).

- **Proteínas:** Las proteínas son fundamentales en la dieta de las abejas, estos nutrientes son provistos de forma natural y específicamente a través del consumo de polen. La calidad nutritiva del polen varía según la especie y regiones de las que proviene. Se ha observado que el contenido proteico de diferentes tipos de polen puede variar de 4 % hasta un 80 % (Keller et al., 2005). Las proteínas presentes en el polen están formadas por una variedad de aminoácidos, dentro de estos los de mayor importancia para las abejas y su desarrollo se encuentran: arginina, histidina, lisina, triptofano, fenilalanina, metionina, treonina, leucina, isoleucina y valina.

Las colonias de abejas colectan en promedio entre 10 a 26 kg de polen por año, del cual solo una pequeña cantidad es almacenada, e incluso estas pequeñas reservas son rápidamente consumidas según la necesidad de la colonia. En cuanto al consumo de polen por parte de los diferentes elementos que componen la colonia varían de acuerdo a las actividades y funciones que realiza la abeja, por ejemplo, una abeja obrera consume un promedio de 3.04 a 4.03 mg de polen por día. En el caso de la cría, se ha determinado que para el correcto desarrollo de una larva, se necesitan aproximadamente de 25 a 37.5 mg de proteína, o lo que equivale a 125 - 187.5 mg de polen (Crailsheim 1986; Brodschneider y Crailsheim, 2010).

Las obreras nodrizas desempeñan un papel fundamental en la digestión y distribución de proteínas a la cría, la cual durante los primeros tres días de

vida recibirá en forma de jalea real (la cual contiene aproximadamente un 14 % de proteína) y posteriormente serán alimentadas con una mezcla del polen con miel y secreciones glandulares que se conoce como “pan de las abejas”, el cual tiene un pH más bajo y menos almidón, lo que hace que tenga más valor nutritivo, esto se debe a la ligera fermentación ocasionada por bacterias propias del tracto digestivo pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Aguilar, 2014).

- **Lípidos:** El polen también proporciona otro tipo de nutrientes que son igualmente importantes para el desarrollo de las abejas y su cría. Los lípidos, por ejemplo, se encuentran formando entre un 0.8 % y 18.9 % del polen de diferentes especies vegetales, estos lípidos están compuestos principalmente por ácidos grasos y esteroides; los ácidos grasos son un componente esencial de los fosfolípidos, los cuales son elementos indispensables de la membrana celular. La adición de un 2 -4 % de lípidos abundantes de esteroides como el 24-metil-colesterol, incrementa el desarrollo de la cría (Brodschneider y Crailsheim, 2010).

Los lípidos se metabolizan principalmente durante la etapa de cría y son considerados como una importante fuente de energía, y como precursores de esteroides. Los lípidos pueden llegar a influenciar la obtención de recursos por parte de las pecoreadoras, ya que entre mayor cantidad de lípido en el polen, resulta más atractivo al pecoreo, aun cuando sea deficiente en otros nutrientes (Rueppell et al., 2006).

- **Vitaminas y minerales:** Debe existir una mezcla de vitaminas solubles en la dieta (A, D, E y K), sin embargo la vitamina B6 como la piridoxina es esencial (Anderson y Dietz, 1976).

Las abejas obtienen elementos inorgánicos principalmente a partir de polen, néctar y agua. Dentro de los principales requerimientos minerales se encuentran: potasio (1000 ppm), calcio (500 ppm), magnesio (300 ppm), sodio (50 ppm) así como trazas de zinc, manganeso, hierro y cobre (Herbert y Miller, 1987).

La obtención de los nutrientes depende directamente de la ingestión de alimentos, en el caso de las abejas, el sustento depende directamente de los recursos disponibles para la colonia, por ello las mismas abejas tienden a adaptar estrategias para subsistir de acuerdo con sus necesidades, así como al suministro de ciertos nutrimentos en específico. La calidad y cantidad de los nutrientes obtenidos son necesarias y responsables de ciertas características para las colonias de abejas como: la cantidad de prole producida, la longevidad y la salud de las abejas adultas de forma general, en la supervivencia y productividad de una colonia (Alqarni, 2006). A nivel individual influye en la masa corporal, la madurez sexual (Paoli et al., 2014) y en características reproductivas (Schlüns et al., 2003); en los zánganos específicamente aumenta la capacidad de eversión del endóforo y la calidad del semen, ya que se incrementa la producción de espermatozoides y existe una mejor viabilidad, dando como resultado un mayor éxito en el apareamiento (Koeniger et al., 2005a).

Hoy en día se conoce que cuando las colonias de abejas se enfrentan a una carencia de un nutriente esencial, su afectación será de diferente manera. Por ejemplo, la deficiencia de carbohidratos en la dieta se ve reflejado en el desarrollo de la colonia, reduciendo la cantidad de cría y por ende el comportamiento de pecoreo, asimismo incrementan comportamientos indeseables como el comportamiento defensivo y el pillaje (robo de recurso de colonias fuertes a colonias débiles), de igual forma la falta de carbohidratos en los zánganos afecta la viabilidad del semen, ya que son necesarios los azúcares como fuente de energía para los espermatozoides (Al-Lawati et al., 2009).

En el caso particular de las proteínas, cuando son deficientes afectan en la maduración de los músculos de vuelo, por lo que afectan igualmente el comportamiento de pecoreo, el desarrollo de glándulas como las hipofaríngeas, la reproducción en el caso de los zánganos y reinas ya que disminuye el tamaño y desarrollo de los órganos reproductores así como un deficiente sistema inmune (Stürup et al., 2013).

Asimismo las colonias sin suministro de polen pueden impedir que los adultos alimenten adecuadamente a las larvas o que impidan que las crías lleguen hasta la edad adulta. En un principio se mantendrá la cría sólo por un corto periodo de tiempo, primero utilizando el pan de las abejas almacenado y más tarde incurren en

un comportamiento ante la escasez de recursos como el canibalismo hacia las larvas más jóvenes; si la escasez de polen continúa, no puede ser producida más cría (Schmickl y Crailsheim, 2001). De ahí que la calidad o la cantidad de abejas adultas en la próxima generación pueden ser pobres, lo que podría afectar al estado nutricional de la colonia y por lo tanto influir en su productividad.

Otra consecuencia de la deficiencia de polen es la disminución de agentes antioxidantes como los flavonoides (Ross y Kasum, 2002; Martínez y González, 2002). Estos poseen propiedades químicas y biológicas que se relacionan con procesos metabólicos (Driver y Georgeou, 2003), inmunidad (Kohchi et al., 2009) y reproducción (Lee et al., 2008), debido a que protegen a las células ante los efectos de compuestos oxidantes. Dentro del ámbito reproductivo se ha estudiado la eficacia de los antioxidantes en el mejoramiento de la calidad del semen, se conoce que existe una relación positiva en cuanto a la morfología y motilidad espermática con la fertilidad de los mismos (Zalata et al., 1995; Halliwell y Gutteridge, 2015). Adicionalmente hay investigaciones que indican que la adición de los antioxidantes a ciertos diluyentes durante el proceso de criopreservación tiene éxito tanto en mamíferos (Giovanni y Edison, 2012) como en insectos (Chavacán, 2006).

El papel principal de los antioxidantes en cuestiones reproductivas de los machos es reducir las especies reactivas de oxígeno (EROS) que se producen de manera natural o por la manipulación de las células. Con ello se disminuye el estrés oxidativo e impedir el daño en la integridad estructural y fisiológica, de los espermatozoides (Sanocka y Kurpisz, 2004; Ogbuewa et al., 2010) cuyo efecto está directamente relacionado con la viabilidad y capacidad fecundante (calidad del semen). Entre los principales EROS que se conocen y tienen relación con la funcionalidad espermática están: anión super óxido, peróxido de hidrógeno y el hidroxilo (Sanocka y Kurpisz, 2004).

Los espermatozoides producen una gran cantidad de EROS los cuales son originados por la gran cantidad de mitocondrias presentes en la pieza intermedia del mismo en donde se lleva a cabo la reducción monovalente del oxígeno durante la fosforilación oxidativa (Turrens, 2003; Konigsberg, 2008).

Un daño en la integridad de los espermatozoides tendrá como consecuencia una alteración en la función espermática y por ende disminuirá la motilidad, vitalidad y pérdida de la capacidad fecundante. Entre los principales daños que se han

encontrado en mamíferos y en insectos se encuentran: un aumento en la permeabilidad de la membrana ocasionada por la lipoperoxidación de fosfolípidos (Bouvet et al., 2004; Halliwell y Gutteridge, 2015), daño a proteínas e inactivación de enzimas glucolíticas, que traen como consecuencia un bloqueo en la biosíntesis de ATP y la consiguiente pérdida de la motilidad por falta de combustible necesario para la contracción de los microtubulos flagelares de los espermatozoides, lesiones a las protaminas, las cuales estan presentes en la cromatina (Buffone y Calamera, 2004; Faten et al., 2014 ).

Para contrarrestar los efectos de los EROS, todo ser vivo tiene una red antioxidante que protege a las células de forma natural. Estos antioxidantes pueden ser de tipo enzimático (metaloenzimas) como la glutathion peroxidasa, super óxido dismutasa y catalasa (Cisneros y Céspedes, 1997; Halliwell y Gutteridge, 2015) así como no enzimáticos en donde encontramos vitaminas (E, C) y flavonoides. De igual forma algunos minerales como Zn, Se, Mn, Fe y Cu participan en la protección contra los daños oxidativos al participar dentro de los sistemas enzimáticos, ya sea como componentes estructurales o activadores, también son capaces de ejercer funciones antioxidantes en forma independiente (Chihuilaf et al., 2002).

En el semen de zángano se ha documentado la presencia de enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión S-transferasa y la superóxido dismutasa, siendo esta última la que se ha encontrado en mayor concentración tanto en zánganos mantenidos en laboratorio y en campo (Collins et al., 2004b; Faten et al., 2014). Por otro lado existen reportes de la presencia de minerales tanto en semen como en vesículas seminales los cuales podemos asociar a los agentes antioxidantes como lo son Mg, Fe, Mn y Cu (Gutiérrez 2011). Estos resultados demuestran que existe de igual forma una red antioxidante presente en el semen de los zánganos que contribuyen de forma general a la viabilidad de los espermatozoides, manteniendo la presión osmótica, el equilibrio ácido base, la permeabilidad tisular y movilidad espermática, mismos que se asocian al consumo de antioxidantes como los flavonoides provenientes del polen de las flores.

De acuerdo a todo lo anterior mencionado, resulta indispensable conocer y hacer un uso correcto de los recursos florísticos disponibles en el área, así como complementar las necesidades de las colonias mediante alimentos suplementarios

de forma artificial que eviten el déficit nutricional en las colonias, además de que aporten otras sustancias vitales como los antioxidantes.

La alimentación artificial es una técnica apícola utilizada para cubrir necesidades provocadas por las situaciones climáticas o por la propia manipulación del apicultor para la manutención de las colonias en época de escasez, estimular el desarrollo y crecimiento de las colonias así como para la cría intensiva de reinas y zánganos.

Desde el punto de vista de la biología de la abeja, es posible alimentarla artificialmente cuando la colmena lo requiera; sin embargo, las exigencias actuales del mercado obligan a establecer dietas con ingredientes que eviten la concentración de azúcares que no son propios de la miel. Para suplementar los carbohidratos se han utilizado diferentes insumos como la azúcar de caña (refinada o morena), siendo la más utilizada a nivel mundial debido a que es económica. Por lo general el azúcar se proporciona en forma de jarabe (azúcar: agua) a diferentes concentraciones dependiendo del manejo. Se utilizan concentraciones diluidas (0.7:1) para estimular el crecimiento de las colonias y concentraciones más altas (1:1) para mantener las poblaciones en época de escasez. También se puede utilizar jarabe de fructuosa, aunque es una buena fuente de carbohidratos no se recomienda debido a que puede ser tóxico para las abejas en ciertas situaciones.

En el caso de las proteínas, se han utilizado dietas con altos contenidos proteicos así como sustitutos de polen, sin embargo diversos estudios han demostrado que su digestibilidad es menor comparada con el polen, además de que el consumo de estos sustitutos dependen del método de aplicación. Debido a que los suplementos del polen no siempre son bien aceptados por las abejas, se recomienda colocarlos cerca del nido de cría y utilizar sustancias como aceite de anís, de hinojo o miel para lograr una mejor tolerancia. Una fórmula comúnmente recomendada es en base a harina de soya, levadura de cerveza y polen en proporciones 3:1:1, la cual se acerca al contenido proteico de la jalea real (De Grandi-Hoffman et al., 2008). No obstante, existen estudios que demuestran que la soya independientemente de las proteínas que aporta también contiene una gran cantidad de azúcares que son tóxicos para las abejas, además de la alta probabilidad de que esta sea transgénica y el riesgo de contener ciertos residuos, contaminando así la miel. Se han evaluado algunos ingredientes alternativos a la

harina de soya, como canola, girasol, sorgo, maíz y proteína animal como huevo, pero sin resultados significativos a causa de falta de palatabilidad o a la presencia de transgénicos. Debido a esto se han desarrollado una enorme variedad de suplementos alimenticios comerciales, los cuales pueden representar una alternativa más rentable hasta la fecha. Estos suplementos son de venta libre, de forma general contienen proteína en un 20% y otros ingredientes como minerales y vitaminas en 1-3%, igualmente tienen la ventaja de estar preparados en forma de polvo, con lo cual solo es necesario agregar un poco de miel y administrarlos directamente en las colonias en forma de tortas.

En la mayoría de los estudios que se han realizado a estos suplementos se reporta de forma general que estimulan el desarrollo de las colonias entre un 18-30% aumentando la producción de miel, estimulan la postura de la reina en un 18%, prolongan la longevidad en un 17 % en obreras y estimulan el sistema inmune ayudando a contrarrestar ciertas enfermedades. Sin embargo hasta la fecha existen pocos estudios de cómo estos suplementos podrían afectar el desarrollo de los zánganos así como la calidad de su semen.

#### **1.4 Evaluación de la calidad del semen**

El principal objetivo de un programa de mejoramiento genético es destacar las características biológicas que interesan al hombre siendo generalmente estas relacionadas con la producción, por ello es importante la fertilidad potencial del semen antes de ser utilizado para la inseminación, con fines de conservación y económica. En este sentido se han comenzado a realizar varias investigaciones para contribuir al conocimiento en la temática, que junto a distintos métodos han permitido explorar aspectos de la estructura y función espermática en los zánganos. En la literatura científica hay pocos estudios disponibles que informen sobre la calidad del semen de zánganos (*Apis mellifera* L).

El análisis del semen permite valorar diversos aspectos como el volumen de eyaculado, la motilidad, la viabilidad, la concentración y la morfología espermática (Capel, 2011; Cerezo y Castilla, 2014).

La motilidad espermática, valora el porcentaje de espermatozoides que presentan un movimiento progresivo; en particular los espermatozoides de los zánganos parecen estar a menudo inmóviles aún estando vivos. La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación visual de una muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina a 37°C. En el eyaculado de los zánganos, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal, definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Normalmente la motilidad masal se valora de forma subjetiva como muy buena, buena, regular y mala según la clasificación de Lensky et al., (1979) y de Barth et al., (2006). Una motilidad muy buena es cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y mala cuando no se observa movimiento en ondas. Tras la dilución del eyaculado fresco con Kiev o agua desionizada, se estima la motilidad individual, es decir el porcentaje de espermatozoides individuales que entran en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivos o no progresivos), en este caso la valoración se realiza de acuerdo a una clasificación o escala (0-4) realizada por Locke y Peng (1993).

