



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

INFORME FINAL DEL TRABAJO PROFESIONAL EN LA MODALIDAD DE PRODUCCIÓN APÍCOLA, PRÁCTICA AL EXTRANJERO GUELPH, CANADÁ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
CHAVACÁN AVILA MARÍA DE LA LUZ

ASESORA: MVZ ADRIANA CORREA BENÍTEZ



MÉXICO, D. F.

Agosto, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

INFORME FINAL DEL TRABAJO PROFESIONAL EN LA MODALIDAD DE PRODUCCIÓN APÍCOLA, PRÁCTICA AL EXTRANJERO GUELPH, CANADÁ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
CHAVACÁN ÁVILA MARÍA DE LA LUZ

ASESOR:

MVZ ADRIANA CORREA BENÍTEZ



MÉXICO, D. F.

Agosto, 2006

DEDICATORIAS

A mi madre †

A mi hermano

A Luis Andrés

Los amo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fuerza para seguir adelante ante las adversidades.

A mi mamá[†] quien aunque no este físicamente vive en mi corazón por siempre, por que gracias a su esfuerzo y cariño es que puedo concluir una meta más en mi vida.

A mi hermano Marcos, por ser más que eso para mi. Por brindarme su cariño y apoyo incondicional siempre.

A mi tía Ma. de los Ángeles, a mi tía Ma. de la Luz[†], a mi abuelita Josefina[†] y a mi abuelito Anselmo por su cariño y enseñanzas a lo largo de mi vida.

A mi tía Norma y a toda mi “nueva” familia por estar conmigo en el momento más difícil de mi vida. Sin ustedes nada hubiera sido igual. Salir adelante fue más sencillo con ustedes a mi lado.

A Luis Andrés por darle brillo a mi vida, por ser la inspiración y la fuerza que me permite continuar con mis metas día a día. Por todo el apoyo, amor y la paciencia brindada para la realización de este trabajo. TAH.D.

A mi “ma” Rosalía y mis hermanitos Dany y Pablo, por la oportunidad que me han brindado de compartir con ustedes tantas cosas,..por el apoyo dado, para poder concluir este trabajo. Le doy gracias a Dios por haber puesto en mi camino personas tan maravillosas como ustedes. LQM

A la doctora Laura Espinosa por que siempre tuvo un minuto para escucharme, no importando que tan ocupada estuviera y brindarme su apoyo, tanto emocional como profesional en todo momento.

A la MVZ Adriana Correa por darme la oportunidad de trabajar dentro del Departamento y por creer en mi trabajo. Por sus valiosos consejos tanto profesionales como personales.

A la M en C Angélica Gris (Angie) y al M en C Daniel Prieto por brindarme su amistad y por todas sus enseñanzas a lo largo de mi estancia en el departamento.

Al PhD Ernesto Guzmán por brindarme la oportunidad de trabajar con él y sobre todo por todas las atenciones que tuvo durante la estancia en Canadá.

A mis amigas del Servicio Social y Trabajo profesional (Nidia y Silvia), por brindarme su amistad y por compartir tanto la alegría como la tristeza juntas.

A mis amigos que lo han sido a lo largo de mi carrera y que a pesar del tiempo y las circunstancias lo continúan siendo, por todos los buenos momentos que pasamos juntos, ustedes saben quienes son.

A todas las personas del departamento de Producción animal AC y OA, que de alguna u otra manera contribuyeron en mi formación y en la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, instituciones de orgullo que me formaron.

CONTENIDO

	Página
Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Contenido	IV
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivo General	3
4. Descripción de actividades desarrolladas	4
4.1 Estancia en la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia (UNAM)	4
4.1.1 Lineamientos de trabajo	4
4.1.2 Preparación de materiales necesarios para el viaje	4
4.1.3 Trámites escolares	5
5. Estancia en la Universidad de Guelph, Ontario, Canadá	6
5.1 Generalidades	6
5.2 Lineamientos de trabajo	7
6. Introducción a los proyectos de investigación	7
6.1 Colaboración en el proyecto para el control de varroa	7
6.2 Colaboración en el proyecto Bayer	9
6.3 Colaboración en el proyecto de miel con diferente método de obtención de reinas	9
6.4 Colaboración con el grupo de transferencia de Tecnología de Guelph	10
7. Entrenamiento en técnicas de muestreo y toma de datos	10
7.1 Primera prueba: ETER	11
7.2 Segunda prueba : AZÚCAR GLASS	11
7.3 Tercera prueba: ALCOHOL AL 60% Y AL 70%	12

8. Experiencia práctica en métodos de manejo de las abejas	13
8.1 Junio	14
8.2 Julio	14
9. Experiencia práctica en técnicas de cosecha y extracción de miel	15
9.1 Agosto	15
10. Experiencia práctica en la cría de abejas reinas	16
11. Visita a varias empresas apícolas altamente tecnificadas	16
11.1 Visita a los apiarios “Ben Hoogan	16
11.2 Visita a la fábrica productora de ácido fórmico	17
11.3 Visita a los apiarios del presidente de la asociación de apicultores de Guelph	18
11.4 Visita con el Dr. Tibor Szabo	18
11.5 Visita a un productor de vino de miel	19
12. Asistencia a congresos y cursos apícolas	19
13. Consulta de base de datos y artículos en la biblioteca de Guelph	20
14. Estancia en el Centro de Mejoramiento Genético, Generación y Transferencia de Tecnología Apícola (INIFAP), municipio de Villa Guerrero, Estado de México	20
14.1 Generalidades	20
14.1.1. Localización	20
14.1.2. Clima	21
14.2 Manejo de la cosecha	21
14.2.1 Cosecha	22
14.2.2 Extracción	22
15. Costos	23
16. Conclusiones	24
17. Literatura citada	25

1. Resumen

CHAVACÁN ÁVILA MARÍA DE LA LUZ presenta el siguiente informe final, realizado bajo la supervisión de la MVZ. Adriana Correa Benítez y el PhD Ernesto Guzmán Novoa, donde de manera general, se describen las actividades realizadas durante el Trabajo Profesional en el área apícola en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, Universidad de Guelph, Ontario, Canadá y en el Centro de Mejoramiento Genético, Generación y Transferencia de Tecnología Apícola (INIFAP), municipio de Villa Guerrero, Estado de México.

Los objetivos generales de la práctica fueron: Desarrollar habilidades en las diferentes áreas de la producción apícola.

Durante las estancias se realizaron diversas actividades entre las que se encuentran: cosecha y extracción de miel, colaboración en proyectos de investigación para el control de varroa, visita a varias empresas apícolas altamente tecnificadas, entrenamiento en técnicas de muestreo, consulta de la base de datos y artículos en la biblioteca de Guelph, Ontario, Canadá.

Al final se obtuvieron habilidades, destrezas y conocimientos generales en el área apícola y se fomentó el desarrollo profesional y ético como Médico Veterinario Zootecnista.

2. Introducción

Las abejas, son insectos sociales pertenecientes al orden de los himenópteros, viven en comunidades llamadas colonias, cada una se encarga de desempeñar una función determinada e imprescindible para el buen funcionamiento de la misma.

Las abejas desde tiempos remotos merecieron la atención del hombre, cuando descubrió que los frutos de su trabajo, la miel, la cera y el propóleo podían serle de utilidad, la primera como sustancia medicinal y aditiva en el arte culinario y los segundos como componentes de muchos preparados curativos y en actividades ceremoniales y de culto. A partir de este momento el hombre aprendió a proteger, cuidar y controlar las colonias de abejas que encontró en árboles huecos o en otras partes naciendo así la apicultura rústica que más tarde se tecnificaría.⁷

Actualmente la apicultura se ha extendido por todo el mundo. En el continente americano las abejas constituyen un medio de vida; ya que el rendimiento de miel promedio en la mayoría de los países varía de 18 a 36 kilos por colmena mientras que la producción promedio en las mejores zonas para apicultura puede ser de 90, 135 o hasta 180 kilos. Norteamérica tiene casi cinco millones de colmenas con un promedio de miel de 25 kilos en EE.UU. y 55 kilos en Canadá, llegando hasta una producción de 100kg por colmena en una buena temporada de floración en éste último país.³

Canadá es uno de los países mejor reconocidos a nivel mundial por la calidad y sabor de su miel, concentrándose el 78% de su producción en las provincias de Alberta, Saskatchewan y Manitoba.⁵

Por último cabe señalar que las abejas, son insectos que forman parte del medio natural como agentes polinizadores, por lo tanto, son los responsables de la producción de semillas y frutos de muchas plantas. Además, las abejas, mediante la apicultura dan productos que han estado siempre al lado de los humanos, tales como la miel, propóleo, cera, veneno, polen y la jalea real, estos dos últimos son productos apícolas, ricos en principios esenciales, que se han incorporado recientemente a la nutrición humana.^{4,5,6}

Así pues, reconociendo la función social y medioambiental que las abejas cumplen, es necesario garantizar su presencia en nuestros campos y sitios naturales lo cual implica, hoy en día, mantener viva la apicultura.

3. Objetivo General

Desarrollar las habilidades y destrezas en las diferentes áreas de la producción apícola, así como, fomentar en el alumno su desarrollo profesional y ético como Médico Veterinario Zootecnista

4. Descripción de actividades desarrolladas

4.1 Estancia en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

4.1.1 Lineamientos de trabajo

La permanencia en el Trabajo Profesional se basó en los siguientes aspectos:

- Cumplir con el 100% de asistencias
- Puntualidad, buena presencia y excelente conducta
- Cumplimiento ético y profesional en todo momento
- Respeto a todas las personas que entren en contacto con el Trabajo Profesional
- Llevar el uniforme perfectamente lavado y el equipo de trabajo indispensable para trabajar en cada estancia
- Respetar el reglamento interno de los centros y guardar el debido respeto al tutor y al cuerpo colegiado
- En las primeras cuatro semanas se le informará al alumno si esta cumpliendo con los requisitos necesarios y se tomará la decisión pertinente en relación con su permanencia en esta modalidad de titulación y así evitar pérdidas de tiempo por ambas partes

4.1.2 Preparación de materiales necesarios para el viaje

El material indispensable para desarrollar el Trabajo Profesional consistió:

- Overol
- Velo de apicultor con gorro integrado
- Par de guantes de apicultor
- Par de botas claras o tenis blancos de bota
- Bata blanca
- Cuña
- Ahumador
- Encendedor o cerillos
- Caja de Flevocortid 100
- Jeringas de 3ml
- Caja de tabletas de avapena de 8mg

4.1.3 Trámites escolares

Para realizar la estancia en la Universidad de Guelph fue indispensable realizar trámites legales para viajar al extranjero tales como:

- Carta de invitación por parte del PhD Ernesto Guzmán a la Universidad de Guelph, Ontario Canadá
- Visita a la embajada de Canadá en México para solicitar los requisitos necesarios para viajar a éste país
- Toma de fotografías tamaño pasaporte
- Elaboración de fichas de pago para pasaporte y pago del mismo en el banco
- Solicitud de pasaporte ordinario y adquisición del mismo en cualquiera de las delegaciones políticas del D. F.
- Compra y adquisición de boletos para viaje redondo México –Toronto en la compañía de viajes “Mundo Joven”

5. Estancia en la Universidad de Guelph, Ontario Canadá

5.1 Generalidades

El Trabajo Profesional fue realizado en la ciudad de Guelph, que se encuentra ubicada en el suroeste de la provincia de Ontario, Canadá, aproximadamente a 100 Km del centro de Toronto. Colinda al Norte con Fergus Elora, al Sur con Puslinch Township, al Este con Halton Hills y al Oeste con Kitchener, Waterloo. Con una latitud de 43° 33' Norte y una longitud de 80° 15' Oeste. La temperatura media anual es alrededor de 6.5° C, siendo los meses más calurosos Mayo, Junio, Julio, Agosto y Septiembre con temperaturas de 12.3° C hasta 19.7° C y los meses más fríos Diciembre, Enero y Febrero en los cuales se llegan alcanzar temperaturas de hasta -7.6° C. La población de Guelph se estima en alrededor de 125,872 habitantes y se proyecta que para el año 2007 sea de 153,000 habitantes.^{2, 4} (Figs. 1 y 2)



Figura 1. Mapa geográfico de Canadá



Figura 2. Ubicación de la Ciudad de Guelph

5.2 Lineamientos de trabajo

Los mismos lineamientos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia fueron establecidos para el Trabajo Profesional en la Universidad de Guelph.

Se organizaron grupos de trabajo para desempeñar las actividades asignadas, y así mismo se estableció un horario de trabajo de 8:30 a 17:00 horas de lunes a viernes, y en caso necesario se trabajó los fines de semana.

6. Introducción a los proyectos de investigación

Se colaboró en 5 proyectos de investigación durante la estancia, sin embargo, cabe hacer mención que sólo se procederá a describir las actividades realizadas y que los resultados de los mismos aún no están concluidos, además que son parte de la tesis de Maestría y Doctorado de los autores del mismo.

6.1 Colaboración en el proyecto para el control de varroa

Este labor consistió en crear las condiciones favorables para el desarrollo del ácaro *Varroa destructor* con la finalidad de infestar las colmenas designadas para este proyecto. Posteriormente se probaría el control químico contra el ácaro con Timol (el timol es un producto natural extracto de la planta aromática llamada tomillo, utilizada en la cocina mediterránea, de modo que sus residuos no se consideran tóxicos, se puede conseguir bajo el nombre comercial de ApilifeVAR®⁹⁾ y el control natural por medio del comportamiento higiénico de las abejas (acicalamiento).

La ayuda proporcionada a este proyecto se realizó en diferentes tiempos de acuerdo al avance de la floración, período en el cual la población de abejas aumenta.

Los pasos en los cuales se colaboró son los siguientes:

- Se llenaron 90 cajas Benton con 20 abejas “baby”, es decir, casi recién emergidas esto con la finalidad de que ellas infestaran a las colonias experimentales. (Fig. 3)

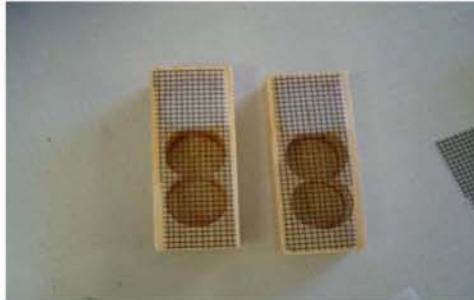


Figura 3. Caja Benton utilizada para el transporte de abejas

- Se colocaron bastidores de cámara de cría de color verde en las colmenas experimentales con la finalidad de que dichos bastidores fueran utilizados por las abejas para la cría de zánganos, esto, por la preferencia de varroa por parasitar a los zánganos. La introducción se llevó acabo mediante el intercambio de un bastidor de alimento de la cámara de cría por uno especial para la cría de zánganos. (Fig. 4)



Figura 4. Introducción de bastidor para cría de zánganos

- Se prepararon folderes con pegamento especial para colocarlos en el piso de las colmenas, con la finalidad de que al recolectarlos se contaran el número de varroas que caían al piso de la colmena por acción del acicalamiento de las abejas. Los folderes se recolectaron 8 días después de su colocación y se llevaron al Laboratorio Apícola para ser contadas. (Fig. 5)



Figura 5. Folder recolectado con varroas

6.2 Colaboración en el proyecto de Bayer®

Este proyecto patrocinado por Bayer® consistió en evaluar el grado de toxicidad de un plaguicida, en insectos polinizadores. En esta labor se marcaron 50 abejas recién emergidas con etiquetas circulares de colores con su respectivo número (1 al 50), dichos números eran colocados en la parte dorsal del tórax de las abejas. Los colores empleados fueron: azul, naranja, blanco y verde.

Una vez que las abejas fueron marcadas, se introdujeron 50 abejas en cada una de las 28 colmenas experimentales repartidas de la siguiente manera: 4 colmenas por 7 apiarios.

Las revisiones se realizaban cada tres días, en este caso se participó en un monitoreo. En dicho monitoreo se abrió la colmena para localizar a la reina y evitar matarla. La revisión fue llevada a cabo tanto en el alza como en la cámara de cría, ahí comenzó la identificación de las abejas, y fueron realizados los registros, que contenían el número y el color de las abejas que se encontraban. Esto fue para medir el número de abejas que mueren y con ello el grado de aceptación del producto. En este caso las abejas son los sujetos experimentales.

6.3 Colaboración en el proyecto de producción de miel con diferente método de obtención de reinas

Este proyecto consistió en comparar la producción de miel entre una reina introducida en la celda real en una colonia de abejas contra una reina criada por las obreras de manera natural.

En este proyecto se cooperó en el pesaje de las alzas de dichas colmenas para posteriormente sacar el promedio de producción.

Primero eran pesadas las alzas vacías y después las alzas con miel, llevando registros de la producción obtenida por colmena. (Fig. 6)



Figura 6. Pesaje de alzas

6.4 Colaboración con el grupo de transferencia de tecnología de Guelph

Se colaboró en el proyecto de investigación de control de varroa con Fluvalinato (el Fluvalinato es un piretroide, cuya presentación comercial es en forma de tiras de material plástico flexible (PVC) impregnadas con 0.8 g cada tira, que se introducen en las colmenas, entre los bastidores durante un tiempo variable de 6 a 8 semanas, el nombre comercial con el que se puede conseguir es Apistan®¹⁰), este proyecto consistía en probar el grado de resistencia de varroa al producto.

La colaboración consistió en utilizar 100 frascos los cuales fueron repartidos de la siguiente manera:

25 frascos fueron para el grupo control el cual contenía acetona

25 frascos contenían Fluvalinato a una concentración de 50%

25 frascos contenían Fluvalinato a una concentración del 100%

25 frascos contenían Fluvalinato a una concentración del 300%

(Fig. 7)

El contenido del frasco se evaporaba mediante movimientos rotarios en los dedos de una persona.



Figura 7. Frascos con diferentes concentraciones de fluvalinato

7. Entrenamiento en técnicas de muestreo y toma de datos

Se colaboró con un grupo de trabajo dedicado a la validación y transferencia de tecnología hacia los apicultores. En este proyecto se apoyó en la realización de tres pruebas y técnicas de muestreo para el diagnóstico del ácaro *Varroa destructor* (ectoparásito de las abejas). El trabajo consistió en tomar muestras tanto de alzas como de cámara de cría del apiario dedicado a la producción de miel orgánica llamado "Willoubee" el cual cuenta con 15 colmenas.

7.1 Primera prueba: ETER

Consistió en abrir la colmena y colocar el alza sobre la tapa externa de la misma, para posteriormente sacudir dos o tres bastidores sobre una charola, de la cual con ayuda de una cuchara medidora de cocina fue tomada una muestra de abejas, específicamente $\frac{1}{4}$ de abejas. En el caso de la cámara de cría se localizó a la reina de primera instancia y fue encerrada en una caja atrapa-reina para evitar que fuera colectada durante el muestreo.

Este $\frac{1}{4}$ de abejas fue colocado en un frasco para realizar la prueba de éter, es decir, se roció un poco de éter en spray al frasco que contenía a las abejas y posteriormente se agitó durante 1 minuto. (Fig. 8)

Una vez realizado este paso eran observadas las paredes o bien la tapa del frasco para verificar si estaban adheridas varroas, en caso de sí encontrar ácaros éstos eran contados y la cantidad, anotada en un registro junto al número de colmena correspondiente.



Figura 8. Éter en spray para anestesiarse abejas

7.2 Segunda Prueba: AZÚCAR GLASS

Esta prueba consistió en abrir la colmena y colocar el alza sobre la tapa externa de la misma, para posteriormente sacudir dos o tres bastidores sobre una charola, de la cual con ayuda de una cuchara medidora de cocina se tomó una muestra de abejas, específicamente $\frac{1}{4}$ de abejas.

En el caso de la cámara de cría se localizó a la reina de primera instancia y fue encerrada en una caja atrapa-reina para evitar que fuera colectada durante el muestreo.

Este $\frac{1}{4}$ de abejas fue colocado en un frasco y se les espolvoreo azúcar glass, para posteriormente agitarlas durante 1 minuto. Una vez realizado este paso eran observadas las paredes o bien la tapa del frasco para verificar si estaban adheridas varroas, que hubieran sido desprendidas por acción del azúcar glass, en caso de sí encontrar ácaros éstos eran contados y la cantidad, anotada en un registro junto al número de colmena correspondiente. (Fig. 9).



Figura 9. Abejas con azúcar glass

7.3 Tercera prueba: ALCOHOL AL 60% Y 70%

Esta prueba consistió en abrir la colmena y colocar el alza sobre la tapa externa de la misma, para posteriormente sacudir dos o tres bastidores sobre una charola, de la cual con ayuda de una cuchara medidora de cocina se tomó una muestra de abejas, específicamente $\frac{1}{4}$ de abejas. En el caso de la cámara de cría se localizó a la reina de primera instancia y fue encerrada en una caja atrapa-reina para evitar que fuera colectada durante el muestreo.

Este $\frac{1}{4}$ de abejas fue colocado en un frasco y se les agregó alcohol en una cantidad que las cubriera por completo. Una vez realizado este paso se agitaron por 1 minuto y fueron observadas las paredes o bien la tapa del frasco para verificar si estaban adheridas varroas, que hubieran sido desprendidas por acción del alcohol, en caso de sí encontrar ácaros éstos eran contados y la cantidad, anotada en un registro junto al número de colmena correspondiente.

En el caso de la cámara de cría se realizó una cuarta prueba la cual consistió en desopercular las celdillas de cría de obrera y de cría de zángano, específicamente 100 celdas para cada uno. (Fig. 10)

En cada celda desoperculada se verificó la presencia o ausencia del ácaro varroa y así mismo fue realizado el conteo de los ácaros encontrados por pupa desoperculada, encontrándose mayor número de varroas en la cría de zánganos.



Figura 10. Desoperculado de celdas de obreras

Cabe mencionar que los resultados de cada una de las pruebas fueron anotados en el número correspondiente de colmena.

8. Experiencia práctica en métodos de manejo de las abejas

El calendario apícola que se lleva a cabo en el Laboratorio de abejas se basa en las siguientes figuras: (Fig. 11)



Figura 11. Calendario apícola de Guelph

MES	ACTIVIDAD
Enero-Febrero	Estudio o mantenimiento del equipo
Marzo	Revisión de colmenas
Abril	Preparación para comenzar el manejo
Mayo	Acciones preventivas para la enjambrazón
Junio	Colocación de alzas y adición de bastidores para aumentar el espacio de postura para la reina
Julio	Revisión: presencia de reina, enfermedades, alimento, celdas de zánganos. Colocación y retiro de alzas
Agosto	Cosecha de miel
Septiembre	Extracción de miel
Octubre	Alimentación
Noviembre-Diciembre	Preparación de las colmenas para el invierno

Cuadro 1. Calendario de actividades apícolas de Canadá

De acuerdo al Calendario apícola antes mencionado fueron realizadas las actividades correspondientes a cada mes de estancia en la ciudad de Guelph.

Como primera actividad se recorrieron las instalaciones del Laboratorio Apícola con la finalidad de conocer las diferentes áreas del lugar y así poder desempeñar un buen trabajo. (Fig. 12)



Figura 12. Laboratorio apícola

8.1 JUNIO

Al comienzo de la estancia fue llevada a cabo la explicación acerca del manejo que se realiza en las colmenas. En el mes de Junio se colocaron alzas en los 5 apiarios pertenecientes a la Universidad de Guelph.

8.2 JULIO

En este mes como lo indica el calendario apícola se realizó la colocación y el retiro de alzas. En algunos apiarios fue colocada una especie de trampa entre el alza que estaba junto a la cámara de cría y las otras dos o tres alzas que se encontraban colocadas en la colmena, esto, con la finalidad de disminuir la entrada de las abejas al alza más cercana a la cámara de cría y así aumentar el almacenaje en las alzas recién colocadas.

Una excepción de las actividades del calendario apícola fue la realización del mantenimiento del equipo el cual en este caso consistió en la construcción de 200 alzas para la siguiente temporada de manejo.