En cuanto a la viabilidad espermática, esta se refiere a la integridad de la membrana espermática, este tipo de pruebas se basan en protocolos de doble tinción con la finalidad de diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos. Entre dichos protocolos cabe mencionar a la técnica dual con eosina y nigrosina, y la técnica con tintes fluorescentes. La primera evalúa la viabilidad en base a la asociación del colorante eosina por la cabeza del espermatozoide, donde los espermatozoides vivos no muestran una captación del colorante, mientras que los espermatozoides muertos hay una captación parcial o completa. La segunda se basa en fluorocromos como el SYBR 14 que tiñe los ácidos nucleicos de los espermatozoides vivos y es permeable a la membrana a diferencia del yoduro de propidio que no es capaz de atravesar la membrana de las células vivas, pero es capaz de penetrar y teñir el ADN nuclear de los espermatozoides muertos o degenerados. Ambas técnicas han sido utilizadas tanto en el semen de eyaculado como el proveniente de las vesículas seminales con rangos entre un 83 a 100% de células viables (Collins y Donoghue, 1999).

De igual forma la concentración de espermatozoides en el líquido seminal se ha utilizado tradicionalmente para la evaluación de la calidad espermática. El método estándar para determinar la concentración (espermatozoides/ml esperma) en el semen de los zánganos utiliza un hematocitómetro o una cámara de recuento (neubauer) para contabilizar los espermatozoides en la muestra. Para zánganos *Apis mellifera* L, han sido reportadas grandes variaciones, con recuentos que varían de  $4 \times 10^6$  -  $11.4 \times 10^6$  espermatozoides/ $\mu$ l de semen.

La morfología espermática, ha sido otro parámetro extensamente estudiado, pero la descripción de alteraciones morfológicas ha sido presentada en pocos trabajos. En este caso se realiza la evaluación del porcentaje de espermatozoides con forma normal, debido a que se correlaciona con la capacidad fecundante. Los espermatozoides morfológicamente anormales, producen EROS, los cuales al sobrepasar los sistemas de regulación antioxidante dañan al ADN. Para la evaluación de las características de los espermatozoides varios protocolos de tinción se han utilizado como la eosina y rosa de bengala. De acuerdo a las diferencias en tamaño, estructura y forma de los espermatozoides de zángano, las anomalías se encuentran en cabeza y cola. Entre las anomalías observadas han sido mencionadas: colas enrolladas (19.83 %), rotas (12.75%), y dobles (6.42 %), cabezas dobles (2.25 %), (Tariyah et al., 1999).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La cría de abejas reinas y zánganos cumple un papel importante dentro de la producción apícola de miel a nivel nacional, ya que esta actividad determina la genética de las poblaciones de abejas y por ende sus características productivas. En México desafortunadamente, existen menos de 50 criadores de abejas reinas en el país, los cuales producen alrededor de 300 mil abejas reinas anualmente, por lo que no se satisface la necesidad del país que es de 1.8 millones de colmenas, por esta razón es necesario implementar técnicas y desarrollar herramientas para los programas de mejoramiento genético. A nivel mundial la mayoría de las investigaciones realizadas a los zánganos tienen que ver con cuestiones patológicas, sin embargo falta enfatizar de forma general el aporte genético y reproductivo que los zánganos representan, así como la gran inversión nutricional que significa el criar zánganos utilizando suplementos alimenticios.

En cuestiones reproductivas a la fecha no ha sido elaborado un análisis que aborde varias características de interés simultáneamente como la presencia de ciertas enzimas o elementos minerales, tampoco hay patrones estandarizados ni de referencia para la especie en México. Además de que en la mayoría de los criaderos de reinas no se llevan a cabo análisis de evaluación de semen de forma rutinaria. Por ello es imprescindible realizar estudios que nos detallen ciertas técnicas de manejo y evaluación de semen, siendo que la calidad espermática es esencial cuando se quiere aumentar la eficiencia de la inseminación instrumental especialmente dentro de un programa de mejoramiento genético. El conocimiento de las diferentes características fisiológicas de los espermatozoides permitirá mejorar los protocolos de inseminación tanto en la manipulación como en el almacenamiento del semen. Además, el control de la calidad del semen es importante en la selección de los reproductores.

Este trabajo pretende generar información a los criadores de reinas sobre la importancia del zángano en los sistemas de reproducción, enfatizando su importancia biológica y económica que implica conocer la fertilidad potencial del semen antes de ser utilizado en la inseminación.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar comparativamente el efecto de un suplemento alimenticio comercial sobre la producción de zánganos y su relación con la calidad del semen y vesículas seminales.

#### **Objetivos específicos:**

- Analizar el efecto de un suplemento alimenticio comercial sobre el número, peso corporal y ejes torácico y abdominal en zánganos.
- Evaluar el semen con respecto al volumen, concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática utilizando un suplemento alimenticio comercial.
- Determinar el efecto de un suplemento alimenticio comercial en la calidad del semen mediante la concentración de elementos minerales (Cu, Se, Zn, Mg, Ca y P).
- Determinar el efecto de un suplemento alimenticio comercial en la calidad del semen en vesículas de zánganos mediante la concentración de elementos minerales (Cu, Se, Zn, Mg, Ca y P).
- Comparar la concentración de elementos minerales (EM) en el semen proveniente de eyaculado y vesículas seminales.
- Identificar la correlación de la concentración de EM, con el incremento de la calidad del semen.
- Correlacionar comparativamente la suplementación alimenticia del efecto sobre los zánganos y peso con la calidad del semen.

### **4. HIPÓTESIS**

La suplementación alimenticia aumentará la producción de zánganos y mejorará la calidad del semen y vesículas seminales por el contenido de nutrientes

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Localización del área de estudio

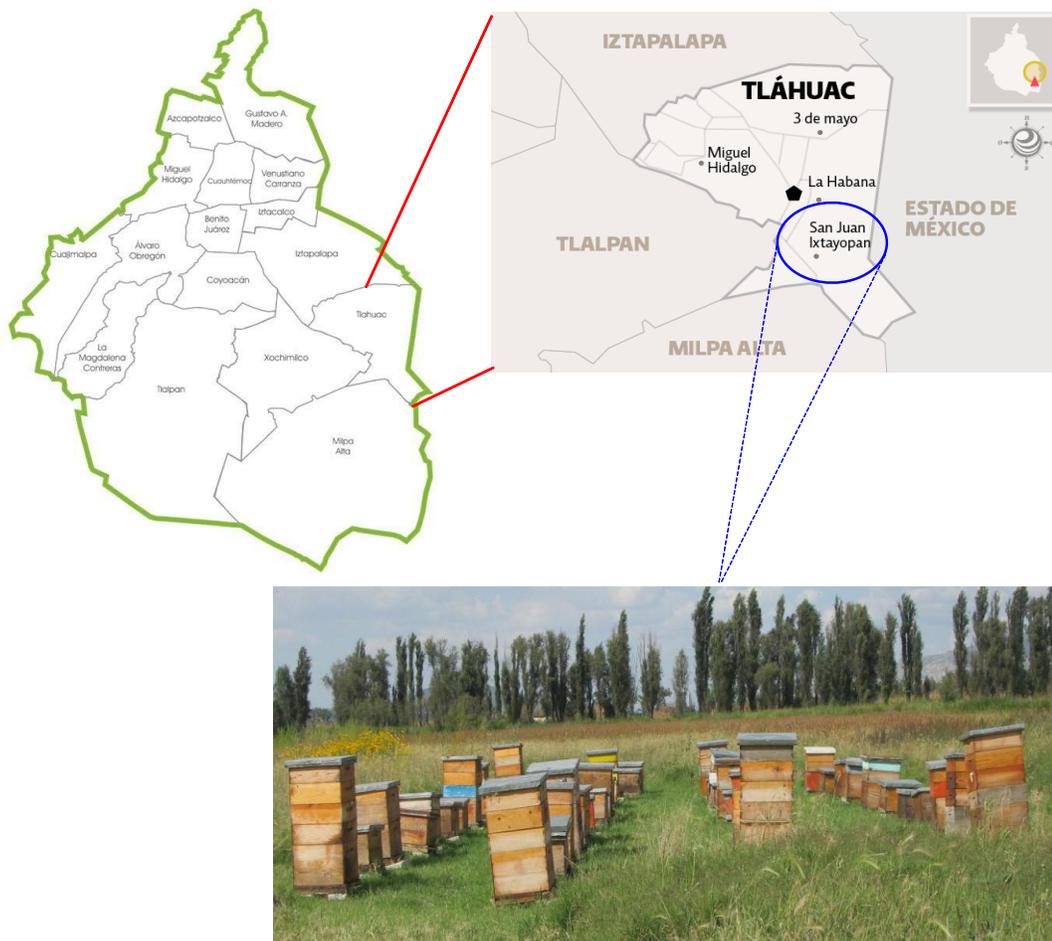
El trabajo de campo se realizó en el municipio de San Juan Ixtayopan, en la Delegación Tláhuac, Ciudad de México durante los meses de julio a septiembre. Este municipio se encuentra ubicado al sur de la delegación Tláhuac, colinda con los pueblos de Santiago Tulyehualco y San Antonio Tecomitl. Este municipio se caracteriza por sus prácticas intensivas en agricultura relacionadas con las chinampas. El clima predominante de la región es templado sub-húmedo, con una temperatura anual de 16°C. La temperatura mínima promedio es de 8.3° C y la máxima de 22.8°C. Su precipitación pluvial promedio es de 533.8 mm al año, siendo en los meses de junio y agosto donde se registran las mayores precipitaciones.

Las actividades de laboratorio se realizaron en el Centro de Educación Ambiental Acuexcomatl (CEA), ubicado en la delegación Xochimilco y en el laboratorio de Toxicología en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), en Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

### 5.2 Establecimiento del apiario experimental

Se trabajó en el apiario conocido como “San Juan”, el cual cuenta con 20 colmenas tipo Jumbo (**Figura 5**). Dentro de este se establecieron 4 colonias híbridas de abejas (*Apis mellifera carnica*) comúnmente conocidas como carniolas para producir zánganos. Las colonias fueron las unidades experimentales en el análisis y se agruparon en dos grupos de dos colonias cada uno, las colonias de cada grupo se eligieron al azar dentro del apiario.

En las colonias elegidas se realizó una revisión de rutina para verificar la presencia de la reina y que las colonias no presentaran enfermedades. Consecutivamente las colonias se homologaron en cuanto a cría y reservas de alimento.



**Figura 5. Ubicación geográfica del Apiario “San Juan”, en San Juan Ixtayopan en la Delegación Tláhuac dentro de la Ciudad de México.**

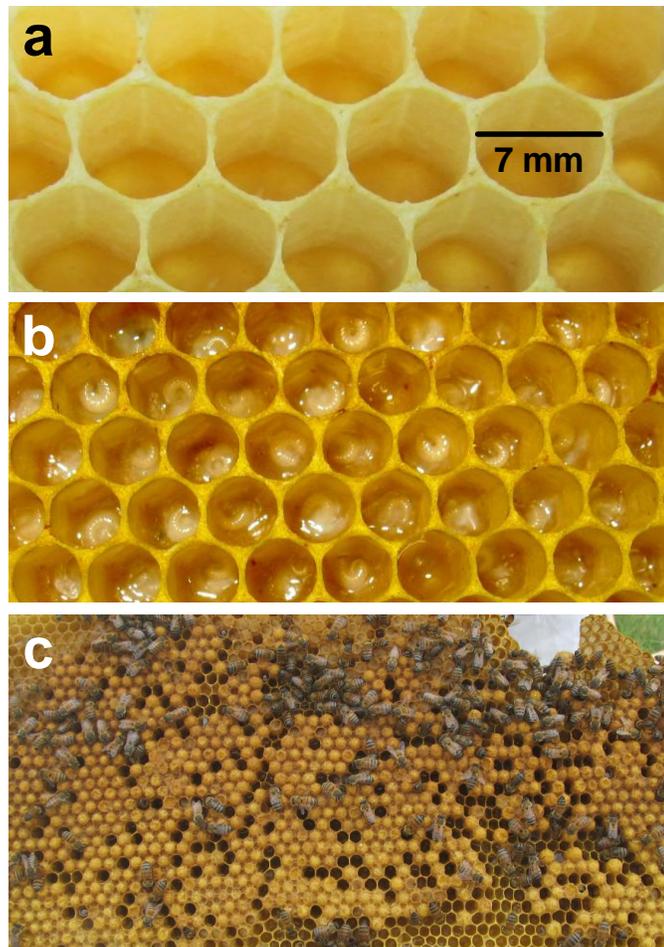
### **5.3 Establecimiento de las colonias experimentales**

Las 4 colonias de abejas, se alojaron en colmenas tipo jumbo, con un alza. Cada colmena se constituyó de la siguiente forma:

- 4 bastidores con cría en diferentes estados de desarrollo
- 1 bastidores con alimento (miel)
- 1 bastidores con alimento (polen)
- 2 bastidores con cera estampada
- 1 alimentador tipo Doolittle

#### 5.4 Cría de zánganos

La cría de zánganos comenzó a principios del mes de agosto, para criar a los zánganos, se introdujo en cada colmena un bastidor específico para zánganos, es decir, una hoja de cera estampada al centro de la colmena. La hoja de cera estampada posee celdas de 7 mm (**Figura 6a**). Esta cera se introdujo desde que se homologaron las colonias y empezó la alimentación a base del suplemento comercial así como de jarabe. La colocación de las hojas de cera estampada fue con la finalidad de que la reina deposite los huevos para zánganos, estos se desarrollen (larva y cría operculada), (**Figura 6 b y c**) y emerjan a los 24 días.



**Figura 6. Cría de zánganos:** a) Celda estampada para la cría de zánganos mostrando la forma y tamaños característicos, b) Celdas con cría (larvas) y c) Celdas operculadas.

Una vez que fueron operculados los panales con cría de zánganos (14 días aproximadamente), estos se colocaron dentro de unas jaulas de confinamiento (**Figura 7a**). La jaula de confinamiento fue de con un marco de madera y malla de alambre galvanizado de 5 cuadros por pulgada, midió 46 cm de largo x 28 cm de alto y 5 cm de ancho. Las jaulas con el bastidor adentro se colocaron de igual forma al centro de la colmena (**Figura 7b**). A través de las paredes de la jaula podían pasar las obreras para seguir manteniendo la cría de zángano. Se esperó el desarrollo total de la cría y emergencia de los zánganos, una vez que ya se encontraron los zánganos emergidos, estos permanecieron durante 18 días más enjaulados hasta que alcanzaron la madurez sexual para su colecta.