El trabajo consistió en el ensamblado, pintado y adición de accesorios útiles para el manejo de las alzas. (Fig. 13)



Figura 13. Alzas construidas

9. Experiencia práctica en técnicas de cosecha y extracción de miel

9.1 AGOSTO

En este mes el trabajo consistió en la extracción y desoperculado de los bastidores de miel. En el caso de Canadá la mayoría de los productores cuentan con un sistema de cosecha, extracción y desoperculado altamente tecnificado en comparación con México.

La cosecha, es decir, el retiro de alzas con bastidores llenos de miel, es llevada a cabo con ayuda de una grúa, esto debido a la cantidad de alzas que son retiradas de las colmenas, en ocasiones hasta siete por colmena. (Fig. 14)



Figura 14. Retiro de alzas

Una vez retiradas, las alzas son transportadas a la sala de extracción en donde el proceso es automatizado desde el desoperculado hasta la extracción.

El proceso es el siguiente:

- ⊗ Se colocan de cuatro a cinco alzas en una máquina que tiene un sensor óptico mediante el cual va subiendo alza tras alza conforme son quitados los bastidores.
- ⊗ El bastidor es colocado en una base para bastidor la cual al darle vuelta a una manivela el bastidor gira y entra en contacto con las cuchillas para el desoperculado.
- ⊗ Una vez desoperculados los bastidores se forma una fila de los mismos en la máquina para posteriormente pasar al extractor el cual es tipo tangencial.
- ⊗ Cuando los bastidores terminan el proceso de extracción pasan a la parte final de la maquinaria en donde se toman para colocarlos en las alzas que serán nuevamente colocadas en las colmenas.
- ⊗ Una vez que la miel fue extractada pasa a un bote almacenador el cual se ocupa para ayudarse en el envasado de la miel.
- ⊗ El envasado fue realizado en envases de vidrio de 1Litro o bien en tambos con una capacidad de 320 kg, los cuales previamente habían sido lavados y pesados.

10. Experiencia práctica en la cría de abejas reinas

Como parte de las visitas realizadas durante la estancia se visitó un criadero de reinas, ubicado en una isla llamada “Thorah”, en esta isla fue realizada la actividad de buscar a las reinas para posteriormente colectarlas y colocar una celda real nueva, obtenida de una colmena progenitora y así obtener más reinas. (Fig. 15)

El método utilizado para obtener a las reinas es el conocido como “Dolittle” con el cual son obtenidas 45 reinas. (Fig. 16)

La finalidad de tener el criadero en una isla es la de asegurar que las reinas obtenidas únicamente se apareen con zánganos del lugar y con ello mantener un pie de cría.



Figura 15. Isla Thorah



Figura 16. Bastidor para cría de reina

11. Visita a varias empresas apícolas altamente tecnificadas

11.1 Visita apiarios “Ben Hoogan”

En éste lugar fue explicado el funcionamiento del proceso de extracción de miel con la maquinaria del mismo tipo que la utilizada en el Laboratorio Apícola ya mencionado con anterioridad. A su vez fue explicado el proceso de extracción del jarabe de maple, el cual es realizado haciendo perforaciones en los árboles de maple de donde se colecta la savia o jugo de maple con ayuda de delgadas mangueras conectadas a los árboles de maple, y gracias a la presión creada, la savia sale de las mangueras a cubetas que cuelgan de éstos. Un árbol grande puede tener hasta cuatro perforaciones surtiendo savia.

Se requieren 40 litros de savia para hacer un litro de jarabe de maple. En general una sola perforación produce cuarenta litros de jarabe de maple. (Fig. 17)



Figura 17. Extracción de jarabe de maple

11.2 Visita a la fábrica productora de ácido fórmico

En esta visita fue observado el proceso de elaboración de placas impregnadas de ácido fórmico, que son utilizadas para el control de varroa. En un principio los agentes anti-varroa se administraban en tiras fumígenas, espolvoreo, evaporación o asperjado, utilizando fundamentalmente piretroides (flumetrina, fluvalinato y acrinatrina, sin embargo, su utilización indiscriminada, así como una inadecuada aplicación ha dado lugar a una disminución de su efecto, fundamentalmente por la aparición de resistencia generada por los ácaros a los componentes principales. Esto ha propiciado que una gran parte de las investigaciones actuales involucren sustancias naturales no contaminantes en el control de la varroasis. Las sustancias más utilizadas, aunque por el momento con resultados variables son el ácido láctico, el ácido fórmico y extractos de aceites vegetales. En Canadá el uso de ácido fórmico como tratamiento contra varroa en abejas se encuentra legalizado y es ampliamente recomendado. (Fig. 18)



Figura 18. Placa impregnada de

ácido fórmico

11.3 Visita a los apiarios del presidente de la asociación de apicultores de Guelph

En esta visita se recorrieron las instalaciones de extracción, almacenaje de equipo tales como alzas, bastidores y cubiertas para invierno y uno de los apiarios en el cual fue posible conocer otro tipo de colmenas es decir, las colmenas tipo Langstroht. (Fig. 19)



Figura 19. Apiario con colmenas tipo Langstroht

11.4 Visita con el Dr. Tibor I. Szabo

En esta visita fue recorrido todo el jardín del Dr. Szabo en el cual se pudieron observar las diferentes y principales especies de árboles y plantas néctar-poliníferas de Canadá, principalmente las de Guelph. Algunas de ellas son:. (Cuadro 2)

ESPECIES DE PLANTAS	FLORACIÓN	PRODUCCIÓN DE MIEL Kg / ha
Anis azul (<i>Agastache foeniculum</i>)	Julio, Agosto y Septiembre	2,802-3,463
Anis blanco (<i>Agastache foeniculum</i>)	Julio, Agosto y Septiembre	1,000
Flor de globo azul (<i>Echinops rito</i>)	Julio y Agosto	939
Planta de miel Chapman (<i>Echinops sphaerocephalus</i>)	Julio y Agosto	1,646
Chivirico (<i>Leonurus sibiricus</i>)	Julio y Agosto	¿?
Planta de miel dorada (<i>Verbesina alternifolia</i>)	Agosto	¿?
Orégano (<i>Origanum vulgare hirtum</i>)	Julio, Agosto y Septiembre	101-200
Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>)	Junio y Julio	51-100
Menta de montaña (<i>Pycnanthemum pilosum</i>)	Julio y Agosto	1,705
Poppy oriental (<i>Papaver orientale</i>)	Mayo y Junio	¿?
Poppy anual roja y rosa (<i>Papaver ssp</i>)	Junio y Julio	¿?
Planta de miel Simpson (<i>Scrophularia marilandica</i>)	Julio y Agosto	>500

Cuadro 2. Principales especies de árboles y plantas néctar-poliníferas en Canadá

¿?= Se desconocen los datos.

11.5 Visita a un productor de vino de miel

La última visita fue a un apicultor que además de producir miel, también producía vino de miel de diferentes sabores. (Fig. 20)



Figura 20. Vino de miel

12. Asistencia a congresos y cursos apícolas

Se participó como asistente en un Curso Teórico - Práctico impartido por el grupo de transferencia de tecnología en Guelph.

En dicho curso se habló acerca de:

- Biología y anatomía de las tres castas de abejas, es decir, la reina, obrera y el zángano
- Calendario de actividades apícolas llevadas a cabo en Guelph, desglosando las actividades por mes y recomendaciones
- Enfermedades que afectan tanto a las abejas adultas como a la cría, así como sus métodos de prevención, control y tratamiento recomendado para cada una de ellas. Específicamente se habló acerca de Loque Americana, Loque Europea, Cría de Cal, Cría Ensacada, Acariosis y Varroosis.
- Métodos de monitoreo para el control de varroa (ya mencionados en el punto 2.4 de este trabajo).

Una vez que esta información fue impartida, se prosiguió a la parte práctica en la cual se nos enseñó desde como abrir una colmena, hasta como tomar a la reina y marcarla.

También se participó como asistente al Congreso de apicultores en Lanark en el cual fueron abordados temas tales como: (Fig. 21)

- ✓ Importación de abejas rusas
- ✓ Apicultura en Manitoba
- ✓ Manejo contra Ambiente contra Genética: Varroosis. Impartida por el PhD Ernesto Guzmán



Figura 21. Congreso en Lanark

13. Consulta de base de datos y artículos en biblioteca

La Universidad de Guelph cuenta con una biblioteca que forma parte de un sistema de información compartida con la Universidad de Waterloo y Wilfrid Laurier con lo cual es posible tener acceso a un total de 7.5 millones de títulos, mediante el sistema automatizado llamado TRELIS, éste sistema provee un programa integrado de las colecciones y servicios entre las tres universidades. La biblioteca de Guelph provee artículos electrónicos, índices de libros en bases de datos, resúmenes y sitios Web para ampliar búsquedas, con ayuda de un total de 400 computadoras.

En este lugar fue realizada la búsqueda de la información necesaria para llevar a cabo la elaboración del tema de investigación asignado, en este caso, información acerca de la criopreservación del semen de zángano.

14. Estancia en el Centro de mejoramiento genético, generación y transferencia de tecnología apícola (INIFAP*), Municipio de Villa Guerrero, Estado de México.

14.1 Generalidades ¹

14.1.1 Localización

El municipio de Tequaloyan Villa Guerrero, se ubica aproximadamente entre los 18° 34' y 19° 05' de latitud norte; y los 99° 36' y 99° 46' de longitud occidental. El asentamiento urbano principal es la Villa Guerrero, considerada oficialmente como cabecera y sede del gobierno municipal; se localiza a los 18° 57' 36" de latitud norte, y a los 99° 38' 30" de longitud occidental. ¹

Colinda hacia el norte con Zinacantepec, Toluca, Calimaya y Tenango del Valle; hacia el oriente, con los municipios de Tenancingo y Zumpahuacan; al sur con Ixtapan de la Sal; y al occidente con el mismo Ixtapan de la Sal y con Coatepec Harinas. ¹ (Fig. 21)

14.1.2 Clima

Villa Guerrero posee un clima en el que predomina el templado, subhúmedo con lluvias en verano e invierno, su régimen pluvial en verano es por lo menos 10 veces mayor en el mes más húmedo de la mitad caliente del año, que en el más seco. Su temperatura máxima es de 39° C y la mínima es de 2° C. Su temperatura media en el mes más frío es inferior a 13° C pero superior a -3° C. Su temperatura media anual, oscila alrededor de los 18.8° C. ¹

Por lo general la temporada de lluvias inicia a finales del mes de Abril, pero suele interrumpirse durante el mes de Mayo, continúa durante los meses de junio y julio y se agudiza en los de agosto y septiembre. ¹

Por su privilegiada situación geográfica y su excelente clima templado, Villa Guerrero es origen de una muy variada flora, tanto silvestre como cultivada.

* *INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*



Figura 21. Ubicación geográfica del municipio de Villa Guerrero, Estado de México

14.2 Manejo en la cosecha

Descripción de actividades

Durante la estancia en el Centro de mejoramiento genético, generación y transferencia de tecnología apícola, Municipio de Villa Guerrero se realizó cosecha y extracción de miel.

14.2.1 Cosecha

La cosecha fue llevada a cabo en los diferentes apiarios pertenecientes al centro, ubicados aproximadamente a una hora de camino del mismo. La época de cosecha en ésta región dura aproximadamente un mes. Algunas de las flores que abundan son acahual (*Tithonia rotundifolia*) y aceitilla (*Bidens odorata*).⁸

En los apiarios fueron utilizados como método de cosecha el uso de la tapa negra, la cual tiene como finalidad hacer que bajen las abejas a la cámara de cría por medio de una sustancia que era rociada en la tapa, esta sustancia es la esencia de almendra y con ello se evita que las abejas queden en el alza, charolas salvamiel y tapas internas para cubrir las alzas cosechadas. El criterio a seguir al momento de la cosecha es que los bastidores tengan un mínimo de 80% de miel operculada y sin excesos de cría y polen. Por cada alza retirada era colocada otra vacía en su lugar con la finalidad que las abejas las llenaran de nuevo con miel.

Cada día fueron cosechados 3 apiarios reuniendo un promedio de 70 alzas por día, las cuales fueron transportadas en una camioneta con capacidad de carga de 1.5 toneladas a la sala de extracción, la cual se encuentra ubicada en un punto medio entre el centro y los apiarios.

14.2.2 Extracción

En la sala de extracción se descargan todas las alzas recolectadas de los apiarios trabajados, en ella se debe impedir la entrada al mayor número de abejas posibles durante la descarga.

El proceso de extracción comienza con el desoperculado de todos los bastidores empleando un cuchillo eléctrico. El opérculo cae en un tanque desoperculador el cual tiene salida para la miel que queda en la cera, esta miel es recolectada en una cubeta para su posterior filtrado.

Los bastidores desoperculados son colocados en un banco de madera para su posterior extracción. El extractor consiste en un recipiente cilíndrico de acero inoxidable con capacidad para 60 bastidores, el mecanismo de extracción es por medio de fuerza centrífuga.

A la salida del extractor es colocada una cubeta para recoger la miel que es distribuida por medio de una llave de guillotina. Una vez que los bastidores son sacados del extractor vacíos son colocados en alzas vacías que posteriormente serán colocadas de nuevo en los apiarios. (Fig. 22)

La miel extractada fue filtrada para retirar impurezas (patas, polen, alas, abejas) y envasada en tambos de una capacidad de 320kg aproximadamente.



Figura 22. Acomodo de bastidores vacíos en alzas

15. Costos

Antes de llegar a la Universidad de Guelph

- Toma de fotografías tamaño pasaporte. **Costo: \$42.00**
- Elaboración de fichas de pago para pasaporte y pago del mismo en el banco. **Costo: \$340.00**
- Solicitud de pasaporte ordinario y adquisición del mismo en cualquiera de las delegaciones políticas del D. F.
- Compra y adquisición de boletos para viaje redondo México –Toronto en la compañía de viajes “Mundo Joven”.
- Membresía Mundo Joven: **\$135.00**
- Cargos por servicios lata Internacional. **\$333.04***
- Boleto de viaje redondo México-Toronto, Toronto-México: **\$5,003.80***
- Seguro de vida por dos meses: **\$1,029.30***

TOTAL: \$6,883.14

*Nota: Los precios varían de acuerdo al tipo de cambio que haya y a la temporada de viaje (baja o alta).

En la Universidad de Guelph

- Hospedaje por 1 mes de 22 de Junio a 22 de Julio: **223.00 dólares**
- Hospedaje por 1 mes y medio de 22 de Junio al 29 de Agosto: **387.50 dólares.**
- Alimentación: **600 dólares**
- Transporte: **40 dólares**
- Extras: **850 dólares**

TOTAL: 2100.50 DÓLARES, 21,500 PESOS

En Villa Guerrero, Estado de México

- ✓ Transporte: **\$50.00**
- ✓ Hospedaje: **\$0.00**
- ✓ Alimentación: **\$200.00**
- ✓ Extras: **\$10.00**

TOTAL: 260 PESOS

GRAN TOTAL: 28, 643.14 PESOS

16. Conclusiones

Las abejas cumplen una función social y medioambiental por lo que, es necesario garantizar su presencia en nuestros campos y sitios naturales, esto implica que el Médico Veterinario Zootecnista se comprometa a la continua actualización y capacitación en el área.

En este caso el haber realizado el Trabajo Profesional en Canadá permitió la comparación entre las dos razas o subespecies de abejas más importantes; europeas y africanas, pudiéndose notar las diferencias existentes entre ambas, tales como: docilidad al manejar a las abejas europeas, la posibilidad de realizar un manejo más lento y sin la necesidad de un equipo de protección completo, pues únicamente se requiere del uso del velo. Dentro del ámbito social el tipo de apicultura en Canadá a diferencia de México la mayoría de sus apicultores tienen abejas por pasatiempo y no como una forma de generar ingresos para subsistir.

En cuanto a la cantidad de miel producida la diferencia es muy notoria pues como ya es sabido la abeja europea tiende a producir y almacenar su miel en mayor cantidad que la abeja africana por lo cual se pudieron comparar los niveles de producción de miel, los cuales son más altos en Canadá, pues en este lugar se alcanzan hasta los 90 kg por colmena.

Por lo tanto de acuerdo al objetivo general, las habilidades prácticas en las diferentes áreas de la producción apícola, así como, el desarrollo profesional fueron cumplidos.

17. Literatura citada

1. Enciclopedia de los Municipios de México Disponible en :
<http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/mexico/mpios/15107a.htm>
2. Weather data for the bee lab URL Disponible en:
http://climate.weatheroffice.ec.gc.ca/climate_normals/results_e.html?Province=ONT%20&StationName=&SearchType=&LocateBy=Province&Proximity=25&ProximityFrom=City&StationNumber=&IDType=MSC&CityName=&ParkName=&LatitudeDegrees=&LatitudeMinutes=&LongitudeDegrees=&LongitudeMinutes=&NormalsClass=A&SelNormals=&StnId=4772&
3. Honey production for Ontario URL Disponible en:
<http://www.omafra.gov.on.ca/english/stats/hort/honey.html>
4. The free encyclopedia Disponible en:
http://en.wikipedia.org/wiki/Guelph,_Ontario
5. Canadian Honey Council URL Disponible en:
<http://www.honeycouncil.ca/users/folder.asp?FolderID=1733>
6. Canadian Honey Council URL Disponible en:
<http://www.honeycouncil.ca/users/folder.asp?FolderID=2963>
7. Apuntes de apicultura institut valencia de investigacions agraries Disponible en:
<http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/historia/Las%20abejas%20de%20miel%20y%20los%20humanos.PDF>
8. SAGARPA Manual de apicultura básica Julio 2001
9. Vandame R, Argüello O. Varroa: Un problema del pasado? Memorias del 8º Congreso Internacional de Actualización Apícola, Puebla, Puebla, México.SAGARPA, ANMVEA, Secretaria de Desarrollo Rural 2001: 84-90
10. Higes, M. & Llorente, J. & Sanz, A. (1998, Mayo-Junio 89) Varroa. Sensibilidad al Fluvalinato Disponible en: <http://www.delphos.es/beeypress/index.html>



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TRABAJO FINAL DEL TRABAJO PROFESIONAL
EN LA MODALIDAD DE PRODUCCIÓN APÍCOLA

AVANCES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE
ZÁNGANOS (*Apis mellifera* L).

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
CHAVACÁN ÁVILA MARÍA DE LA LUZ

ASESOR (ES): PhD ERNESTO GUZMÁN NOVOA
MVZ ADRIANA CORREA BENÍTEZ

MÉXICO, D. F.

Agosto, 2006





Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TRABAJO FINAL DEL TRABAJO PROFESIONAL
EN LA MODALIDAD DE PRODUCCIÓN APÍCOLA

AVANCES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE
ZÁNGANOS (*Apis mellifera* L).

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
CHAVACÁN ÁVILA MARÍA DE LA LUZ

ASESOR: _____
MVZ ADRIANA CORREA BENÍTEZ



MÉXICO, D. F.

Agosto, 2006

CONTENIDO

	Pagina
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Justificación	4
3. El zángano	5
3.1 Generalidades	5
3.2 Biología del zángano	5
3.3 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del zángano	5
3.4 Producción de espermatozoides	8
3.5 Características del espermatozoide	9
3.6 Composición del semen	12
3.7 Apareamiento con la reina	12
4. Métodos de obtención de semen	15
4.1 Métodos	15
4.1.1 Estimulación del zángano	15
4.1.2 Disección de vesículas seminales	15
4.1.3 Lavado de semen	16
4.1.4 Banco de abejas reinas	16
4.2 Equipos de inseminación	16
4.2.1 Aparato Mackensen	16
4.2.2 Aparato Harbo	17
4.2.3 Aparato Swienty	17

4.2.4 Otros	18
5. Preservación del semen	18
5.1 Preservación del semen en la espermoteca de abejas reina	18
5.2 Preservación artificial del semen	20
6. Temperaturas para conservar el semen	25
7. Métodos para determinar la viabilidad del semen	26
8. Factores que pueden alterar la calidad y viabilidad del semen	27
8.1 Tiempo de almacenamiento	27
8.2 Edad del zángano	27
8.3 Contaminación	28
8.4 Congelación y descongelación	28
9. Comparación entre el uso de semen fresco y semen criopreservado en la producción de abejas	29
10. Desventajas del uso de semen criopreservado	31
10.1 Mutaciones	31
10.2 Mortalidad de la primera generación de las hijas de abejas reinas producidas a partir de semen criopreservado	32
11. Otros estudios acerca de la criopreservación	32
12. Discusión	33
13. Conclusiones	35
14. Literatura citada	37

RESUMEN

CHAVACÁN ÁVILA MARÍA DE LA LUZ. Avances en la criopreservación de semen de zánganos (*Apis mellifera* L.) (Bajo la dirección del PhD Ernesto Guzmán Novoa y de la MVZ Adriana Correa Benítez).

El uso de prácticas para preservar el semen de zánganos por largos períodos de tiempo ha sido desarrollado a través de los años por diversos investigadores, desde que Taber y Blum reportaron la posibilidad de conservar el semen de abeja; Harbo, Verma, Kaftanoglu, Peng, Collins, entre otros, han continuado el análisis de las temperaturas más aceptables para la conservación del semen, probando diferentes rangos de temperatura, diluyentes ideales y otros factores que pudieran alterar la viabilidad del semen.

Con el desarrollo y mejoramiento de la preservación del semen sería posible conservar líneas genéticas, mantener abejas con características seleccionadas e importantes a nivel comercial, reducir la introducción de enfermedades a las colmenas y conducir a programas de cría y experimentos genéticos.

Por todo lo anterior es importante recapitular los estudios que se han llevado a cabo para preservar el semen de abejas melíferas y discutir los resultados más promisorios hasta ahora encontrados. Así como también advertir sobre los efectos adversos reportados a lo largo de dichos estudios.

Palabras clave: *Apis mellifera*, semen, preservación, diluyentes, temperatura

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo se han realizado estudios sobre la preservación del semen en las diferentes especies animales, principalmente en las llamadas grandes especies (bovinos, porcinos, caprinos, equinos), con la finalidad de transmitir o conservar características específicas y deseables de generación en generación. Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo en insectos. Dentro de esta clase se encuentra la abeja *Apis mellifera* L. la cual es un insecto importante y benéfico, no sólo como productor de miel sino como agente polinizador. ¹

Las abejas viven en sociedades llamadas colonias; las colonias están constituidas por diferentes castas morfológicas, las cuales tienen una actividad asignada. Estas castas morfológicas son reina, obreras y zánganos; las cuales cumplen con su ciclo de vida y posteriormente serán reemplazadas por nuevas generaciones para así continuar con el mantenimiento de la colonia y evitar su extinción. ^{2,3}

Dzierzon en 1845, encontró que las reinas se originan a partir de huevos fertilizados al igual que las abejas obreras, mientras que los zánganos se originan a partir de huevos no fecundados, (partenogénesis). Por lo tanto, las obreras al ser derivadas de huevos fertilizados poseen información genética de la madre (reina) y del padre (zángano), mientras que los zánganos mantienen únicamente la información genética de la madre (reina).³

La reina, es la única hembra de la colonia que tiene desarrollado por completo su aparato reproductor. El apareamiento entre reinas y zánganos ocurre en el aire en sitios alejados de las colmenas, estos sitios se llaman zonas de congregación. La reina puede aparearse con uno o varios zánganos (6 a 16) provenientes de diferentes colonias, por lo tanto, su progenie llevará diferente composición genética. Una familia de abejas está compuesta de subfamilias de obreras que pueden ser medias hermanas, hermanas completas y superhermanas.* El número de subfamilias de una colonia dependerá del número de zánganos con los que se haya apareado la reina. ⁴

En México y otros países el apareamiento libre no era preocupante antes del año de 1986, cuando enjambres de abejas africanizadas llegaron al país. El alto impacto causado por la

* Superhermanas= Abejas hijas del mismo padre

Hermanas completas= Abejas hijas de padres que son hermanos

Medias hermanas= Abejas hijas de diferentes padres

africanización se debió a la presencia de características no deseadas como: alta tendencia a enjambrar, su exacerbado comportamiento defensivo y su baja tendencia a almacenar miel.
3-6

Existen dos formas de controlar los apareamientos de las abejas, una es la colocación de las colmenas en lugares aislados donde sólo existan las abejas introducidas, como por ejemplo en islas, en donde se tiene la certeza que el apareamiento se realizará únicamente con los zánganos del lugar y la segunda es por medio de la inseminación instrumental (II) de abejas reinas, es decir, el depósito del semen en el aparato genital de la reina con ayuda de instrumentos especiales, utilizando semen fresco.⁷

El desarrollo de esta técnica en abejas data desde los años 20's con Watson⁸, quien desarrolló diversas técnicas e instrumentos para inseminar a las reinas. Nolan⁸, discípulo de Watson, realiza modificaciones a la técnica e instrumentos del primero, mientras que Roberts y Mackensen,⁸ modifican el aparato de inseminación de Nolan, consiguiendo con esto el desarrollo del aparato de inseminación Mackensen, el cual es ampliamente conocido y utilizado a nivel mundial, y del que más tarde se derivaron variantes del mismo. Ejemplo de esto son los aparatos desarrollados por Laidlaw, Harbo, Kaftanoglu-Peng y Moritz, los cuales desarrollaron sus propios instrumentos pero siempre tomando como base el aparato Mackensen.^{1,8,9}

La inseminación instrumental de las abejas reinas es todavía realizada con semen fresco, lo que limita su uso a las épocas de floración, cuando hay zánganos, por ello surge la necesidad de mantener semen por largos períodos de tiempo sin que éste pierda sus propiedades.