**Figura 7. a) Enjaulado de bastidor con cría de zángano y b) Introducción de jaula de confinamiento.**

### **5.5 Manejo de las colonias experimentales**

Las colonias se revisaron cada semana apartir del mes de agosto y fueron alimentadas por 5 semanas de acuerdo a su grupo experimental. Un grupo recibió una alimentación (dieta) a base de jarabe de azúcar solamente (Grupo control), el otro grupo (grupo suplementado) recibió una alimentación (dieta) a base de un jarabe de azúcar y un suplemento alimenticio comercial. El suplemento administrado tiene una fórmula con 60% de Proteína cruda, 5 % de grasa y 6 % de humedad, además de aminoácidos, vitaminas y minerales (**Anexo 1**). Su presentación es en polvo en bultos de 20 kg. El alimento se les suministroo a los grupos de la siguiente forma (**Cuadro 2**):

**Cuadro 2. Régimen de Alimentación (Dieta)**

	<b>Jarabe</b>	<b>Suplemento Alimenticio Comercial</b>
<b>Grupo Control</b>	4 L proporción 1:1 (1 kg azúcar/1 L agua) semanalmente	_____
<b>Grupo Suplementado</b>	4 L proporción 1:1 (1 kg azúcar/1 L agua) semanalmente	500 gr dos veces (semana 1 y 4)

El jarabe se preparó utilizando azúcar estándar, éste fue colocado en los alimentadores tipo Doolittle. En el caso del suplemento alimenticio, este se preparó en forma de torta, a la cual se le añadió un poco de miel como atrayente para las abejas. Las tortas se colocaron sobre los cabezales de los bastidores de la cámara de cría (**Figura 8**).



**Figura 8. Alimentación con jarabe y suplemento en forma de torta.**

### **5.6 Colecta de zánganos**

Una vez que los zánganos alcanzaron la madurez sexual (18 días), las jaulas de confinamiento se retiraron de las colmenas y fueron trasladadas al laboratorio del CEA Acuexcomatl. A continuación, se les sacudió para retirar la mayor cantidad de abejas obreras, consecutivamente las jaulas se colocaron dentro de una cámara de vuelo para poder abrirlas y liberar a los zánganos adultos. A través de una abertura de la cámara de vuelo se colectaron manualmente los zánganos de forma individual. La cantidad de zánganos que se utilizó por colmena varió dependiendo

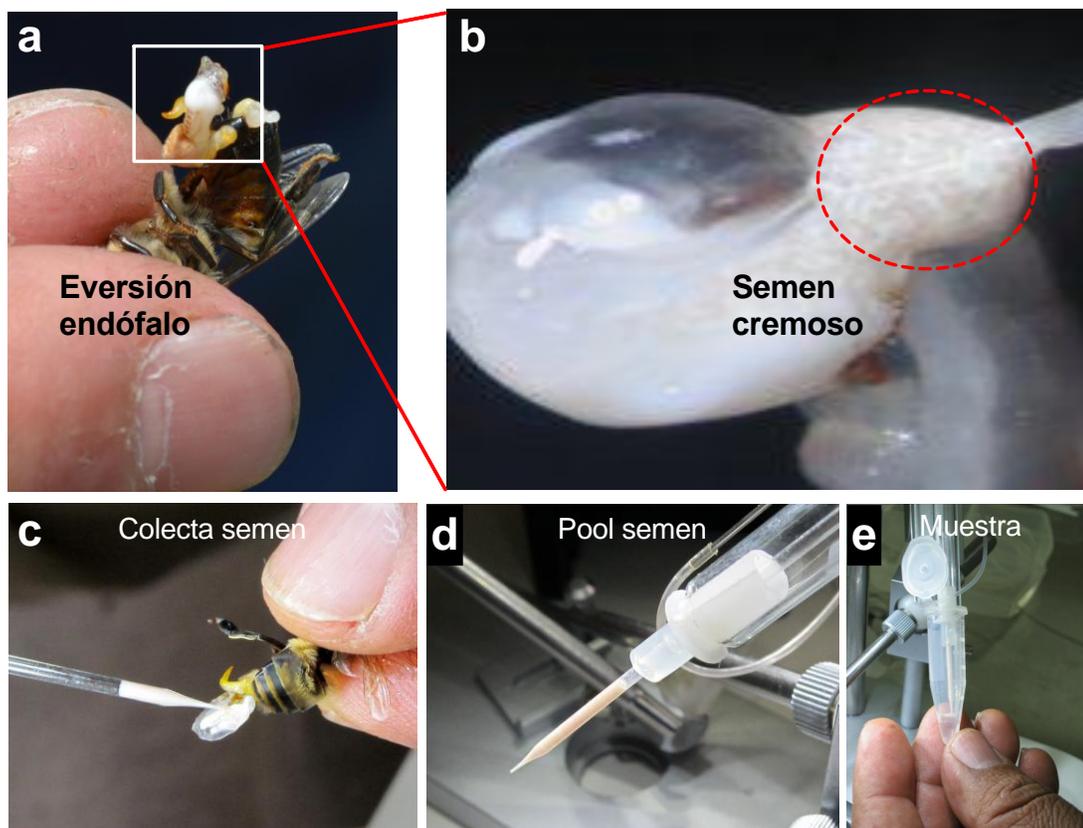
de la prueba realizada, así como de la cantidad de los zánganos totales producidos por colonia.

### 5.7 Toma de muestras

**Zánganos vivos:** Se tomaron 30 zánganos de la cámara de vuelo de cada colmena, los cuales se utilizaron para evaluar la variable de peso, índice abdominal y de tórax, así como volumen de eyaculado.

**Semen:** Para colectar el semen de los zánganos, se fueron tomando uno por uno directamente de la cámara de vuelo, se les estimuló para que defecaran; para la eyaculación y eversión del endófalos se tomó 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 endófalos se sigue apretando el abdomen y la base del endófalos hasta exponerlo completamente y empieza a salir el semen, el cual se observó por su color cremoso (**Figura 9**). El semen de varios zánganos (pool) de cada colmena se recolectó con una punta de vidrio adaptada a una microjeringa Hamilton (100 µl), además se utilizaron 2 µl de solución salina estéril, con 0,05% de dihidroestreptomicina, como lubricante para la punta de la jeringa y como bactericida, entre cada zángano. Se obtuvieron a partir de los pools de semen de cada colmena 70 µl, dependiendo de la prueba a realizar se hizo lo siguiente:

- **Concentración espermática y motilidad:** se tomaron 10 µl de semen aproximadamente en un tubo Eppendorf de 0.5 ml, el cual se mantuvo a temperatura ambiente hasta su análisis.
- **Viabilidad y morfología espermática:** se tomaron 30 µl de semen y se diluyeron en 70 µl de Kiev, en un tubo Eppendorf de 0.5 ml, el cual se mantuvo a temperatura ambiente hasta su análisis.
- **Concentración de minerales:** se tomaron 30 µl de semen y se diluyeron en 70 µl de agua desionizada, en un tubo Eppendorf de 0.5 ml, el cual se mantuvo en congelación hasta su análisis.



**Figura 9. Proceso de colecta de semen de zánganos. (a)** Eversión total del endófalo, **(b)** Muestra del semen de zángano delimitado en un círculo, **(c)** Obtención del semen del endófalo con una punta de vidrio, **(d)** Pool de semen colectado, **(e)** Deposición del semen en tubos Eppendorf.

**Vesículas seminales:** Se colectaron 25 zánganos por colmena, estos fueron eutanasiados con acetato de etilo para consecutivamente hacer la disección de las vesículas seminales mediante la técnica de Norman et al., (2013). Cada zángano se colocó en posición dorso-ventral sobre una caja de Petri y se fijó del tórax y abdomen con alfileres entomológicos. Con un microscopio estereoscópico y pinzas entomológicas, se comenzó la disección del abdomen, retirando el exoesqueleto y los músculos sin dañar las glándulas mucosas. Se prosiguió a retirar el intestino y las glándulas del moco, se localizaron las vesículas seminales y se retiraron con cuidado; estas se colocaron en tubos Eppendorf, siendo 25 pares de vesículas por tubo, a cada tubo se le añadió 70  $\mu$ l de agua desionizada. Los tubos se mantuvieron en congelación hasta su posterior análisis.

## 5.8 Evaluaciones

### 5.8.1 Evaluación de la cría de zánganos y morfometría

Durante el desarrollo de las colonias se estimó la producción de zánganos, evaluando la cantidad de cría operculada por bastidor por medio de imágenes digitales. El número de celdas operculadas se contaron a partir del día 14, posteriores a la colocación de las hojas de cera estampada para zángano.

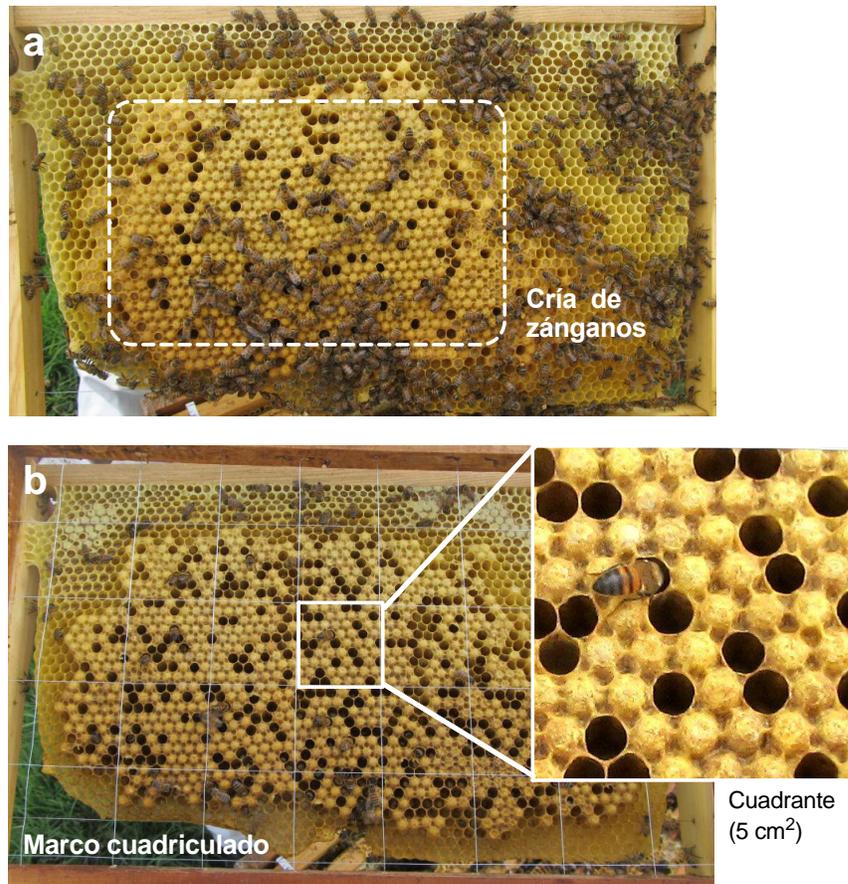
El conteo de las celdas operculadas se hizo con el auxilio de un marco de madera de 42 cm de largo por 24 cm de ancho, dividido con alambre en cuadrados de 5 cm<sup>2</sup>. Para el conteo, el marco se colocó sobre el panal de cría de zángano, al cual se le tomó una foto, después la cantidad de cría total (cría operculada) se calculó sumando la cantidad de celdas operculadas por cuadrante y por cada cara del bastidor (**Figura 10**).

#### ➤ Evaluación del peso de los zánganos

Una vez en el laboratorio, se tomaron 30 zánganos, los cuales se pesaron individualmente con una báscula digital y se obtuvo el peso promedio de los mismos en miligramos. Para poder pesar a los zánganos fue necesario introducirlos en un tubo a cada uno sobre la báscula (**Figura 11**). Se registró el peso de cada zángano.

#### ➤ Evaluación del tórax e índice abdominal de los zánganos

De los mismos 30 zánganos, fueron medidos utilizando un vernier digital (**Figura 12**). Primero se midió la anchura del tórax en su parte más grande, posteriormente se evaluó el ancho y el largo del abdomen (desde el propodeum hasta el noveno tergito). En el caso del abdomen se calculó un índice abdominal (IA) multiplicando el ancho por el largo del abdomen.



**Figura 10. Evaluación cría de zánganos.** a) Celdas para la cría de zánganos operculadas y b) Marco cuadrículado para evaluar la cría de zánganos. En b se presenta un acercamiento a uno de los cuadrantes que se utilizó para realizar los conteos.



**Figura 11. Pesaje de zánganos.**



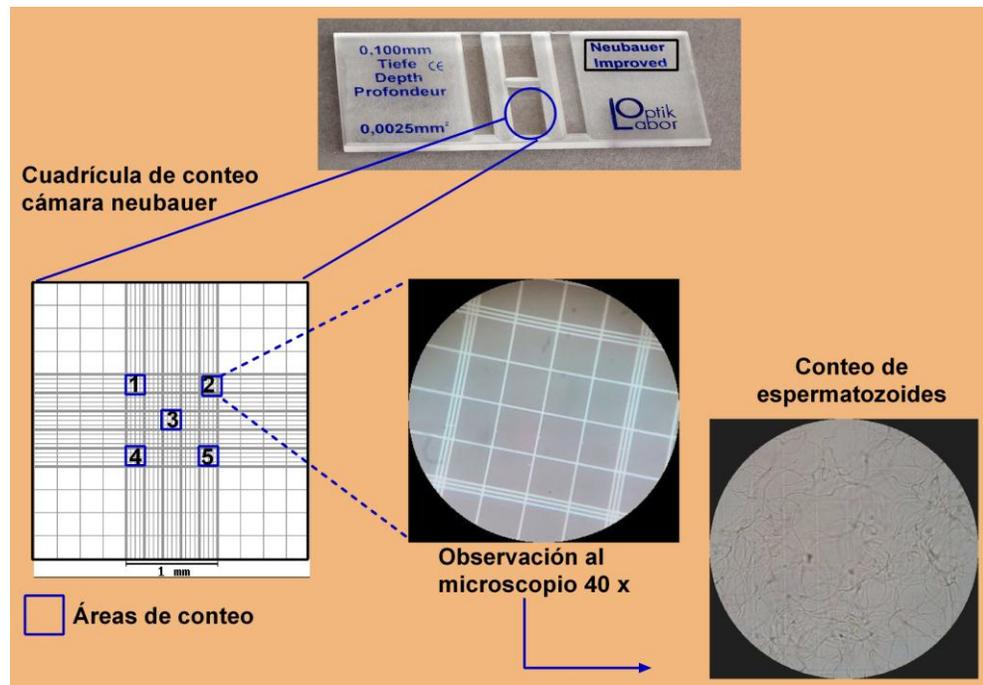
**Figura 12. Medición del IA.**

### 5.8.2 Evaluación de la calidad del semen:

El análisis del semen se realizó considerando los parámetros de volumen de eyaculado, concentración espermática, motilidad espermática, viabilidad y morfología de cada una de las muestras con microscopía de campo claro.

- **Volumen de eyaculado:** Se obtuvo un volumen promedio de los zánganos de cada colmena, considerando la cantidad de zánganos que se utilizaron para obtener un tubo Eppendorf con 30  $\mu\text{l}$  de semen.
- **Concentración espermática:** Para calcular el número de espermatozoides por muestra, se hizo un conteo utilizando una cámara de Neubauer. Se tomó la muestra correspondiente de semen (sin ningún diluyente). Después dependiendo de la cantidad de  $\mu\text{l}$  de semen; este se diluyó en glutaraldehído al 0.2%. Por cada  $\mu\text{l}$  de semen se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de esta solución. De la mezcla resultante, se tomaron 10  $\mu\text{l}$  de la dilución en cada lado de la cámara.

Se realizó el conteo de espermatozoides contabilizando 5 cuadros de ambas cámaras ( $0.1\text{mm}^3 = 0.1\mu\text{l}$ ), (**Figura 13**) con 4 repeticiones, utilizando un microscopio con un objetivo de 40x. Los espermatozoides se contabilizaron siempre y cuando la cabeza del espermatozoide estuviera dentro de la cuadrícula correspondiente.



**Figura 13. Cámara de neubauer Improved (hemocitómetro) para el conteo.** Se presenta un acercamiento de unas de las cámaras en donde se señalan las cinco cuadrículas a contar, así como la vista de una de estas cuadrículas y un ejemplo de cómo se observan los espermatozoides para su conteo.

- **Motilidad masal:** Para la valoración del movimiento en masa, se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos seco y templado a 37° C, se cubrió con un cubreobjetos y se observó la onda, remolinos u “olas” en un microscopio óptico con un aumento de 100x. Se dio una calificación arbitraria al movimiento característico de la especie como: Muy bueno, bueno, regular y malo, de acuerdo a la siguiente referencia (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3. Referencia para la evaluación de motilidad masal**

<b>Malo (M)</b>	Escasa o ninguna motilidad
<b>Regular (R)</b>	Sin remolinos, pero con oscilaciones generalizados
<b>Buena (B)</b>	Remolinos y ondas más lentas
<b>Muy buena (MB)</b>	Movimiento en ondas rápido y vigoroso (olas)

(Tomada de Barth et al., 2006)

- **Motilidad espermática:** La motilidad espermática consistió en la distinción subjetiva de los tipos de movimientos de los espermatozoides. Esta se evaluó por duplicado bajo un microscopio óptico con un objetivo de 100x. Para ello se colocó una gota de la muestra de semen diluida con Kiev (**Anexo 2**) en una proporción (1:10), sobre un portaobjetos atemperado y colocando un cubreobjetos. La motilidad se estimó utilizando una escala arbitraria que va desde 0 a 4, según la escala de Locke y Peng (1993), (**Cuadro 4**). Este procedimiento se realizó en cada muestra a las 24 horas de su colecta y a los 7 días posteriormente.

**Cuadro 4. Referencia para la evaluación de la motilidad espermática**

<b>0</b>	<b>Sin movimiento</b>
<b>1</b>	Menos 50% movimiento vibratorio
<b>2</b>	Mas 50% movimiento vibratorio
<b>3</b>	Presencia movimiento circular y progresivo, 50 % movimiento vibratorio
<b>4</b>	Mas de 50% de espermatozoides con movimiento circular y movimiento progresivo

(Tomada de Locke y Peng, 1993)

- **Viabilidad espermática:** La viabilidad espermática se determinó mediante la Tinción de Eosina Nigrosina (EN), que evalúa la integridad de la membrana celular, diferenciando células vivas de muertas.  
Para determinar la viabilidad espermática, sobre un portaobjetos se mezclaron 5 µl de semen diluido con 5 µl de la solución de eosina nigrosina, se realizó un frotis a lo largo del portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Las muestras se evaluaron bajo un microscopio óptico a 100x. Los espermatozoides viables no muestran tinción puesto que su membrana excluye el colorante, visualizándose brillantes sobre el fondo oscuro, mientras que los espermatozoides con membrana plásmatica alterada permitieron la entrada del colorante y se tiñeron de forma parcial o total (**Figura 14**).



**Figura 14. Tinción Eosina-Nigrosina, espermatozoides vivos y muertos.**

El porcentaje de viabilidad se evaluó por cuadruplicado contando un mínimo de 200 espermatozoides por muestra, empleando el criterio de inclusión-exclusión, donde los espermatozoides teñidos se consideraron no viables y los no teñidos y traslucidos, viables. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ espermatozoides viables}}{\text{N}^\circ \text{ espermatozoides totales}} \times 100 \%$$

- **Morfología espermática:** Para la evaluación de la morfología, en un portaobjetos, se realizó un frotis de la muestra espermática, se dejó secar a temperatura ambiente y se tiñó con EN. Se analizaron 200 espermatozoides con el microscopio óptico a 100X. Se abarcó la mayor parte de la laminilla, haciendo el movimiento de guarda griega para no volver sobre las mismas células ya evaluadas, y contarlas más de una vez. Se consideró como anormal, aquel espermatozoide que presentó alteraciones morfológicas en cabeza y flagelo (Lodesani et al., 2004).

### 5.8.3 Evaluación de concentración de elementos minerales en semen y vesículas seminales

Las muestras de semen y vesículas seminales fueron descongeladas a temperatura ambiente, posteriormente fueron pesadas en una balanza analítica (ADAM, modelo PW124, capacidad 120 gr  $\pm$  0.0001 g), dentro de un tubo de ensaye de 10 ml, que previamente fue sometido a una tara en la báscula. A continuación fueron expuestas a una digestión ácida abierta mediante la técnica empleada en el laboratorio de Toxicología, la cual consiste en adicionar 1.5 ml de ácido Nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) para eliminar la materia orgánica, se colocaron a baño María con la ayuda de un termo platina a una temperatura de 120 °C, durante 4 horas aproximadamente hasta que las muestras estuviesen completamente digeridas. Posteriormente las muestras se filtraron y aforaron a 5 ml con agua desionizada y se colocaron en tubos de ensaye con su tapón, se almacenaron, identificaron y se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4° C hasta su lectura.

La medición de los elementos minerales se realizó con 2 ml de cada muestra mediante espectrometría de absorción atómica, en el caso de selenio se midió con un generador de hidruros acoplado al Espectrofotómetro de absorción Atómica. Se siguió la metodología señalada en el manual de operación del fabricante del equipo *AAAnalys 100 (Atomic Absorption Spectrometry), Perkin Elmer INC.*

Para la medición de los elementos Mg, Ca, Cu, Zn y Se, se especificaron las siguientes variantes en cada uno: longitud de onda, apertura espectral, sensibilidad, lámpara de cátodo hueco, gases para la flama (acetileno y aire).

La medición de P fue por colorimetría con vanadato de amonio. En un tubo de ensayo se colocaron 0.5 ml de la muestra, más 2 ml de vanadato de amonio y se aforo a 10 ml con agua desionizada.

Para el cálculo de la concentración de elementos minerales en semen y vesículas se realizó lo siguiente:

- Se obtuvo la absorbancia de los estándares de cada elemento leído, así como de cada muestra de semen y vesículas, diferenciando entre tratamientos (suplementación alimenticia y colmenas).
- Se realizó una regresión lineal simple, para obtener el coeficiente de regresión, la intersección de eje y la pendiente entre las partes por millón

(ppm) y la absorbancia de los estándares, utilizando el programa computacional Microsoft Excel ®.

- Se obtuvo la concentración inicial o CI (ug/ml) de los elementos minerales de cada una de las muestras a través de la siguiente fórmula:

Donde:

Y= concentración

a= intersección eje

b= pendiente

x= absorbancia

$$Y = a + b(x)$$

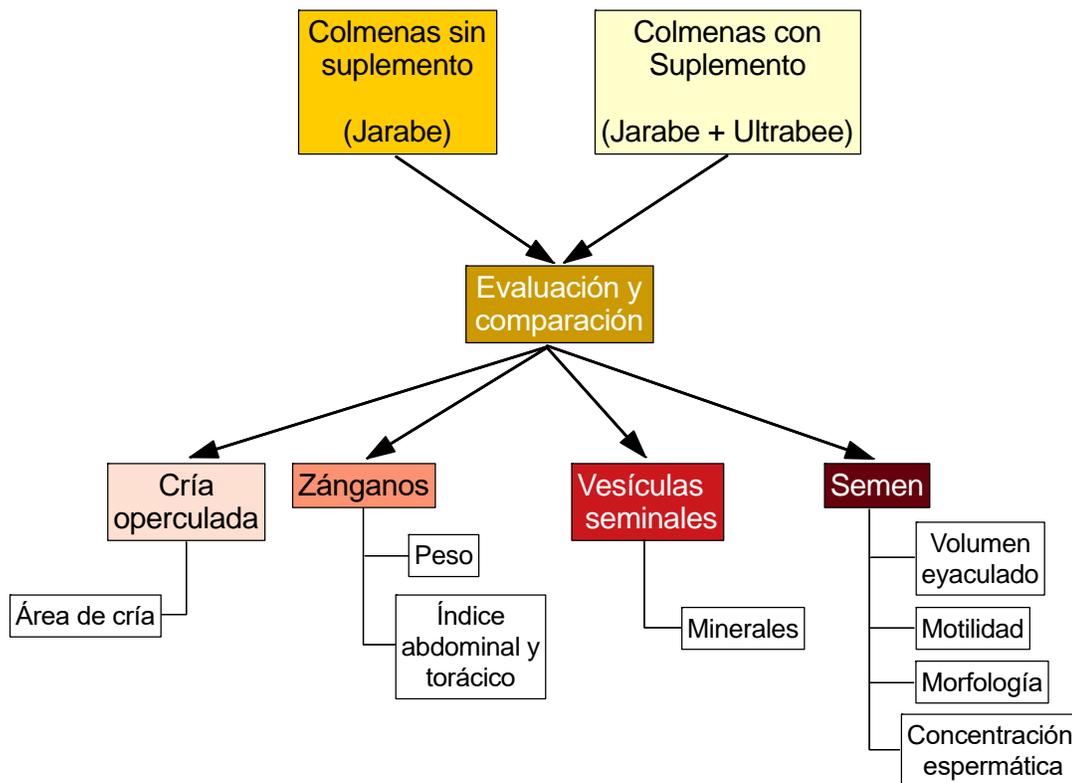
- Para obtener la concentración inicial de cada elemento o CI (ug/ml) se realizó el cálculo para la obtención de la concentración de cada elemento mineral por gramo de muestra (ug/g) con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración por gramo de muestra} = \frac{\text{CI} \times \text{aforo}}{\text{Peso muestra (g)}}$$

- Para el caso del cálculo de la concentración en microgramos del P se realizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración en mg del elemento por gramo de muestra} = \frac{\text{CI} \times \text{aforo}}{\text{peso muestra (g)}}$$

En la siguiente **Figura 15** se resume el diseño experimental del estudio.



**Figura 15. Diseño experimental.**

## 5.9 Análisis estadístico

La comparación entre grupos de abejas control y suplementadas se realizó mediante una prueba *t* de Student a dos colas para medias independientes. Para comparar el porcentaje de frecuencias acumuladas del peso de los zánganos de ambos grupos se utilizó un ajuste no lineal de tipo Gaussiano para datos acumulados. Adicionalmente se realizó una prueba de hipótesis para comparar si los datos de ambos grupos tenían la misma forma, para ello se comparó mediante una prueba F para suma de cuadrados extra la hipótesis nula de que ambos sets de datos se ajustaban a una sola curva.

Todos los datos se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar y en todos los casos se consideró un valor de  $p < 0.05$  como significativo. Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.).

Mientras que para los datos de las características de motilidad y morfología espermática se analizaron mediante estadística descriptiva así como los datos de la concentración de minerales en semen y vesículas seminales.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluación de la cría de zánganos y morfología

En cuanto a la cría de zánganos, las colonias sin suplemento alimenticio criaron 37.5% más celdas de zánganos que las colonias suplementadas (**Figura 16**). En promedio las colonias sin suplemento produjeron  $885.8 \pm 143.4$  celdas por cara del bastidor, lo cual resultó significativamente mayor ( $p < 0.05$ ,  $t = 1.96$ , g.l. = 6) al ser comparado contra el promedio de celdas de las colonias suplementadas ( $644.0 \pm 200.2$  celdas por cara del bastidor).

Con respecto a la morfología se encontraron diferencias entre el peso promedio de los zánganos de ambos grupos (**Figura 17a, panel izquierdo**).

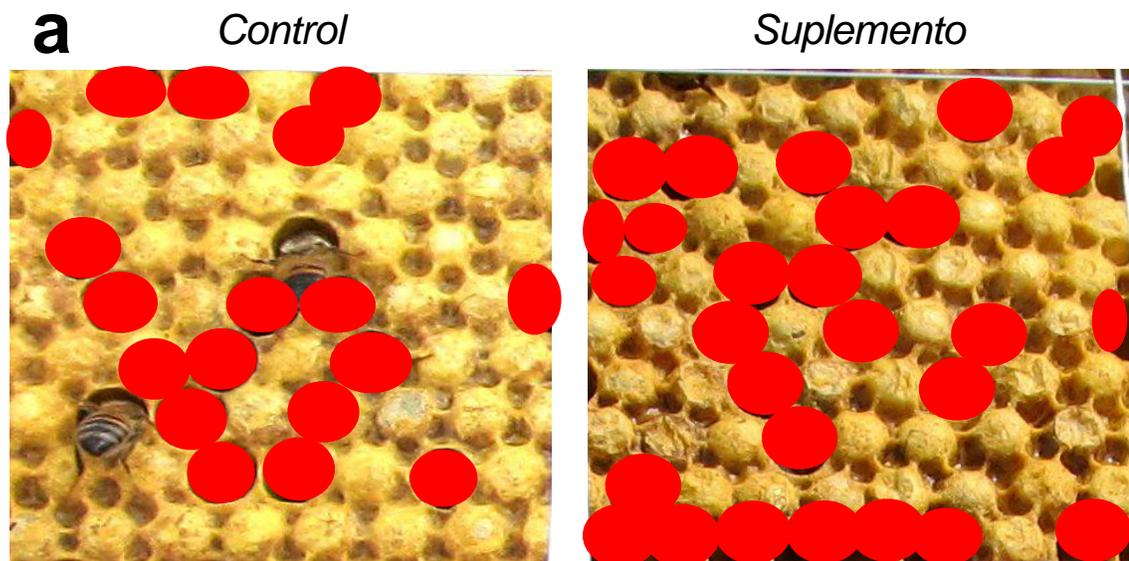
Los zánganos de las colonias control pesaron en promedio  $201.8 \pm 21.21$  mg, mientras que el peso promedio de los zánganos provenientes de las colonias suplementadas fue de  $223.1 \pm 22.23$  mg ( $p < 0.001$ ,  $t = 5.36$ , g.l. = 118), lo cual indicó que en las colonias suplementadas se incrementó en 10.5% el peso corporal.

De hecho, cuando se observaron las curvas de frecuencia acumulada se observó que el peso de los zánganos que recibieron el suplemento se desplazó hacia la derecha indicando un mayor peso corporal en los individuos analizados y diferencias significativas en la forma de la curva entre ambos grupos (**Figura 17a, panel derecho**).

Por otra parte, el índice abdominal presentó valores similares entre ambos grupos (45 mm), (**Figura 17b**,  $t = 0.70$ , g.l. = 118;  $p > 0.05$ ).

En contraste, el tórax los zánganos provenientes de las colonias suplementadas fue significativamente mayor (5.41 mm) al de sus contrapartes del grupo control (5.28 mm), (**Figura 17c**,  $t = 7.61$ , g.l. = 118;  $p < 0.001$ ).