Con el desarrollo y mejoramiento de la preservación del semen se podría: conservar líneas genéticas, mantener abejas con características seleccionadas e importantes a nivel comercial, disponer de semen en todo momento, incluso en períodos estacionales, sobre todo en épocas no reproductivas en donde sería difícil encontrar zánganos, reducir la introducción de enfermedades y parásitos en las colmenas y conducir a programas de cría y experimentos genéticos, es decir, desarrollar híbridos de abejas europeas y africanizadas a los cuales se les eliminen las características indeseables y fijando las deseables.^{4,10,11}

Desde que Taber y Blum, reportaron la posibilidad de almacenar el semen de abeja *in vitro*, sin ningún tipo de preservador por 68 días (Citados por Verma y Kaftanoglu)^{12,13}, Harbo¹⁴⁻¹⁹, Verma¹³, Kaftanoglu y Peng¹², Collins²⁰, entre otros, han analizado las temperaturas que puedan ser las más aceptables para la conservación del semen, probando diferentes rangos

de temperatura, diluyentes que eviten dañar tanto al espermatozoide como al aparato reproductor de la reina y técnicas de colección, con las cuales se puedan obtener grandes cantidades de semen, sin dañarlo y contaminarlo, así como también los factores que pudieran alterar su viabilidad, es decir, contaminación, tiempo de almacenamiento, edad del zángano, entre otras. ^{11,13,20,21}

2. JUSTIFICACIÓN

Es importante recapitular los estudios que se han llevado a cabo para preservar el semen de abejas melíferas y discutir los resultados más promisorios hasta ahora encontrados. Así como también advertir sobre los efectos adversos reportados a lo largo de dichos estudios.

3. EL ZÁNGANO

3.1 Generalidades

Las abejas viven en sociedades llamadas colonias, éstas se encuentran formadas por diferentes castas morfológicas las cuales realizan diversas actividades especializadas a lo largo de su vida. Cada casta tiene un período diferente de desarrollo y son criadas en diferentes celdas. Estos individuos son la reina, las obreras y los zánganos.²² Nos centraremos pues en los machos de la colonia, que son el objetivo de estudio del presente trabajo.

3.2 Biología del zángano

Los zánganos son los machos de la colonia y tienen un período de metamorfosis de 24 días después de la postura de la reina. A los 12 días después de emergidos en adelante son sexualmente maduros. Esto se puede comprobar cuando se realiza la eversión del aparato reproductor, pues al exponerlo se observarán las cornículas de color naranja, coloración indicativa de la madurez sexual en los zánganos. La única función que tienen los zánganos dentro de la colonia es fecundar a las reinas vírgenes. Un zángano puede producir desde 1 μ l de semen hasta 1.25 μ l los cuales contienen aproximadamente 10,000,000 de espermatozoides.^{4,23,24} La reina pone más huevos de zángano antes y durante la temporada de floración, que es la época reproductiva de las abejas; sin embargo, el número de ellos es determinado por la cantidad de celdas para zángano que sean construidas por las obreras y el tamaño de la colonia. Después de la temporada de floración, es decir, en la época de escasez de néctar, los zánganos son expulsados de la colonia por las obreras, ya que no hay reinas vírgenes para fecundar y mueren de hambre en el exterior debido a su incapacidad para alimentarse por sí mismos.^{22,24}

3.3 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del zángano

El aparato reproductor del zángano (endófalo u órgano intromitente) se encuentra en el interior del abdomen y debido a su longitud tiene forma de "S". La parte inferior de la "S" esta formada por el endófalo, la parte mediana por el conducto eyaculador y la superior por los testículos y las vesículas seminales.^{2,3,21,24,25,26,27}

- **ENDÓFALO:** Es un saco blando, membranoso que se encuentra invaginado en el abdomen del zángano, su extremo distal está ampliado y tiene una placa quitinosa en forma de coma, a esta estructura se le llama bulbo. Su porción proximal es más ancha y se le llama base, de ésta salen dos especies de cuernos a los cuales se les llama cornículas, éstas van cambiando de color de acuerdo a la edad del zángano. El endófalo evertido es transparente y está lleno de aire y hemolinfa (Fig. 1).

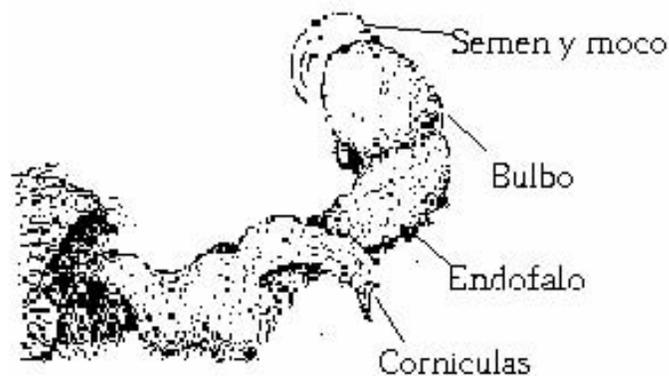


Figura 1. Endófalo evertido del zángano²¹

- **CONDUCTO EYACULADOR:** Se encuentra en el interior del endófalo y liga al mismo con los testículos y las vesículas seminales. Durante el proceso de eversión es expulsado de la cavidad abdominal junto con el endófalo y se abre al exterior en su extremo distal, es decir, es la abertura exterior del semen y moco.
- **TESTÍCULOS:** Son cuerpos muy blandos, esponjosos de 5-6mm de longitud de forma ovalada, color crema y son par. Cuando el zángano es pupa (14 ½ días), se desarrollan las espermatogonias y los espermatoцитos los cuales son los precursores de los espermatozoides. En este lugar se llegan a producir hasta 10 millones de espermatozoides, los cuales pasan al conducto deferente, éste en su porción media se ensancha formando las vesículas seminales (Fig. 2).

- **VESÍCULAS SEMINALES:** Las vesículas seminales se llenan de espermatozoides provenientes de los testículos entre el tercer y octavo día de vida de los zánganos, provocando que el volumen de los testículos una vez vaciados reduzcan a un cuarto su tamaño inicial. La vesícula seminal es el lugar en donde los espermatozoides permanecen almacenados hasta el momento del apareamiento, esto sucede a los doce días por lo menos, que es la edad a la que ellos comienzan a madurar sexualmente (Fig. 2).
- **GLÁNDULAS MUCOSAS:** Son órganos accesorios, que se unen a la salida de las vesículas seminales formando una “U”, son la parte más evidente de todo el aparato reproductor del macho. Ellas segregan una sustancia mucosa que al contacto con el aire se solidifica, este moco es generalmente producido durante los primeros siete días después de emerger. Tiene como función empujar al semen a través del conducto eyaculador (Fig. 2).

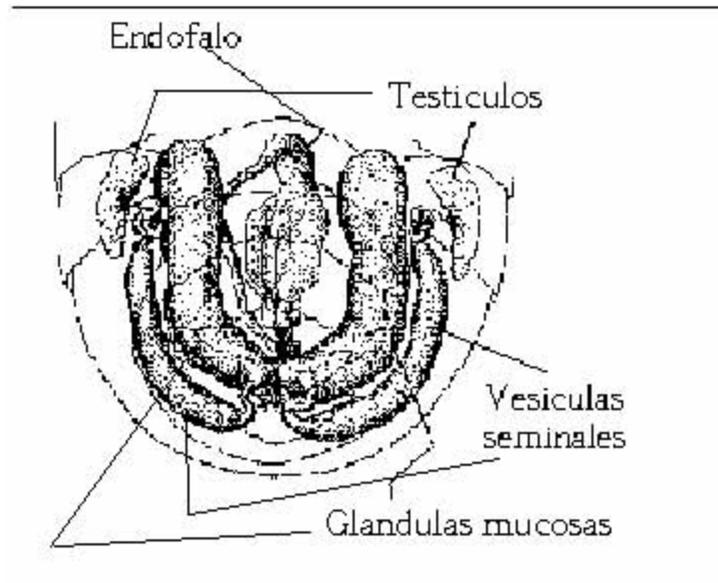


Figura 2. Disposición interna del aparato reproductor del zángano ²¹

3. 4 Producción de espermatozoides

En la etapa de pupa de los zánganos se lleva a cabo en los testículos la producción de espermatozoides, (10 millones en 1 a 1.25 μ l).^{24,28}

En la parte distal de cada testículo se encuentra el *germarium* este es el sitio en el cual se producen los espermatozoides mediante el proceso de espermiogénesis. El tiempo en el que se lleva a cabo la espermiogénesis varía de acuerdo a la especie de insecto y los factores que la regulan aun no están bien entendidos.²⁹

Las células germinales se dividen para producir las espermatogonias, éstas son las células que por medio de división mitótica producen espermaticitos, los cuales se dividen por meiosis para dar lugar a las espermatides, que posteriormente darán origen a los espermatozoides.²⁹

El *germarium* se divide en tres zonas²⁹ (Fig. 3):

- 1.- Zona de crecimiento. La espermatogonia se divide e incrementa en tamaño para formar a los espermaticitos.
- 2.- Zona de maduración y reducción. Los espermaticitos tienen dos divisiones meióticas para producir las espermatides.
- 3.- Zona de transformación. Las espermatides se desarrollan a espermatozoides, por medio de divisiones meióticas, (A todo este proceso se le llama espermiogénesis).