## Dieta



● Celdas sin cría

**b**

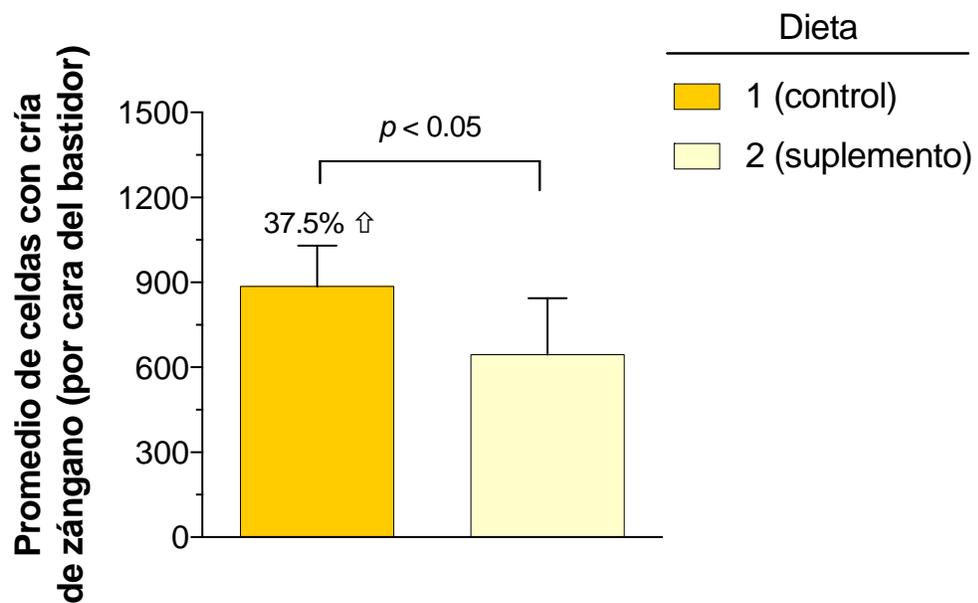
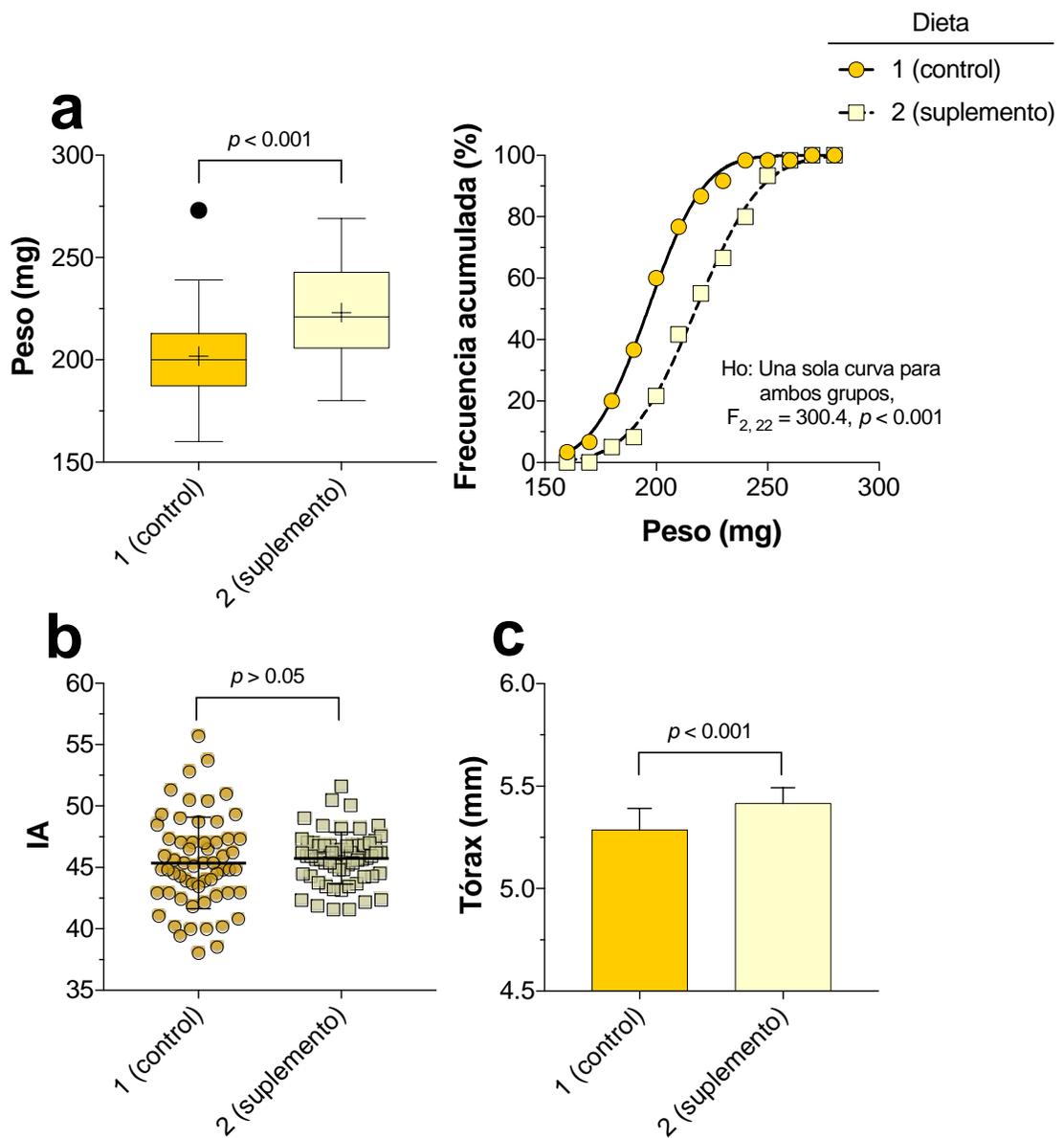


Figura 16. Promedio ( $\pm$  DE) de celdas de zángano de colonias sin suplemento (control) y con suplemento. Los grupos se compararon mediante una prueba de *t-Student*.



**Figura 17. Comparación de las características morfológicas de los zánganos de ambos grupos.** Promedio ( $\pm$  DE) del peso, índice abdominal y torácico de zánganos sin suplementar (control) y suplementados. Los grupos se compararon mediante una prueba de *t de Student*.

## 6.2 Evaluación de la calidad del semen

El volumen de eyaculado promedio para los zánganos de las colonias sin suplementar o control fue de 1.3  $\mu$ l, mientras que para las colonias suplementadas fue de 1.5  $\mu$ l.

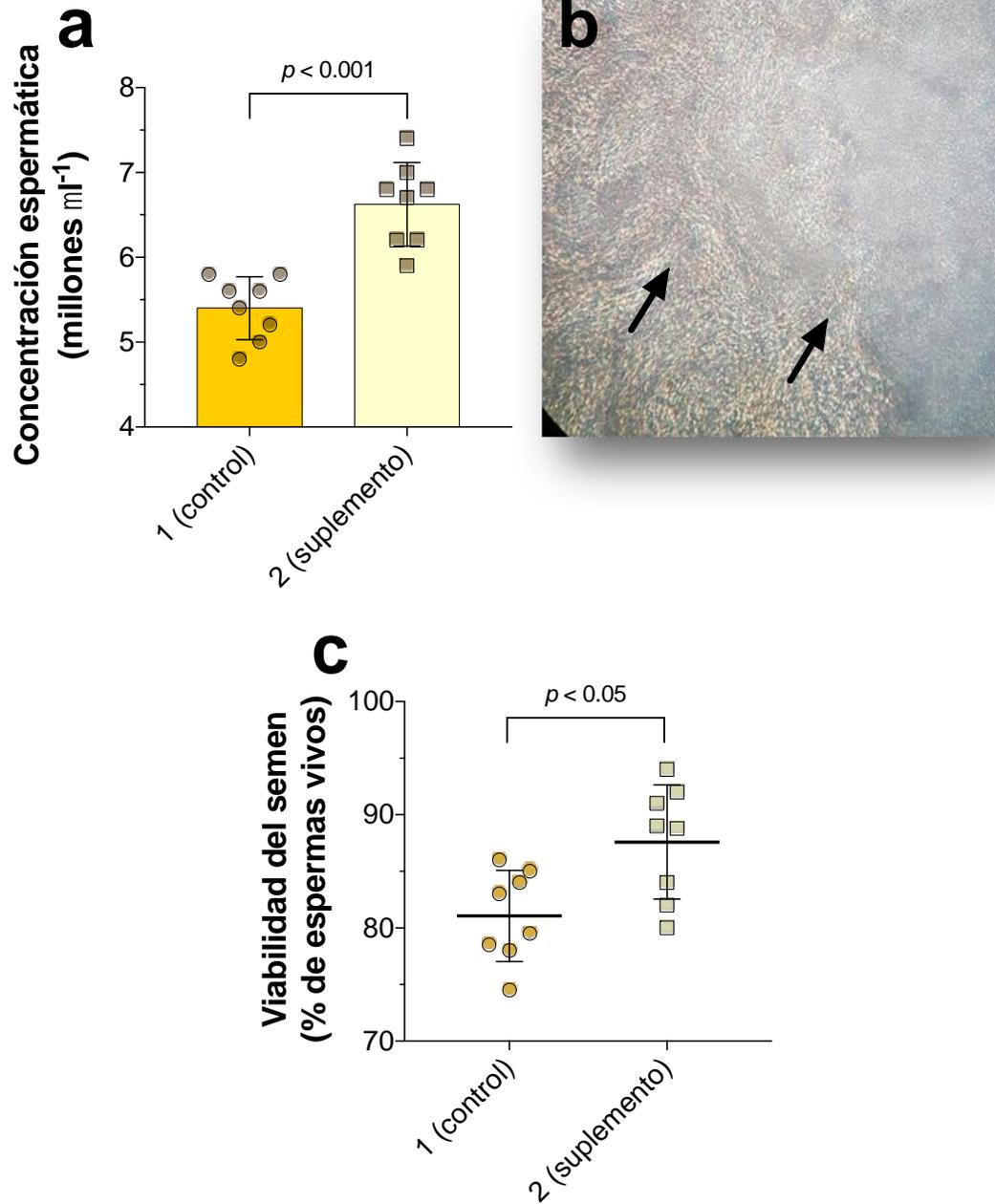
La concentración espermática del grupo control fluctuó entre  $5.4 \pm 0.37$  millones de espermatozoides por  $\mu$ l. En el grupo suplementado se registró una concentración espermática de  $6.6 \pm 0.49$  millones de espermatozoides por  $\mu$ l, estimándose diferencias significativas ( $p < 0.001$ ,  $t = 5.62$ , g.l. = 14), **(Figura 18a)**. Estas diferencias mostraron que la concentración espermática del grupo suplementado tuvo un incremento correspondiente al 22.6% en comparación con el grupo control.

Respecto a la motilidad masal, en todas las muestras evaluadas se presentó un patrón Muy Bueno, es decir se observó un movimiento con ondas vigorosas y remolinos rápidos en todas las muestras de semen **(Figura 18b)**.

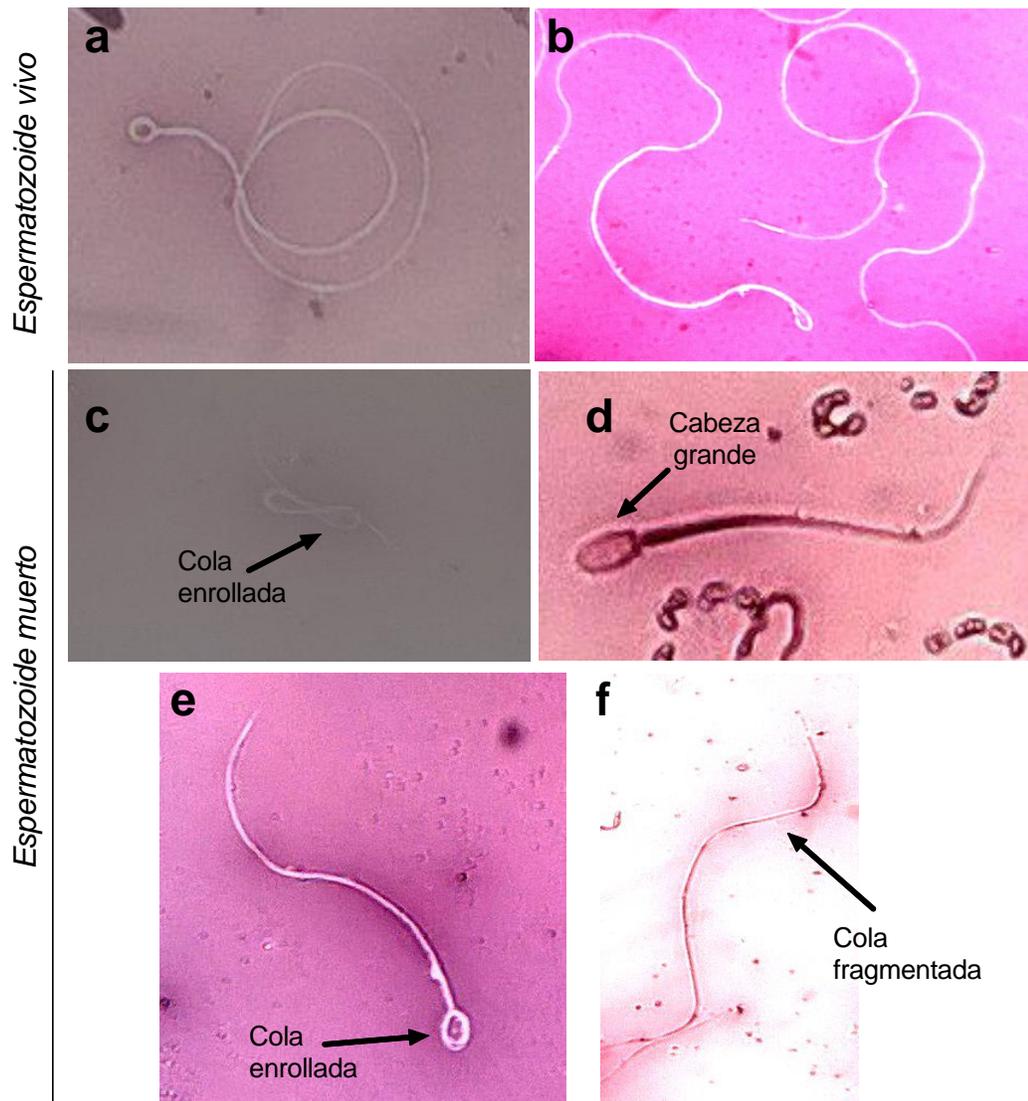
La motilidad espermática registrada para las muestras del grupo control varió de 2 a 4; se presentó un patrón tipo 4 (más de 50% de espermatozoides con movimiento circular y movimiento progresivo) en todas las muestras a las 24 horas, posteriormente el patrón disminuyó, en una muestra el valor fue de 3 (presencia movimiento circular y progresivo, 50 % movimiento vibratorio) y la otra de 2 (más 50% movimiento vibratorio) a los 7 días. El grupo suplementado presentó de igual forma un patrón tipo 4 en sus dos muestras (más de 50% de espermatozoides con movimiento circular y movimiento progresivo) a las 24 horas y un patrón tipo 3 (presencia movimiento circular y progresivo, 50 % movimiento vibratorio) a los 7 días.

La viabilidad en los espermatozoides del grupo control fue de  $81.0 \pm 4.03$  %. El grupo suplementado tuvo de promedio  $87.6 \pm 5.03$  %. Se registraron diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ,  $t = 2.86$ , g.l. = 14), **(Figura 18c)**.

Morfológicamente la mayoría de las muestras observadas no presentaron alteraciones. Sin embargo, en algunas se observaron anomalías **(Figura 19)**. Para el grupo control se encontraron espermatozoides con cabezas grandes (3.5%), colas enrolladas (13.5%) y colas fragmentadas (6%), mientras que para el grupo suplementado se observaron menores porcentajes de anomalías; estas fueron de igual forma cabezas grandes (1.5%), colas enrolladas (9.5%) y colas fragmentadas (4%).



**Figura 18. Comparación de la calidad del semen de zánganos sin suplementar y suplementados. a)** Promedio ( $\pm$  DE) de la concentración espermática entre grupos, **b)**, motilidad masal (las flechas nos señalan la formación de olas o remolinos característicos), **c)** Porcentaje ( $\pm$  DE) de la viabilidad espermática entre grupos. Los grupos se compararon mediante una prueba de *t* de Student.