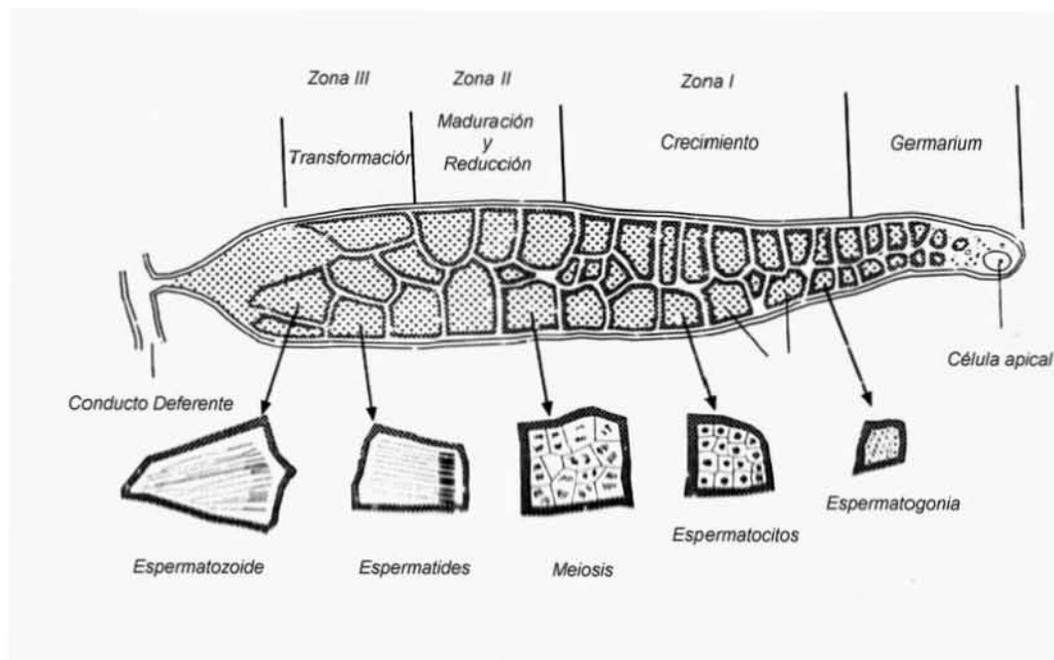


Figura 3. Espermiogénesis²⁹

3.5 Características del espermatozoide

Es importante conocer las estructuras del espermatozoide para así poder comprender los factores que las puedan alterar al realizar métodos de preservación del semen. Estas estructuras son: (Fig. 4)

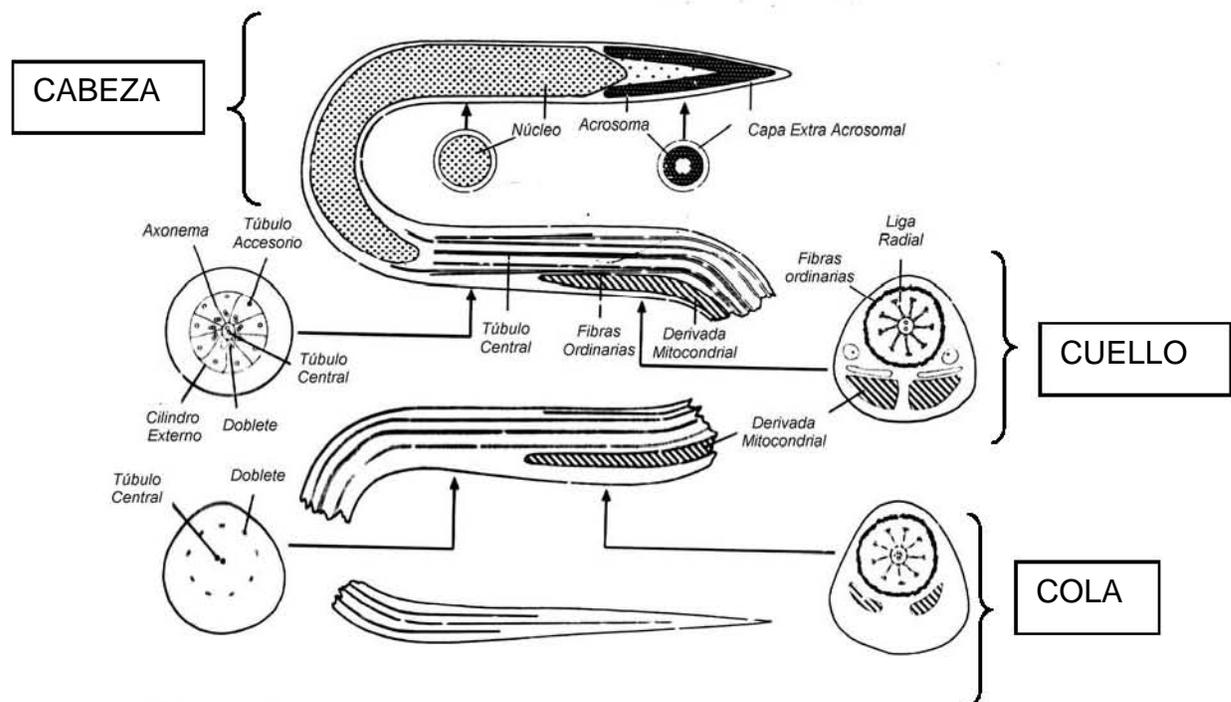


Figura 4. Estructuras del espermatozoide²⁹

A) CABEZA

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

El **acrosoma** mide 1 μm de longitud por 0.25 μm 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 una estructura elongada en forma elíptica y mide 5 μm de longitud, 0.5 μm y 0.3 μm de espesor, en su parte final parece cono, de esta parte se originan los derivados mitocondriales. En la parte posterior del **núcleo** se forma una región entre la cabeza y la cola a la cual se le llama **cuello**.^{30,31}

Peng, *et al*,³² encontraron las estructuras que conforman el acrosoma, llamándolo ahora **complejo acrosomal**, el cual esta compuesto de las siguientes estructuras: (Fig. 5)

- Apéndice acicular anterior (**Aa**)
- Región esférica la cual tiene material extra-acrosomal. (**Em**)
- Vesícula acrosomal. (**Av**)
- Corpúsculo central interno. (**Cc**)
- Barra interna acrosomal. (**Ar**)
- Cavity subacrosomal. (**Sc**)

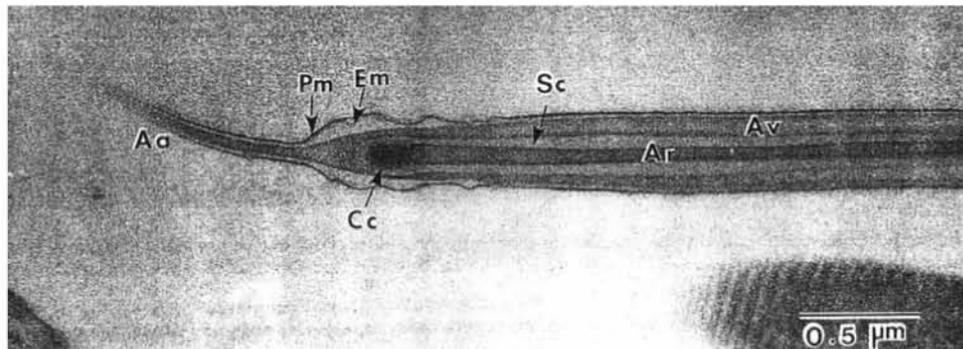
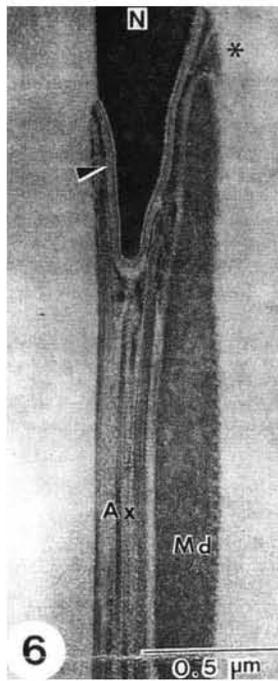


Figura 5. Complejo acrosomal³²

B) CUELLO

La región del **cuello** une al **núcleo** con el **axonema** y los **derivados mitocondriales** de la **cola**. En el extremo anterior de los **derivados mitocondriales** se encuentra el **corpo triangular** el cual, se piensa, funciona como homólogo al centríolo descrito en otros insectos.^{30,31} (Fig. 6)

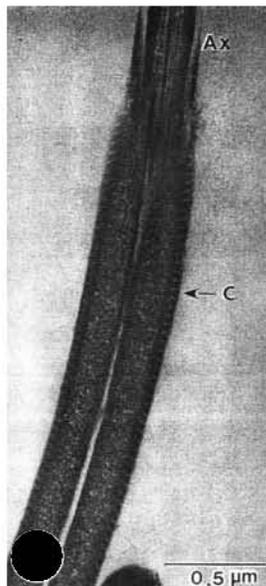


N = Núcleo
 Ax = Axonema
 Md = Derivado mitocondrial

Figura 6. Cuello del espermatozoide ³¹

C) COLA

La cola consiste de un **axonema** o **flagelo**, dos **derivados mitocondriales** adyacentes y dos **cuerpos accesorios** en forma triangular. El axonema se encuentra unido a la parte posterior del polo nuclear ^{30,31} (Fig. 7)



Ax =
 Axonema

Figura 7. Cola del espermatozoide ³¹

3.6 Composición del semen

El **semen** es un líquido de color crema, muy diferente al color blanco del moco producido por las glándulas mucosas. Entre más elevado sea el número de espermatozoides y avance la edad del zángano más intenso será su color y viscosidad. Está constituido por dos elementos principales: el espermatozoide y el plasma seminal cuya proporción es de 1:1 ó 1:2 dependiendo de las condiciones climáticas y conformado por diversos compuestos. (Cuadro 1).^{3, 24}

Azúcares	Trealosa	Glucosa	Fructosa						
Iones	Magnesio	Calcio	Sodio	Hierro	Manganeso	Cobre			
Aminoácidos	Tirosina	Metionina	leucina	Cistina	Alanina	Treonina	Ac.Aspartico	Serina	Glicina
Enzimas	α-glicerofosfato	Lactata	NADH2	Glucosa-6-Fostasa	NADPH2	B-Hidroxitirato	Isocitrata	Glutamato	Malato
Otros	Fosfolípidos	Triglicéridos	Esteroles	Ácidos grasos libres					

Cuadro 1. Composición del semen de zángano

3.7 Apareamiento con la reina

El apareamiento se lleva a cabo en las áreas de congregación, que es el lugar en donde se reúnen zánganos de diferentes edades y colonias. Los zánganos producen una feromona mandibular que atrae a la reina a éste sitio, y cuando ella llega, un gran número de zánganos que se encuentra volando en los llamados “cometas de zánganos”, (llamados así porque los zánganos vuelan en grupo y aparecen como densas nubes en el aire), comienzan a competir por aparearse con ella. El apareamiento se lleva cabo en el aire de la siguiente manera:

- o Uno de los zánganos alcanza a la reina, la captura enganchándola entre sus patas, esto es, el primer par de patas y el segundo par se posan sobre su espalda y el tercer par de patas entre su abdomen. El zángano curva el abdomen y evierte el endófalco dentro del aparato reproductor de la reina, seguido de una parálisis tanto de sus patas como de sus alas. El aparato reproductor del macho penetra a través de la válvula vaginal para llegar a la vagina y posteriormente eyacula en el oviducto medio (Fig. 8).

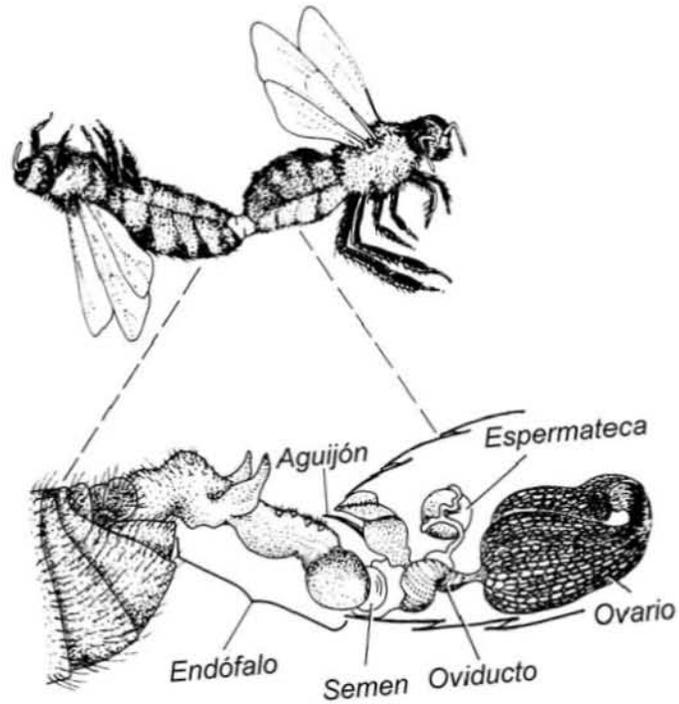


Figura 8. Disposición de los órganos reproductivos al momento del apareamiento²¹

- La reina recibe durante la copula hasta 80 millones de espermatozoides de los diferentes zánganos que se acoplan con ella; éstos espermatozoides migran hacia la espermateca y penetran a ella aproximadamente el 6.2%, el resto son expulsados al exterior. (Fig. 9)



Figura 9. Apareamiento del zángano y la abeja reina.²¹

- Las patas del zángano se desenganchan y su cuerpo gira para separarse de la reina, quedando dentro de la misma, un parte del endófalo evertido. (Fig. 10)

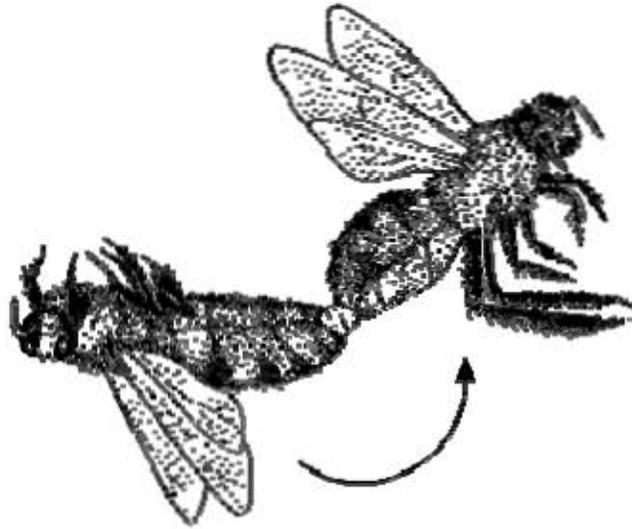


Figura 10. Desgarre del aparato reproductor del zángano después del apareamiento ²¹

- Una vez hecho esto, la reina contrae su abdomen para cerrar el orificio vaginal y el semen migra del oviducto medio a la espermateca por quimiotactismo positivo[†] y contracciones musculares del oviducto.
- La espermateca es un saco esférico que puede almacenar de 5 a 7 millones de espermatozoides, su pared está altamente vascularizada por vasos hemolinfáticos y traqueolas, donde los espermatozoides depositados pueden continuar viviendo de 3 a 5 años aproximadamente, ya que cuenta con un par de glándulas que producen una sustancia proteica, que se piensa, nutre a los espermatozoides, esta sustancia es conocida como la proteína 79kDa. ^{21,25,33}

[†] El quimiotactismo positivo es un estímulo que se produce por una sustancia química de atracción

4. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL SEMEN

Las técnicas de colección del semen han sido diversas a lo largo de diferentes estudios realizados, así como también los diluyentes utilizados de los cuales se hablará más adelante. Las técnicas de colección más usadas han sido las siguientes:

4.1. MÉTODOS

4.1.1 Estimulación del zángano

La obtención del semen es por medio de la estimulación de zánganos sexualmente maduros para poder eyacular; esto se logra presionando el tórax y rotando la cabeza del zángano entre los dedos índice y pulgar de la persona que lo esta sujetando, con esto se logra la eversión parcial del endófaló. Posteriormente se ejerce presión a los lados del abdomen desde la base hasta la punta del mismo, rolando los dedos con movimientos fuertes y sostenidos para conseguir la eversión total del endófaló y así tomar el semen directamente del mismo. ^{25,26}

4.1.2 Disección de vesículas seminales

El semen se colecta a través de la disección de las vesículas seminales. Mackensen y Ruttner ³ describen esta técnica en la cual se retiran las vesículas seminales y es presionada con pinzas la parte distal de los testículos, con ello, se logra estimular los movimientos peristálticos que fuerzan a los espermatozoides a salir, para posteriormente colectar el semen con una jeringa.

Collins ¹ realizó un estudio en el cual compara la jeringa Harbo con la disección de vesículas seminales, cada una con variables diferentes como el uso de buffers, temperatura y manipulación del semen. Ella encontró que la técnica de disección provee una alta proporción de espermatozoides vivos, en comparación con la técnica de Harbo, sin embargo, no recomienda su uso en inseminación instrumental ya que el semen mantiene contacto con otros tejidos, por lo que se contamina, además de que se obtiene poca cantidad y se requiere de mayor tiempo para su recolección. ^{1,3}

4.1.3 Lavado del semen

Esta técnica fue descrita por Kaftanoglu y Peng ⁹ es una operación rápida y fácil, ya que no es necesario el uso del microscopio y una gran cantidad de semen puede ser colectado en un tiempo corto. Para realizar esta técnica se utiliza el diluyente Kiev estéril y se diluye con el semen y el moco obtenido de los zánganos. Una vez homogenizados el semen, el moco y el diluyente se colocan en un tubo para centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos, obteniéndose así la separación de los tres. Este método es mucho más rápido que los métodos convencionales (Mackensen y Harbo), especialmente si el semen va a ser recolectado para inseminar muchas reinas de manera sucesiva. Otra ventaja es que puede ser utilizada para mezclar semen de diferentes zánganos homogéneamente y en la proporción deseada.

Por medio de este método se puede obtener un buen porcentaje de cría, sin embargo las reinas tardan más tiempo en comenzar la postura. ⁹

4.1.4 Banco de abejas reinas

Las abejas reinas previamente inseminadas se mantienen cautivas dentro de jaulas, preservando así el semen del zángano en sus espermatecas, para obtenerlo en el momento que se requiera inseminar a otra reina o bien utilizar a la reina para introducirla en una colmena.

Lodesani *et al*, probaron que la cantidad y la viabilidad de espermatozoides decrece conforme transcurra el tiempo, indicando como límite de viabilidad 2 años. ³⁵

4.2. Equipos de inseminación

4.2.1 Aparato Mackensen: Es el aparato base de los demás, tiene como características principales: amplia capacidad de movimiento, una jeringa cuya punta es de plástico con una capacidad de almacenamiento de 10 µl de semen. Los ganchos y la jeringa se usan manualmente girándolos sobre sus bases. ²⁵ (Fig. 11)

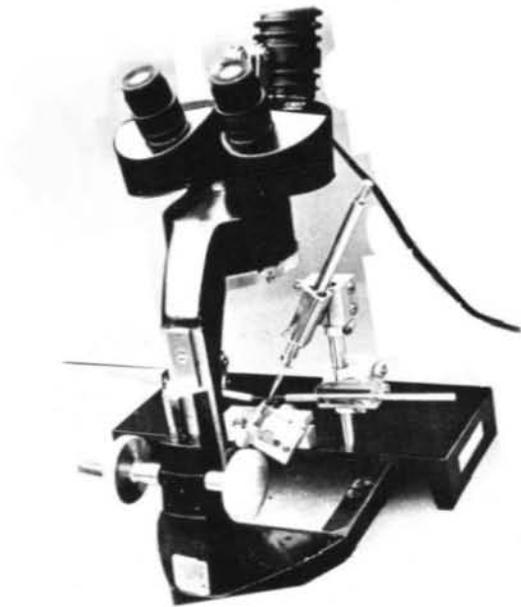


Figura 11. Aparato de Inseminación Mackensen

4.2.2 Aparato Harbo: Harbo en 1979, realizó una versión mejorada de la jeringa utilizada por Mackensen, además de presentar una nueva versión del tubo de almacenamiento el cual, es removible de acuerdo al uso que se requiera ya que puede utilizarse tanto para coleccionar semen como para inseminar abejas reinas, con la ventaja que el tubo puede ser removido con facilidad según sea el caso.

La jeringa Harbo utiliza una jeringa micrométrica *Gilmont**, conectada a una punta fina de vidrio, presenta la misma longitud del tubo para coleccionar el fluido. Este sistema permite la adición de un tubo capilar estéril, que funciona como una vasija adyacente a la punta de la jeringa. La ventaja de este sistema es que la jeringa al ser controlada por un micromanipulador permite ajustes muy finos, al igual que el uso del micrómetro, el cual permite medir la cantidad exacta del semen que se utiliza. ^{10,25,36}

**Gilmont Instruments, Barrington, IL*

4.2.3 Aparato Swienty

Este aparato está diseñado en plano vertical con ángulos fijos de movimiento, su jeringa tiene gran capacidad de almacenamiento y tiene un tubo capilar que conecta con la punta. Presenta micromanipuladores de bastón para manejar los ganchos y la jeringa.

4.2.4 Otros

- a. **Vesley:** Es un aparato de gran capacidad construido de acrílico. (Fig. 12)
- b. **Kuhnert-Laidlaw:** Utiliza pinzas de disección en vez de ganchos, es simple y económico.
- c. **Jordan-Pollard:** Al igual que el anterior es simple y utiliza pinzas y un gancho central. Tiene un tubo capilar que se conecta con la punta.
- d. **Latshow:** Utiliza pinzas y permite movimientos suaves y precisos, esta diseñado a partir de la jeringa Harbo.²⁵

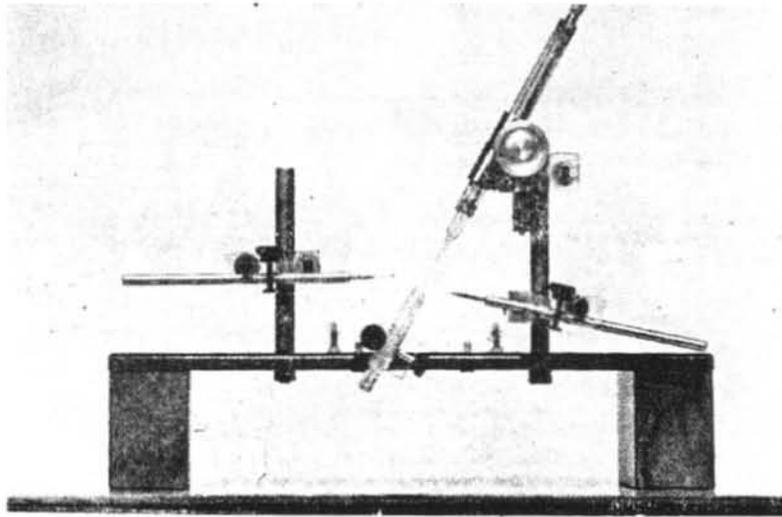


Figura 12. Aparato de Inseminación Vesley

5. PRESERVACIÓN DEL SEMEN

5.1 Preservación del semen en la espermateca de abejas reinas

De manera natural el semen es almacenado en la espermateca de la reina, en donde puede permanecer por años. La espermateca es una estructura anatómica que forma parte del aparato reproductor de la abeja reina. Es un saco esférico con un diámetro de 1.1 mm compuesto por una membrana quitinosa, células epiteliales y esta rodeada por una densa red de tráqueas en su exterior, las cuales se cree, proveen el oxígeno necesario a los espermatozoides. En la superficie dorsal se encuentran las glándulas de la espermateca, son unas estructuras cortas unidas en la base, compuestas por un epitelio secretor. Cuando la reina tiene tres días de edad el pH de las glándulas de la espermateca incrementa de 7.4 a 8.6, este nivel de pH funciona como el ideal para almacenamiento del espermatozoide.³⁷

Glucosa, fructosa, sucrosa y trealosa se encuentran presentes en el interior de la espermateca, al igual que sodio y potasio. La trealosa se encuentra en mayor concentración que las otras tres, se piensa que funciona como superficie alternativa de energía para el espermatozoide³. Molodyak y Belyaeva encontraron en el interior de la espermateca las enzimas succinato deshidrogenasa y ácido fosfatasa^{3,24}, Weirinch *et al*³² confirmaron la presencia no sólo de estas dos enzimas sino también de la catalasa (CAT), glutathion S-transferasa (GST) y la superóxido dismutasa (SOD), éstas fueron medidas en tejidos como músculo torácico, ventrículo y espermateca, además de hemolinfa y semen diluido en tres grupos de abejas; reinas vírgenes, reinas apareadas y obreras.³⁷

La CAT se encuentra en espermateca y en ventrículo de reinas apareadas en niveles más altos que en reinas vírgenes y obreras, esto hace suponer que ésta enzima interviene en el proceso de conservación natural del semen, ya que también se encuentra en niveles elevados en el caso del semen del zángano.³⁷

La GST presenta altos niveles de actividad en el ventrículo tanto de obreras como de reinas apareadas y vírgenes. Los músculos de reinas apareadas tienen una gran actividad en comparación con las obreras y las reinas vírgenes. En el caso de la espermateca, en reinas apareadas la GST presenta niveles de actividad más altos que en reinas vírgenes. La actividad en hemolinfa fue baja para los tres grupos. En el caso del semen se encontró baja actividad.³⁷

La SOD no presenta grandes diferencias entre tejidos, las actividades de esta enzima en ventrículo, hemolinfa y espermateca no difieren entre las tres castas de abejas.³⁷

De acuerdo a la información anterior es posible observar que las principales enzimas que pueden ayudar a la preservación del semen son la CAT y la GST, debido a la gran cantidad que se puede observar de ellas en la espermateca de reinas apareadas. Collins *et al*²⁰, comprobaron lo anterior con respecto a la CAT y encontraron que en reinas apareadas viejas la actividad de esta enzima era 10 veces más alta que en reinas apareadas jóvenes.