**Figura 19. Viabilidad y ejemplos de alteraciones morfológicas de espermatozoides de zánganos. a-b)** Espermatozoides vivos (no se tiñeron), **c)** Espermatozoide vivo con cola enrollada, **d)** Espermatozoides muertos (teñidos) con cabezas grandes, **e)** Espermatozoide con cola enrollada, **f)** Espermatozoide muerto con cola fragmentada.

### 6.3 Evaluación de minerales en semen y vesículas

Los resultados promedio del análisis en el laboratorio por espectrofotometría de absorción atómica con flama de la concentración de minerales encontrados en semen y vesículas seminales de zánganos suplementados y sin suplementar se muestran en el Cuadro 5 y 6.

**Cuadro 5. Contenido de elementos minerales en semen de zánganos suplementados y sin suplementar**

Grupo	Se ng/g	Mg µg/g	Cu µg/g	Zn µg/g	P µg/g
Control	199.79	27.51	50.72	19.85	1875.73
Suplementado	186.08	22.94	29.01	22.15	2552.67

**Cuadro 6. Contenido de elementos minerales en vesículas seminales de zánganos suplementados y sin suplementar**

Grupo	Se ng/g	Mg µg/g	Cu µg/g	Zn µg/g	Ca µg/g	P µg/g
Control	420.1	138580.1	63.3	56.5	7.9	4206.73
Suplementado	458.72	106503.21	26.82	44.44	3.4	8317.47

## 7. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este estudio muestran que muchas de las variables medidas en los zánganos fueron significativamente afectados con la utilización de un suplemento alimenticio, dando como resultados significativos diferencias morfológicas entre los zánganos suplementados y los de las colonias sin suplemento así como en la calidad del semen.

Los zánganos de abejas *Apis mellifera* presentes en las colonias de abejas de forma natural no superan más del 10 % de la población en general, por lo que su crianza intensiva es muy compleja ya que aunque se utilice cera para zángano no es factible que las abejas ocupen todas las celdas disponibles para ello; en nuestro estudio la cantidad de cría operculada producida (644 control y 885 suplementadas; celdas cría) concuerda con otro estudio en el cual se utilizó algún suplemento, donde se reporta un promedio de 570 hasta 870 celdas con cría (Rousseau y Giovenazo, 2016); sin embargo, encontramos que en el grupo que no fue suplementado se produjo una mayor cantidad de cría. Esta diferencia posiblemente pudo deberse a factores genéticos ó ambientales, así como a la interacción de los mismos (Free y Williams, 1975).

Con respecto a la genética, esta descrito que la abeja reina tiene la capacidad de recopilar información sobre la necesidad de criar zánganos de forma natural, esto lo hace través de la medición de los diámetros de las celdas, eligiendo así si colocar un huevo fertilizado o sin fertilizar (Page y Peng, 2001; Boes, 2010). La puesta de este huevo se relaciona con la edad de la reina y la cantidad de zánganos con los que se apareó, siendo las reinas vírgenes o reinas viejas las que influyen en una mayor puesta de huevos de zángano. En nuestro estudio las reinas que se utilizaron para criar a ambos grupos de zánganos no estaban emparentadas genéticamente, estas provenían de un criadero de reinas fecundadas al aire libre, por lo cual su origen genético pudo influir en los resultados, posiblemente las reinas de las colonias sin suplementar tenían mayor edad y por lo tanto la reserva de espermatozoides era menor, y por otro lado también es factible que las reinas de las colonias suplementadas se aparearon con una mayor cantidad de zánganos, por lo cual su tendencia sería ovopositar más huevos de obrera.

Otros estudios han mencionado que existe un efecto inhibitor para la cría de zánganos por parte de las propias obreras (Wharton et al., 2008); de tal manera que cuando las colonias ya poseen una cierta cantidad de ellos dentro de la colonia, las obreras cesan la crianza, esto lo realizan porque las obreras detectan la cantidad de celdas que existen debido a que mantienen un contacto directo con las celdas y que probablemente las obreras al igual que las reinas tienen la capacidad de medir las celdas, procesando esta información junto con más obreras de la colonia (Koeniger, 1970). En nuestro estudio, aunque se homologó la cantidad de bastidores con cría, no se realizó en específico para la población, esto posiblemente influyó en las colonias suplementadas donde se presentó un efecto inhibitor por parte de la reina y las obreras presentes en la colonia (Ledoux et al., 2001).

Por otro lado Omholt (1988) y Hepburn (1998), indican que los zánganos producen una feromona inhibitoria cuando existe la presencia, ya sea de muchos zánganos, de zánganos de otras colonias o de zánganos inmaduros, por lo que ello limita la crianza de más zánganos. También se ha encontrado que existe una relación inversa en cuanto a los zánganos presentes y los que se van a criar (Henderson, 1994), si este fuera el caso, es posible que en las colmenas suplementadas de nuestro estudio la población de zánganos ya era correspondiente a un 10 % e incluso que por la cantidad de alimento suministrada fue un atractivo para que zánganos de otras colonias llegaran a estas colmenas interfiriendo la producción de ellos.

Dentro de los factores ambientales que influyeron al criar los zánganos se encuentra la temporada y la región, se señala que las producciones que se encuentran en regiones de clima tropical son mejores (Rowland y McLellan, 1987; Lee y Winston, 1987; Rueppell et al., 2006), ya que poseen una mayor abundancia de alimento. Por otro lado Page, et al. (1993), Pratt (1999), Seeley y Mikheyev (2003) encontraron una correlación positiva en cuanto a que la cría de zánganos, ya que se ve favorecida cuando existe abundante flujo de néctar y bastantes celdas para almacenar alimento, lo que comúnmente coincide con la temporada de primavera, donde se da la época de reproducción natural o enjambrazón. Esto sucede cuando las colonias de abejas equilibran costos de energía, es decir donde consumen los nutrientes necesarios para poder producir cera y con ello construir las celdas de zángano (El-Kazafy y Al-Kahtani, 2013). De una cara del bastidor se

pueden producir aproximadamente 1000 zánganos según Gilles (2003), si comparamos esto con la producción de zánganos obtenida en nuestro estudio (885 control y 644 suplementadas, celdas cría) observamos que es menor, en este caso inferimos que esto ocurrió debido a que nuestro estudio se realizó en el altiplano de México, donde el clima es templado y durante un periodo de transición entre la temporada de verano y otoño, donde la abundancia de recursos era menor y, por lo tanto, a pesar de la suplementación alimenticia realizada, las colonias de abejas equilibraron el tamaño de la población así como la cantidad de celdas para almacenar comida; prefiriendo el crecimiento poblacional antes de la reproducción (Perrin y Sibly, 1993; Zera y Harshman, 2001). Incluso la periodicidad en la cual se alimentó pudo interferir, por ejemplo una alimentación más continua (cada dos días) podría haber simulado las condiciones naturales de enjambrazón y con ello la producción de zánganos hubiera sido mayor.

En cuanto a las características morfológicas, al analizar los resultados obtenidos del peso de los zánganos (201.8 mg sin suplemento y 223 mg con suplemento) encontramos evidencia suficiente para asegurar que las razas híbridas tienden a tener pesos más bajos como lo señala Mazeed (2011), quien obtuvo un peso promedio de 226 mg, siendo que los zánganos de la raza carniola tienden a pesar en promedio 240 mg.

Otro factor que afecta el peso de los zánganos es la alimentación, Rousseau y Giovenazzo (2016), señalaron que los zánganos alimentados con miel y pan de las abejas, así como los suplementados con puro jarabe o con una única fuente de proteína tienen un peso promedio menor (237 mg) a que si suplementamos de forma conjunta con jarabe y alguna fuente proteica. De acuerdo a esto, podemos señalar que este efecto también se dio en nuestro estudio, ya que al utilizar el suplemento alimenticio junto con el jarabe aumentó el peso de los zánganos. Asimismo es importante recalcar que la utilización de fuentes proteicas dentro de la alimentación es imprescindible, de forma natural las colonias que tienen acceso a diferentes flores políferas, crían zánganos con pesos de hasta 262 mg y cuando tienen limitada la cantidad de polen hasta 254 mg (Czekonska et al., 2015).

Adicionalmente el incremento en el peso ha sido fuertemente relacionado con las condiciones nutricionales bajo las cuales se crían los individuos (variación en cantidad y calidad nutrientes según la etapa de desarrollo), siendo la etapa de larva

la más afectada, debido a que en este estadio se determina el tamaño corporal de un adulto (Stieper et al., 2008). De acuerdo a esto, cabe señalar que en este estudio se comenzó la suplementación desde etapas larvales, para influir directamente sobre el peso de los zánganos.

La literatura reporta que existe una relación entre el peso de los zánganos y la producción de semen, donde zánganos con un mayor peso producen más cantidad de semen (Berg et al., 1997; Schlüns et al., 2003; Gencer y Firatli, 2005; Koeniger et al., 2005b; Couvillon et al., 2010; Gencer y Kahya, 2011; Rousseau et al., 2015), aunado a ello el aumento en la concentración espermática y de la viabilidad de los espermatozoides, esta misma correlación se observó en el presente estudio.

De la misma forma es común relacionar el tamaño del cuerpo con el peso; donde se han evaluado diversas características como la longitud del ala, la tibia y fémur entre otros, sin embargo se ha relacionado de mejor manera el índice abdominal y del tórax con un aumento en cuanto a características del comportamiento reproductivo, en este sentido podemos referir según Coelho (1996) y Couvillon et al., (2010) que un tórax más grande tiene una mayor cantidad de músculos, los cuáles favorecen el vuelo y dado que los apareamientos de las abejas son en el aire, los zánganos tendrán mejores oportunidades de acoplarse. En nuestro estudio el índice torácico fue mayor en el grupo suplementado en comparación con el grupo control, esto sugiere que el suplemento contiene una elevada cantidad de proteína (60 %) por lo cual los zánganos de este grupo tuvieron un índice mayor. Por otro lado el índice abdominal se ha relacionado más con aspectos reproductivos, por ejemplo el volumen de eyaculado y la concentración espermática (Rousseau y Giovenazo, 2016), mismos que son favorecidos con la utilización de suplementos proteicos, lo cual difiere de nuestro estudio ya que el índice abdominal del grupo suplementado no fue mayor que el del grupo control.

A la fecha no se tiene conocimiento de un estudio de evaluación de semen en zánganos de forma integral, por lo cual en la literatura existen datos muy variables. La mayoría de los datos se ha realizado a partir de la disección de las vesículas seminales y muy pocos resultados a partir de semen eyaculado (Woyke et al., 2001).

Este trabajo se realizó solamente empleando eyaculado de zánganos por eversión total del endófalo, siendo el rango de volumen de eyaculado y la concentración espermática obtenida comparable a la informada en otros estudios donde el promedio de eyaculado es de 0.9 a 1.8  $\mu\text{l}$  (Koeniger et al., 2005b; Mazzeed, 2011; Schlüns et al., 2003; Rhodes et al., 2011; Gençer y Kahya, 2011; Czekonska et al., 2013).

En cuanto a la concentración espermática, para el grupo sin suplementar fue  $5.4 \pm 0.37 \times 10^6$  espermatozoides/ $\mu\text{l}$  y para el grupo suplementado  $6.6 \pm 0.49 \times 10^6$  espermatozoides/ $\mu\text{l}$ , lo que supera a lo reportado por autores como Rhodes et al., (2011), Faten (2015), Rousseau y Giovenazzo (2016) para esta especie ( $2.2 - 3.3 \times 10^6$  esp/ $\mu\text{l}$ ). Esta diferencia puede deberse a que los zánganos utilizados fueron de diferente edad (18 días) comparada con estos estudios donde se utilizaron zánganos con un rango de edad entre los 15 y los 24 días (Rousseau et al., 2015), asimismo a que las fuentes de alimento empleadas fueron muy diferentes, ya que se maneja para el caso del grupo suplementado un alimento adicionado con vitaminas y minerales. Sin embargo hay reportes realizados en los cuales la concentración puede encontrarse en un rango entre  $8 - 12 \times 10^6$  esp/ $\mu\text{l}$  (Collins y Petis, 2011; Schüluns, 2003; Rinderer et al., 1985). Es importante recalcar que la obtención del semen se hizo a partir del eyaculado, no obstante la edad de los zánganos en la recolección y al ser los zánganos híbridos, pudo diferir así como la apreciación en el conteo ya que según Tofilski (2014), con el uso de un microscopio óptico no se distingue claramente la cabeza de la cola lo que sumado a una longitud extrema dificulta el conteo.

En cuanto a motilidad en masa, en nuestro caso fue el clásico movimiento de flujo y olas caracterizado por Lensky et al., 1979. En cuanto a la motilidad individual encontramos que fue disminuyendo paulatinamente, pero a diferencia de otros estudios se consideró de acuerdo a la escala de Locke y Peng (1993) y no a porcentajes. Los espermatozoides presentaron movimientos de tipo circular de manera semejante a los resultados encontrados por otros autores, en espermoteca de reinas recientemente fecundadas (Al-Lawati et al., 2009).

La viabilidad de los espermatozoides también permite inferir en la calidad espermática, refiriéndose a la integridad de la membrana. La evaluación de este parámetro permite la predicción de la fertilidad potencial en muestras de semen, ya

que una membrana plásmatica intacta es necesaria para la fecundación. La viabilidad de los espermatozoides es ampliamente utilizada para la evaluación de espermatozoides de mamíferos, pero estas pruebas en abejas han sido limitadas a pocos estudios, siendo utilizadas dos técnicas de tinción, una de ellas es la tinción de Eosina-Nigrosina y la otra con el Kit de viabilidad (SYBR14-Yoduro de Propidio).

La técnica de tinción con Eosina-Nigrosina ha sido ampliamente aplicada en espermatozoides de mamíferos y en pocas especies de insectos. Esta técnica depende de la habilidad y funcionalidad de las membranas, ya que al encontrarse intacta excluye el colorante eosina. Además es una técnica de bajo costo y permite la evaluación tanto de la viabilidad como la morfología espermática.

La viabilidad reportada del semen de zángano se encuentra en porcentajes mayores al 80% llegando hasta un 100% no importando la tinción utilizada (Collinis y Pettis, 2001). Este trabajo reporta valores de 81% para los zánganos sin suplementar y 88% para los suplementados. Algunos estudios señalan que la mayor viabilidad se obtiene mediante la recolección directa de eyaculado, registrando porcentajes de 96.33%, a diferencia de realizar un pool como fue el caso de este trabajo de investigación, reportándose que el tipo de extracción afecta la viabilidad (Collins, 2004a), al igual que la manipulación del semen así como la temperatura ambiente o bien exposición a acaricidas (Locke y Peng, 1993; Stürup et al., 2013). En comparación con el estudio de Rosseau y Giovenazo (2016), a pesar de la nutrición que recibió la colonia a base de suplementos (jarabe azúcar y polen) la viabilidad obtenida fue menor (82,9%) comparada con nuestros datos.

En cuanto a la morfología, las anomalías detectadas en casos aislados, coinciden con las informadas en otros estudios en los que se describían colas enrolladas, fragmentadas y dobles (Tariyah et al., 1999). Estas anomalías pueden deberse a la longitud del espermatozoide, ya que la cola o flagelo es muy largo midiendo hasta 270  $\mu\text{m}$  lo que permitiría que en sus movimientos se enrolle o fragmente.

En resumen los resultados obtenidos muestran una clara tendencia hacia el incremento de la calidad seminal en el grupo suplementado. Esto se vio reflejado por el tipo de alimentación que se dio desde un inicio de la crianza, lo cual concuerda con otros trabajos en donde se menciona que durante la etapa de larva de los zánganos se lleva a cabo la espermatogénesis y es en ese momento donde

la cantidad de proteína debe ser elevada (Pech-May et al., 2012; Stürup et al., 2013, Czekonska et al., 2015). Asimismo, el incremento puede atribuirse a que el suplemento proporcionado posee nutrientes ricos como los minerales, los cuales poseen actividades antioxidantes. En el polen de forma natural existen compuestos como los carotenoides los cuales brindan protección ante la peroxidación de los lípidos, además de su capacidad para secuestrar radicales libres de oxígeno, resultantes de la peroxidación de lípidos. El semen de *Apis mellifera* sufre de un estrés oxidativo muy marcado debido a que los espermatozoides, una vez que fueron eyaculados, deben competir y mantenerse dentro de la espermateca, todo este proceso causa daños a proteínas (enzimas) y ácidos nucleicos (ADN), disminuyendo la fertilidad.

Por lo que, los resultados de este estudio sugieren que la adición del suplemento a la dieta incrementó variables como la concentración espermática y la viabilidad, esto probablemente debido a que el suplemento proporcione niveles adecuados de proteína. Las proteínas cumplen una función muy importante en el fluido seminal (Baer et al., 2009), proporcionando a l esperma sus necesidades fisiológicas, protegiéndolas de ataques microbianos o reduciendo el estrés oxidativo.

Además de evaluar variables en cuanto a calidad de semen también se determinó la presencia de minerales que se relacionan con aspectos reproductivos del semen, enfocándonos en conocer el papel que juegan estos minerales desde que se produce los espermatozoides en los testículos, su paso a las vesículas seminales, su presencia dentro del semen y finalmente en la espermateca.

Hasta la fecha son escasos los estudios con los cuales se pueda tener una referencia, en un primer estudio Verma (1973) cuantificó Mg y Ca en semen de forma natural (393.82 y 440.77  $\mu\text{g/g}$  respectivamente) y en la espermateca (289.28 y 625.09  $\mu\text{g/g}$  respectivamente) referenciando que estos minerales al igual que el Na y K eran determinantes para mantener vivos a los espermatozoides ya que forman una base iónica para el control de la motilidad y producción de energía. Sin embargo, al determinar Mg y Ca en semen en zánganos suplementados y sin suplementar de nuestro estudio, estos minerales se encontraron en niveles muy bajos; para el Mg (22 - 27  $\mu\text{g/g}$ ) y no se encontró Ca. Estas diferencias posiblemente se deban a las diluciones que se realizaron para cuantificarlos.

Gutiérrez (2011), determinó los minerales de P, Mg, Ca, Cu y Zn en vesículas seminales, al respecto de este trabajo y en comparación al nuestro, en los dos tratamientos hubo diferencias; la concentración de P y Mg fueron mayores en más de un 100%, no obstante el Ca, Cu y Zn fueron menores al estudio de Gutiérrez (2011), **(Anexo 3)**. Las principales diferencias encontradas potencialmente se debieron a que la alimentación utilizada fue diferente, Gutiérrez (2011) utilizó una dieta a base de polen natural así como una variabilidad en la edad de la colecta de los zánganos, con esto podemos referir que aunque estos estudios se realizaron en localidades cercanas, la influencia del tipo de polen que se utilizó contenía mejores nutrientes, siendo el Cu y el Zn de los que se encontraron en mayor concentración debido a que las plantas tienden a acumular más estos minerales y posteriormente esos minerales pasan al polen; dentro de los principales minerales encontrados en el polen de forma natural tenemos: Cu, Zn, Mn, K, Mg, Fe y Ca (Herbert y Miller, 1987).

En nuestro estudio se determinaron cinco minerales en semen y seis en vesículas seminales. En cuanto al semen obtenido podemos mencionar que el que se obtuvo de los zánganos sin suplemento tuvo concentraciones más elevadas de Mg, Cu y Se, no obstante la concentración de P y Zn fueron menores. En cuanto a las vesículas seminales todos los minerales a excepción del Se fueron mayores en las vesículas seminales de los zánganos sin suplementar.

Con los datos obtenidos podemos relacionar que la presencia de minerales en el semen y los espermatozoides son imprescindibles como en otras especies, cumpliendo una función antioxidante al participar principalmente en sistemas enzimáticos, estos minerales serían el Zn, Se, Mn y Cu, con los cuales se puede correlacionar la presencia de enzimas como la Glutación peroxidasa y la Super oxido dismutasa, las cuales se han determinado en concentraciones elevadas en semen y espermateca. Aparte de la función antioxidante hay minerales como el K, Na, Ca, Mg y Zn que intervienen en el mantenimiento de la presión osmótica, equilibrio ácido base y permeabilidad tisular. De igual forma para la motilidad espermática se ha referido una relación de K, Mg y Ca, Cu y Fe (Cordova et al., 2009) ya que ayudan en el transporte de energía de las células. La presencia de Zn también es necesaria para la síntesis de ácido ribonucleico (ARN), por lo tanto es primordial que este mineral se encuentre en el alimento en etapas de larva ya que ayudará al

crecimiento de las células germinales. Dentro de nuestro estudio se determinaron cantidades de minerales los cuales estarían aportando una protección antioxidante a los espermatozoides, por ejemplo el Zn, Mg y Se. Por otro lado, el Se, al igual que otras especies, previene la distrofia muscular que en el caso de los zánganos se tendría que correlacionar con el tamaño del tórax por la gran cantidad de músculos presentes. Además deficiencias de selenio en otras especies se relacionan con problemas de fertilidad afectando la viabilidad espermática (Keskes-Ammar et al., 2003), lo cual en el estudio no se vio reflejado siendo que el Se, se encontró en cantidades abundantes. Por otro lado, uno de los minerales en mayor concentración fue el P, el cual es fundamental en los espermatozoides por la cantidad de ADN, siendo el material genético único de cada célula espermática, otra función es para mantener su fuente de energía mediante la generación de ATP (Chapman, 1998).

También se puede mencionar que las concentraciones de minerales fueron mayores en las vesículas seminales que en el semen, con lo cual se infiere que la función de las vesículas seminales a diferencia de otras especies tiene mayor relevancia ya que concuerda con otros hallazgos fisiológicos donde se menciona que los espermatozoides se mantienen aquí hasta que son eyaculados, siendo en este órgano donde se producen secreciones que ayudan a mantener a los espermatozoides viables y a aumentar su longevidad. La presencia de concentraciones elevadas de P y Mg en este órgano se puede relacionar con la presencia de una gran cantidad de síntesis de proteínas necesarias para la formación del fluido seminal y al Mg con una actividad antioxidante (Chapman, 1998; Weirich et al., 2002).

Hasta la fecha no existen datos de referencia sobre la cantidad de minerales en la dieta necesarios en abejas. La cantidad de elementos minerales que obtienen las abejas de forma natural provienen del polen y néctar de las flores, de acuerdo a esto podemos inferir que las colonias no suplementadas tuvieron una actividad de forrajeo más diversa al alimentarse de diferentes pólenes, los cuales aportaron una mayor concentración de minerales, a diferencia de las colonias complementadas, debido a que a éstas se les suministró su alimento dentro de la colonia, evitando de alguna manera la necesidad de ir por alimento a las flores y por ende disminuyendo la fuente de minerales.

No obstante, a pesar de haber determinado minerales en este estudio, la mayoría de ellos no influyó en la calidad del semen, esto pudo haber sido por un efecto en conjunto donde podemos referir que la cantidad de minerales debería medirse en cada zángano y no en pooles como en este estudio ya que posiblemente la concentración de minerales se diluyó. Por otro lado, es posible que la cantidad de proteína y carbohidratos suministrada tenga una mejor influencia en la calidad del semen, lo cual nos haría pensar que sería necesario incluir una mayor fuente de estos elementos, por ejemplo glucosa, fructuosa, yema de huevo, lecitina de soya, aminoácidos como la lisina o arginina, los cuales se han utilizado de forma favorable para la criopreservación del semen (Taylor et al., 2009).

Con todo lo mencionado, nuestro estudio muestra que las abejas se enfrentan a discrepancias en el tiempo y diversidad de recursos florales afectando la producción y la calidad del semen; por lo cual es necesario utilizar suplementos alimenticios que contribuyan a mejorar la calidad del semen. Sin embargo, es necesario seguir realizando estudios acerca del tema y conocer si los suplementos a utilizar aportan la misma calidad de nutrientes y mejoran los parámetros reproductivos. Este conocimiento es muy útil para los programas de cría de zánganos.

## 8. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales de este trabajo se puede concluir:

- La utilización del suplemento alimenticio en las colonias productoras de zánganos no afectó la producción de zánganos.
- El suplemento alimenticio aumentó aspectos morfométricos de los zánganos que se reflejó en la calidad de semen.
- La calidad del semen mejoró con la utilización del suplemento en cuanto a la concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática.
- Se determinaron concentraciones importantes de minerales tanto en semen como en vesículas seminales, sin embargo los minerales en conjunto no influyeron en la calidad del semen.

## 9. REFERENCIAS

1. Aguilar, G., (2014) *Determinación del contenido de fenoles totales, flavonoides y antioxidantes en el polen fresco y pan de las abejas (Apis mellifera L.)*. (Tesis de licenciatura). México D.F. México, Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Al-Lawati, H., Kamp, G., y Bienefeld, K., (2009) "Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens", *Journal of Insect Physiology*, 55, pp. 116–121.
3. Alqarni, A., (2006) "Influence of some protein diets on the longevity and some physiological conditions of honeybee *Apis mellifera* L. workers", *Journal of Biological Sciences*, 6 (4), pp. 734–737.
4. Anderson, L., y Dietz, A., (1976) "Pyridoxine requirement of the honey bee (*Apis mellifera*) for brood rearing", *Apidologie*, 7, pp. 67–84.
5. Barth, A., (2006). *Fisiología de la reproducción del toro y evaluación de la capacidad reproductiva*, Instituto de Reproducción Animal, Cordoba.
6. Baer, B., (2005) "Sexual selection in *Apis* bees", *Apidologie*, 36, pp.187-200.
7. Baer, B., Heazlewood, J., Taylor, N., Eubel, H., Millar, A., (2009) "The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*", *Proteomics*, 9(8), pp. 2085-2097.
8. Berg S, Koeniger N, y Fuchs S, (1997) "Body size and reproductive success of drones (*Apis mellifera* L.)", *Apidologie*, 28, pp. 449–460.
9. Blum, M., Glowska, Z., y Taber, S., (1962) "Chemistry of the drone honeybee reproductive system. II Carbohydrates in the reproductive organs and semen", *Entomological Society of America*, 55, pp. 135-139.
10. Boes, K., (2010) "Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: an interplay of queen and worker decisions", *Insectes Sociaux*, 57, pp. 1–9.
11. Bouvet, B., Brufman, A., Paparella, C., Gatti, V., Feldman, R., y Solís, E., (2004) "Estrés espermático modificado: respuesta inmune y funcionalidad de la membrana del espermatozoide humano", *Archivos Españoles de Urología*, 57 (5), pp. 533-537.

12. Brodschneider, R., y Crailsheim, K., (2010) "Nutrition and health in honey bees", *Apidologie*, 41(3), pp. 278-294.
13. Buffone, M., y Calamera, J., (2004) "Evaluación de la estructura e integridad de la cromatina espermática humana en andrología", *Revista Argentina de Andrología*, 13 (1), pp. 2-14.
14. Capel, A. (2011) *Evaluación de la calidad del semen de Apis mellifera L.* (Tesis de licenciatura). Buenos Aires, Argentina: Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
15. Cerezo, G., y Castilla, J., (2014). *Manual para el análisis básico de semen*, Ediciones Prado, México.
16. Chapman, R. (1998). *The insects structure and function* (4 ed). Cambridge University Press, United Kingdom.
17. Chavacán, M. (2006) *Avances en la criopreservación de semen de zánganos (Apis mellifera L.)*, (Tesis de licenciatura). México DF México: Universidad Nacional Autónoma de México.
18. Chihuailaf, R., Contreras, P., y Wittwer, F., (2002) "Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal", *Veterinaria México*, 33(3), pp. 265-283.
19. Cisneros, P., y Céspedes, M., (1997) "Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: Glutatión peroxidasa", *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 16(1), pp. 10-15
20. Coelho, J., (1996) "The flight characteristics of drones in relation to mating", *Bee Science*, 4, pp. 21–25.
21. Collins, A., y Donoghue, A., (1999) "Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera* sperm using dual fluorescent staining", *Theriogenology*, 51 (8), pp. 1513–1523.
22. Collins, A., (2004a) "Sources of variation in the viability of honey bee (*Apis mellifera* L.), semen collected for artificial insemination", *Invertebrate Reproduction y Development*, 45, pp. 231–237.
23. Collins, A., Williams, V., y Evans, J., (2004b) "Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*", *Insect Molecular Biology*, 13 (2), pp. 141-146.

24. Collins, A., y Pettis, J., (2011) "Effect of *varroa* infestation on semen quality", *American Bee Journal*, 141, pp. 590-593.
25. Córdova, A., Ruíz, C., Córdova, M., Guerra J., Rodríguez B., y Arancibia, K., (2009) "Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática", *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), pp. 01-38
26. Couvillon, M., Hughes, W., Perez-Sato, J., Martin, S., Roy, G., y Ratnieks, F., (2010) "Sexual selection in honey bees: colony variation and the importance of size in male mating success", *Behavioral Ecology*, 21 (3), pp. 520-525.
27. Crailsheim, K., (1986) "Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica*)", *Journal of Insect Physiology*, 32, pp. 629–634.
28. Crailsheim, K., Schneider, L., Hrasnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., y Schöffmann, B., (1992) "Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function", *Journal of Insect Physiology*, 38 (6), pp. 409–419.
29. Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., y Chorbiński, P., (2013) "The effect of brood incubation temperatura on the reproductive value of honey bee (*Apis mellifera*) drones", *Journal of Apicultural Research*, 52 (2), pp. 96–105
30. Czekonska, K., Chuda-Mickiewicz, B., y Samborski, J., (2015) "Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen", *Apidologie*, 46, pp. 1–9.
31. Dade, H. (1994). *Anatomy and dissection of the honeybee*, International Bee Research Association, London, UK.
32. De Grandi-Hoffman, G., y Hagler, J., (2000) "The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker" *Insectes Sociaux*, 47, pp. 302–306.
33. De Grandi-Hoffman, G., Wardell, G., Ahumada-Segura, F., Rinderer, T., Danka, R., y Pettis, J., (2008) "Comparisons of pollen substitute diets for honeybees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations", *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47 (4), pp. 265–270.

34. Driver, C., y Georgeou, A., (2003) "Variable effects of vitamin E on *Drosophila* longevity", *Biogerontology*, 4(2), pp. 91–95.
35. El-Kazafy, A., y Al-Kahtani, S., (2013) "Relationship between population size and productivity of honey bee colonies", *Journal of Entomology*, 10, pp. 163–169.
36. Estrada, D., (2013) "Cría de abejas reinas e inseminación artificial" presentado en el curso Cría de reinas, Morelos, México.
37. Faten, B., Guillaume, K., Sylvie, T., Marianne, C., Jaques, S., Didier, C., y Jean, P., (2014) "Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi field and field conditions", *Apidologie*, 45 (2), pp. 215-223.
38. Free, J., y Williams, I., (1975) "Factors determining rearing and rejection of drones by honeybee colony", *Animal Behaviour*, 23, pp. 650–675.
39. Gary, N., (1963) "Observations of mating behavior in the honeybee", *Journal of Apicultural Research*, 2(1), pp. 3-13.
40. Gencer, H., y Firatli, C., (2005) "Reproductive and morphological comparisons of drones reared in queenright and laying worker colonies", *Journal of Apicultural Research*, 44, pp. 163–167.
41. Gencer, H., y Kahya, Y., (2011) "Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *Journal of Apicultural Research*, 50, pp. 130–137.
42. Gilles, F., (2003). *Cría de reinas*, Editorial S.A. Mundi-Prensa, España.
43. Giovanni, R., y Edison, P., (2012) "Estrés oxidativo en el semen criopreservado", *Revista Lasallista de investigación*, 9, pp. 128-136.
44. Gutiérrez, G., (2011) *Determinación y evaluación de la concentración de elementos minerales de vesículas seminales de zánganos (*Apis mellifera* L.) sexualmente maduros, mediante espectrometría de absorción, emisión atómica y colorimetría*. (Tesis de Licenciatura). México D.F, Universidad Nacional Autónoma de México.
45. Guzmán, E., (2012). *Elemental genetics and breeding for the Honey bee*. Ontario Beekeepers Asssocation, Bayfielde, ON. Canada.
46. Halliwell, B., y Gutteridge, J., (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5 Ed). Oxxford University Press.

47. Henderson, C., (1994) "Influence of the presence of adult drones on the further production of drones in honey bee (*Apis mellifera* L) colonies", *Apidologie*, 25, pp. 31-37.
48. Hepburn, H., (1998) "Reciprocal interactions between honeybees and combs in the integration of some colony functions in *Apis mellifera* L.", *Apidologie*, 29, pp. 47–66.
49. Herbert, E., y Miller-Hill, N., (1987) "Seasonal variation of seven minerals in honey bee collected pollen", *American Bee Journal*, 127 (5), pp. 367-369.
50. Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E., González-Porto, A., (2008) "How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse", *Environmental Microbiology*, 10 (10), pp. 2659-2669.
51. Keller, I., Fluri, P., y Imdorf, A., (2005) "Pollen nutrition and colony development in honey bees, Part II.", *Bee World*, 86, pp. 27-34
52. Keskes-Ammar, L., Feki-Chakroun, N., Rebai, T., Sahnoun, Z., Ghozzi, H., Hammami, S., (2003) "Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men", *Archives Andrology*, 49, pp. 83-94.
53. Koeniger, N., (1970) "Factors determining the laying of drone and worker eggs by the queen honeybee", *Bee World*, 51, pp. 166–169.
54. Koeniger, N., Koeniger, G., Gries, M., y Tingek, S., (2005a) "Drone competition at drone congregation areas in four *Apis* species", *Apidologie*, 36, pp. 211–221.
55. Koeniger, G., Koeniger, N., Tingek, S., Phiancharoen, M., (2005b) "Variance in spermatozoa number among *Apis dorsata* drones and among *Apis mellifera* drones", *Apidologie*, 36 (2), pp. 279–284.
56. Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizawa, T., y Soma, G., (2009) "ROS and innate immunity", *Anticancer Research*, 29 (3), pp. 817–821.
57. Konigsberg Fainstein. Radicales libres y estrés oxidativo. (Editorial). Manual moderno, México 2008.
58. Laidlaw, H., Page, R., (1984) "Polyandry in honey bees (*Apis mellifera* L.): sperm utilization and intracolony genetic relationships", *Genetics*, 108(4), pp. 985–997.

59. Laidlaw, H. y Page, R., (1997). *Queen rearing and bee breeding*, Wicwas Press. Cheshire, USA.
60. Ledoux, M., Winston, M., Higo, H., Keeling, C., Slessor, K., y Le Conte, Y., (2001) "Queen pheromonal factors influencing comb construction by simulated honey bee (*Apis mellifera* L.) swarms", *Insectes Sociaux*, 48, pp. 14–20.
61. Lee, K., Simpson, S., Clissold, F., Brooks, R., Ballard, J., Taylor, P., Soran, N., y Raubenheimer, D., (2008) "Lifespan and reproduction in *Drosophila*: new insights from nutritional geometry", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (7), pp. 2498-2503.
62. Lee, P., y Winston, M., (1987) "Effects of reproductive timing and colony size on the survival, offspring colony size and drone production in the honey bee (*Apis mellifera*)", *Ecological Entomology*, 12, pp. 187–195.
63. Lensky, Y., Ben-David, E., y Schindler, H., (1979) "Ultrastructure of the spermatozoan of the mature drone honeybee", *Journal Apicultural Research*, 18, pp. 264-271.
64. Locke, S., y Peng, Y., (1993) "The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*)", *Physiological Entomology*, 18, pp. 144–148.
65. Lodesani, M., Balduzzi, D., y Galli, A., (2004) "Functional caracterización of semen in honey bee queen (*A.m.ligustica* S.) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination". *Journal Animal Science*, 3, pp. 385-392.
66. McNally, L., y Scheneider, S., (1994) "Drone production and drone comb utilization in colonies of the African honey bee, *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, in Africa" *Apidologie*, 25, pp. 547-556.
67. Mazeed, A., (2011) "Morphometry and number of spermatozoa in drone honeybees (Hymenoptera: Apidae) reared under different conditions", *European Journal of Entomology*, 108(4), pp. 673-676.
68. Martínez, F., y González, G., (2002) "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes", *Nutrición hospitalaria*, 17, pp. 271-278.

69. Norman, L., Michael, A., Colin, S., Cox-Foster, D., Harry, A., Ellis, D., Hatjina, F., y Dennis Van, E., (2013) "Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection", *Journal of Apicultural Research*, 52(4), pp. 1-40.
70. Neumann, P., y Carreck, N., (2010) "Honey bee colony losses", *Journal Apicultural Reserach*, 49(1), pp. 1–6.
71. Ogbuewa, I., Aladi, N., Etuk, I., y Opara, M., (2010) "Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function", *Research Journal of Veterinary Sciences*, 3, pp. 138-164.
72. Omholt, S., (1988) "Drone production in honeybee colonies: controlled by a long-lasting inhibitory pheromone from the drones?", *Journal Theoretical Biology*, 134, pp. 309-318.
73. Page, R., Fondrk, M., y Robinson, G., (1993) "Selectable components of sex allocation in colonies of the honeybee (*Apis mellifera* L.), *Behavior Ecology*, 4, pp. 239–245.
74. Page, R., y Peng, C., (2001) "Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L." *Experimental Gerontology*, pp. 695–711.
75. Paoli, P., Donley, D., Stabler, D., Saseendranath, A., Nicolson, S., Simpson, S., y Wright, G., (2014) "Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age", *Amino Acids*, 46, pp. 1449-1458.
76. Pech-May F., Medina-Medina, L., May-Itza, W., Paxton, R., y Quezada-Euan, J., (2012) "Colony pollen reserves affect body size, sperm production and sexual development in males of the stingless bee *Melipona beecheii*", *Insectes Sociaux*, 59, pp. 417–424.
77. Peng, Y., Yin, C., y Yin, L., (1993) "Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high pressure freezing fixation", *Physiological Entomology*, 18, pp. 93-101.
78. Perrin, N., y Sibly, R., (1993) "Dynamic models of energy allocation and investment", *Annual Review of Ecology and Systematic*, 24, pp. 379–410.
79. Pratt, S., (1998) "Condition-dependent timing of comb construction by honeybee colonies: how do workers know when to start building?" *Animal Behaviour*, 56, pp. 603–610.

80. Pratt, S., (1999) "Optimal timing of comb construction by honeybee (*Apis mellifera*) colonies: a dynamic programming model and experimental tests", *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46, pp. 30–42.
81. Pratt, S., (2004) "Collective control of the timing and type of comb construction by honey bees (*Apis mellifera*)", *Apidologie*, 35, pp. 193-205.
82. Reyes, T. (2010). *Morfología espermática en Apis mellifera L.* (Tesis de licenciatura). México D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
83. Rinderer, T., Collins, A., y Pesante, D., (1985) "A comparison of Africanized and european drones: weights, mucus gland, seminal vesicle weights, and count of spermatozoa", *Apidologie*, 16, pp. 407–412.
84. Rhodes, J., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D., y Wheen, G., (2011) "Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones", *Apidologie*, 42(1), pp. 29–38.
85. Ross, J., y Kasum, C., (2002) "Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety", *Annual Review Nutrition*, 22, pp. 19-34.
86. Rousseau, A., Fournier, V., y Giovenazzo, P., (2015) "*Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding", *Canadian Entomologist*, 147(6), pp. 702-711.
87. Rousseau, A., y Giovenazzo, P., (2016) "Optimizing drone fertility with spring nutritional supplements to honey Bee (*Hymenoptera: Apidae*) colonies", *Journal of Economic Entomology*, pp. 1-6.
88. Rowland, C., y McLellan, A., (1987) "Seasonal changes of drone numbers in a colony of the honeybee, *Apis mellifera*", *Ecological Modelling*, 37, pp. 155–166.
89. Rueppell, O., Page, R., y Fondrk, M., (2006) "Male behavioural maturation rate responds to selection on pollen hoarding in honeybees", *Animal Behaviour*, 71(1), pp. 227-234.
90. Sanocka, D., y Kurpisz, M., (2004) "Reactive oxygen species and sperm cells", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2 (12), pp. 1-7.
91. Schlüns, H., Schlüns, E., Praagh, J., y Moritz, R., (2003) "Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size", *Apidologie*, 34, pp. 577–584.

92. Schmickl, T., y Crailsheim, K., (2001) "Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages", *Journal of Comparative Physiology A*, 187 (7), pp. 541-547.
93. Seeley, T., (2002) "The effect of drone comb on a honey bee colony's production of honey", *Apidologie*, 33, pp. 75–86.
94. Seeley, T., y Mikheyev, A., (2003) "Reproductive decisions by honeybee colonies: tuning investment in male production in relation to success in energy acquisition", *Insectes Sociaux*, 50, pp. 134–138.
95. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2016. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> Consultado 09-05-2017
96. Stieper, B., Kupershtok, M., Driscoll, M., y Shingleton, A., (2008) "Imaginal discs regulate developmental timing in *Drosophila melanogaster*", *Developmental Biology*, 321, pp. 18-26.
97. Strang, G., (1970) "A study of honey bee drone attraction in mating response", *Journal of Economic Entomology*, 63 (2), pp. 641-645.
99. Stürup, M., Baer-Imhoof, B., Nash, D., Boomsma, J., y Baer, B., (2013) "When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*", *Behavioral Ecology*, 24, pp. 1192–1198.
100. Tarliyah, L., Boediono, A., y Walujo, D., (1999) "Motility of honeybee *Apis mellifera* L. spermatozoa in various storage, temperature in dilution media containing different glucose levels", *Media Veteriner*, 6, pp. 2.
101. Taylor, M., Guzman, N., Morfin, N., y Buhr, M., (2009) "Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios", *Theriogenology*, 72, pp.149-159.
102. Tofilski, A., (2014) "A scientific note on amoeboid movement of honey bee semen", *Apidologie*, 45, pp. 637-640.
103. Turrens, F., (2003) "Mitochondrial formation of reactive oxygen species", *Journal of Physiology*, 552(2), pp. 335-344.
104. Verma, L., (1973) "An ionic basis for a possible mechanism of sperm survival in the spermatheca of the queen honey bee (*Apis mellifera* L.)" *Comparative Biochemistry and Physiology*, 44, pp. 1325-1331.

105. Verma., L., (1974) "Honeybee spermatozoa and their survival in the queen's spermatheca", *Bee World*, 55(2), pp. 53-61.
106. Wharton, K., Dyer, F., y Getty, T., (2008) "Male elimination in the honeybee" *Behaviour Ecology*, 19, pp. 1075–1079.
107. Winston, M., (1991). *The biology of the honeybee*. Ed. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, London, England.
108. Weirich, G., Collins, A., y Williams, V., (2002) "Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*", *Apidologie* 33, pp. 3-14.
109. Woyke, J., (1962) "Natural and artificial insemination of queen honeybees", *Bee World*, 43, pp. 21-25
110. Woyke, J., (1985) "Instrumental insemination of honey-bee queens in the development of beekeeping", *World Animal Review*, 56, pp. 40-44.
111. Woyke, J., Wilde, J., y Wilde, M., (2001) "*Apis dorsata* drone flights, collection of semen from everted endophalli and instrumental insemination of queens", *Apidologie*, 32, pp. 407-416.
112. Woyke, J., (2008) "Why the eversion of the endophallus of honey bee drone stops at the partly everted stage and significance of this", *Apidologie*, 39, pp. 627–636.
113. Zalata, A., Hafez, T., y Comhaire, F., (1995) "Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility", *Human Reproduction*, 10 (6), pp. 1444-1451.
114. Zera, A., Harshman, L., (2001) "The physiology of life history trade-offs in animals", *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32, pp. 95–126.

## 10. ANEXOS

### ANEXO1. Composición del suplemento alimenticio tipo comercial

Proteína cruda	60%, Grasa mínima	5%, Humedad	6%
<b>INGREDIENTES</b>			
Productos de proteína vegetal, Aceite de canola con alto contenido de ácido oleico, Aceite de pasto cedrón			
Ácido ascórbico, ácido fólico, suplemento de vitamina E, A,D <sub>3</sub> , riboflavina, biotina, B <sub>12</sub> , piridoxina HCL, tiana HCL, Niacinamida.			
Cloruro potásico y de sodio, citrato de sodio, pantotenato de calcio, sulfato de magnesio, ferroso, de cobre, de zinc, manganeso, cobalto, potasio, carbonato de magnesio, lactato de calcio, dihidroyoduro de etilendiamina			

### ANEXO 2. Formula diluyente Kiev

Ingrediente	Cantidad
<b>Citrato de sodio</b>	2.430 g
<b>Glucosa</b>	0.300 g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0.210 g
<b>Sulfonamida</b>	0.030 g*
<b>KCl</b>	0.040 g *
<b>Agua Destilada</b>	100 ml *
<b>Con pH 8.37 y osmolaridad de 318 mOsmol/ ml</b>	

**ANEXO 3. Comparación con las concentraciones (ug/g) de elementos minerales de semen y vesículas de zángano en el estudio realizado por Verma (1973) y Gutiérrez (2011).**

Mineral	Semen			Vesículas seminales			Espermateca
	Control*	Suplementado*	Verma	Control*	Suplementado*	Gutiérrez	Verma
<b>P</b>	1875.73	2552.67	0	14939811.3	8317.47	967.84	0
<b>Mg</b>	27.51	22.94	393.82	138580.1	106503.21	686.82	289.28
<b>Ca</b>	-1.47	-2.38	440.77	7.9	3.438	1009.59	625.09
<b>Cu</b>	50.72	29.01	0	63.3	26.82	237.67	0
<b>Zn</b>	19.85	22.15	0	56.5	44.44	65.72	0
<b>Se</b>	199.79	186.08	0	420.1	458.72	0	0
<b>Na</b>	0	0	2114.14	0	0	3297.89	5772.57
<b>K</b>	0	0	7170.94	0	0	4277.96	12121

Concentración de elementos minerales del presente estudio \*