Klenk *et al*³⁷, encontraron que los niveles de proteína en el fluido de la espermateca, glándula de la espermateca y hemolinfa en pupas jóvenes tienen niveles iguales o con pocas diferencias, sin embargo, conforme se continúa el desarrollo de la abeja, estos niveles inician, encontrándose entonces la proteína 79kD en la glándula de la espermateca y la 29kDa en el fluido de la espermateca. Como ésta última fue encontrada en gran cantidad en la espermateca de reinas sexualmente maduras; ellos hipotizaron que esta proteína juega un papel importante en la preservación del espermatozoide por largos períodos de tiempo. Esto

es sólo una hipótesis pero que puede ayudar a futuros estudios de preservación del semen.
37

Las componentes antes mencionados son importantes a considerar, pues son sólo algunos de los muchos que contiene la espermateca y que hacen posible la preservación del semen; lo protegen de posibles daños celulares y además lo proveen de los nutrientes necesarios para su supervivencia en el interior de la misma, para posteriormente cumplir con su función fertilizante.

5.2 Preservación artificial del semen

Es necesario preservar el semen con la menor cantidad de daños posibles y asemejando las condiciones naturales en las que se encuentra en su almacén natural. Por esto, el desarrollo de un crioprotector para el semen es de suma importancia ya que sin él, el semen duraría poco tiempo, o bien no resistiría las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, para su almacenaje.

Como se habló en el punto anterior la adición de enzimas como CAT, GST, SOD y algunas otras enzimas antioxidantes presentes de manera natural tanto en semen como en espermateca, pueden ayudar a proteger al espermatozoide del estrés oxidativo que se lleva a cabo durante su almacenaje (el cual es en un ambiente aeróbico en donde se produce actividad metabólica) y así extender la supervivencia del mismo.^{26,32}

De acuerdo a la revisión realizada de los diferentes tipos de diluyentes que se han empleado en la preservación de semen se encontró lo siguiente:

Cuadro 2. Diluyentes

No.	Nombre	Fórmula	pH	T ° utilizada	Tiempo de almacenamiento	Prueba de viabilidad utilizada
1	Modificado de Verma (38)	Buffer tris (Hidroximetil) = 0.05M NaCl = 1.11% Glucosa 0.1% HCl L-Arginina = 0.01% Ácido L-Glutámico = 0.01% L-lisina = 0.01% Sulfato de dihidroestreptomina = 0.02% Penicilina G sodica = 0.012%	8.7	35 +/- 1°C	0.17, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 19.5 h	Eficiencia de transferencia 10.7, 8.8, 9.8, 5.1, 2.1, 4.3 y 2.4% respectivamente
2	Hemolinfa de zángano (13)	Hemolinfa de zángano = 100ml Catalasa (Behringwerke) = 0.04ml	-----	-196° C	30min -1h	M* = 3.6**
3	Aislado de vesículas seminales suspendida en hemolinfa de zángano (13)	No refiere cantidades	-----	-196° C	30min -1h	M* = 3.2**
4	Aislado de espermateca suspendida en hemolinfa de zángano (13)	No refiere cantidades	-----	-196° C	30min -1h	M* = 3.2**
5	Buffer de glicina (13)	Buffer de glicina = 40ml Dextrosa (solución al 100%) = 40ml Catalasa (Behringwerke al 20%) = 0.04ml Dimetil sulfoxido (DMSO) = 20ml	8.5	-196° C	30min -1h	M* = 2.8**
6	Buffer tris con cationes (13)	Buffer tris = 40ml Dextrosa (Solución al 100%) = 40ml Dimetil sulfoxido (DMSO) = 20ml Catalasa (Behringwerke al 20%) = 0.04ml	7.2	-196° C	30min -1h	M* = 2.8**
7	Agua de coco (con suero de becerro) (13)	Agua de coco = 45 ml Suero de becerro = 45 ml Dextrosa al 100% = 10ml	8.4	-196° C	30min -1h	M* = 2.6**
8	Agua de coco (con dextrosa y catalasa) (13)	Agua de Coco = 90ml Dextrosa al 100% = 10ml Catalasa (Behringwerke al 20%) = 0.04ml	8.4	-196° C	30min -1h	M* = 2.4**
9	Solución Ringer (12)	NaCl = 0.850g KCl = 0.025g CaCl ₂ 0.030g Glucosa = 0.500g Agua destilada = 100ml	6.35	-196° C	359 días	M* = 4.5***

No.	Nombre	Fórmula	pH	T°	Tiempo de almacenamiento	Prueba de viabilidad utilizada
10	Tris freezing extender (12)	Tris = 3.028g Ácido cítrico = 1.675g Fructosa = 1.250g Agua destilada = 92ml	7.0	-196° C	359 días	M* = 4.5***
11	Solución Kiev (12)	Na trisodium citrato-2-hidrato = 2.43 NaHCO ₃ = 0.21g KCl = 0.04g Sulfanilamida = 0.30g Glucosa = 0.50g Agua destilada = 100ml DMSO 10%=20%del total del volumen	8.4	-196° C	359 días	M* = 4.5***
12	Solución Locke (12)	NaCl = 0.90g KCl = 0.07g CaCl ₂ = 0.01g NaHCO ₃ = 0.01g Glucosa = 0.10g Agua destilada = 100ml	7.5	-196° C	359 días	M* = 4.0***
13	Solución modificada Kiev (12)	Na trisodium citrato-2-hidrato = 3.60g NaHCO ₃ = 0.32g KCl = 0.06g Glucosa = 0.50g Agua destilada = 100ml	8.0	-196° C	359 días	M* = 4.0***
14	Solución Jaycox (12)	NaCl = 0.70g KCl = 0.025g Glucosa = 0.10g Agua destilada = 100ml	6.6	-196° C	359 días	M* = 3.0***
15	Solución modificada Jaycox (12)	NaCl = 0.80g KCl = 0.10g Glucosa = 0.30g Agua destilada = 100ml	7.5	-196° C	359 días	M* = 3.0***
16	Salina modificada (12)	NaCl = 0.85g Glucosa = 0.50g Agua destilada = 100ml	6.6	-196° C	359 días	M* = 3.0***

No.	Nombre	Fórmula	pH	T°	Tiempo de almacenamiento	Prueba de viabilidad utilizada
17	Buffer Tris modificado (12)	NaCl = 0.065g KCl = 0.060g Glucosa = 0.50g Buffer tris (pH 7.19)= 100ml	7.10	-196° C	359 días	M* = 2.5***
18	Salina (12)	NaCl = 0.85g Agua destilada = 100ml	5.6	-196° C	359 días	M* = 2.0***
19	Buffer Tris (12)	NaCl = 0.065g KCl = 0.60g Buffer Tris (pH 7.19) = 100ml	7.08	-196° C	359 días	M* = 2.0***
20	Buffer Tris ^(C/Cl_a) (39)	NaCl = 1.1% Glucosa = 0.1% L-arginina-HCl = 0.01% L-Lisina = 0.01% Buffer tris (Hidroximetil) –amino- metano = 0.05% Penicilina G sódica = 0.1m Sulfato de dihidroestreptomina = 0.1m	8.7	---	-----	P =
21	Hyes ^(C/Cl_a) (39)	NaCl = 0.9% CaCl ₂ = 0.02% KCl = 0.02% NaHCO ₃ = 0.01% Agua destilada = 0.01% Penicilina G sodio = 0.1m Sulfato de dihidroestreptomina = 0.1m	8.5	---	-----	P =

No.	Nombre	Fórmula	pH	T°	Tiempo de almacenamiento	Prueba de viabilidad utilizada
22	Kiev ^(C/Cla) (39)	Trisodium citrato-2-hidrato= 2.43 NaHCO ₃ = 0.21% Sulfanilamida = 0.3% Monohidrato D+Glucosa = 0.3% KCl en Agua destilada Penicilina G sodio = 0.1m Sulfato de dihidroestreptomina= 0.1m	8.8	--	-----	P =

Cuadro 2. Diluyentes utilizados para criopreservación

M* = Motilidad después de descongelarlo

**Escala 1-4 (1= Baja y 4= Fuerte)

*** Escala 0-5 (5= 95% motilidad, 4= 80% motilidad, 3=60%, 2= 40%, 1=20% y 0= no motilidad)

C/Cla = Uso de centrifugadora y sin ella

P = Progenie

----- = No refieren datos

6. TEMPERATURAS PARA CONSERVAR EL SEMEN

El uso de la temperatura ideal, sería un gran avance para poder preservar el semen por mucho más tiempo. A lo largo de los años se han probado diferentes temperaturas a diferentes períodos de tiempo. Encontrándose lo siguiente: (Cuadro. 3)

	Autor	Año	Temperatura	Rango	Tiempo de almacenamiento	Resultado
1	Poole y Taber (12)	1970	13° C	13 – 15° C	8 meses	Ellos encontraron que la T ° óptima es de 15° C hasta 13 semanas y reportaron huevos fértiles en reinas inseminadas con este semen de 35 semanas
2	Melnichenko y Vavilov (12)	1975	-196° C	-----	3 meses	-----
3	Harbo (12)	1977	-196° C	-----	48 horas	-----
4	Harbo (12)	1979	-196° C	-----	3 meses	-----
5	Williams (39)	1983	15 y 35°C	-----	36 horas	-----
6	Skowronek y Konopacka (40)	1983	12° C	12 – 13° C	3-6 semanas	-----
7	Harbo (14)	1983	-196° C	-----	2 años	Se observó un descenso significativo en el % de progenie de obreras.
8	Kaftanoglu y Peng (12)	1984	-196° C	-----	359 días	Se obtuvo buena motilidad sin embargo la cantidad de abejas producidas a partir de este semen no fue grande
9	Harbo y Williams (40)	1986	21° C	20° C a 25° C	2 días	Se encontró que es la óptima temperatura para este tiempo. En comparación con 15° C, pero no se encontró diferencia significativa con 25° C
10	Locke y Peng (11)	1993	20° C- 25 ° C	-----	6 semanas	Tuvieron buenos niveles de viabilidad de 77.6% a 86.9%
11	Collins (10)	2000	25° C 12° C	15-28° C 11-13° C	1 a 52 semanas	La supervivencia de los espermatozoides fue igual para las 2 temperaturas pero se observaron mejores niveles a las 6 semanas (70-80%) y a las 39 semanas (45-65%)

Cuadro 3. Temperaturas para preservar el semen

-----= No hay datos

7. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD DEL SEMEN

Como se ha visto existen diferentes métodos para coleccionar y almacenar el semen. Sin embargo, para conocer si en realidad se tiene el efecto deseado que es la sobrevivencia de la mayor cantidad de semen, se han desarrollado diferentes técnicas para medir este aspecto, entre las que destacan: (Cuadro 4)

Autor	Año	Método	Características del Método	Ventaja
Peng <i>et al</i> (42)	1990	Técnica de tinción dual	Utiliza la tinción de eosina. Tiñe de verde-amarillo para espermatozoides muertos y azul-púrpura para vivos	Buena diferenciación entre los espermatozoides vivos y los muertos
Peng <i>et al</i> (42)	1992	Escaneo con microscopía electrónica	-----	Se puede observar las estructuras dañadas y no dañadas del espermatozoide
Collins y Donoghue (7)	1998	SYBR-14 con IP*	Tintura nuclear que tiñe de verde el DNA presente en la cabeza de los espermatozoides vivos y de rojo las células muertas	Buena diferenciación entre los espermatozoides vivos y los muertos
Collins y Donoghue (7)	1998	Calcein-AM con IP*	Sustrato de esterase de membrana permeable	Buena diferenciación entre espermatozoides vivos y muertos.
Collins	1999	Producción de cría	Se lleva a cabo el conteo de cría de obrera producida, por reinas inseminadas con semen preservado	Se puede evaluar el semen preservado de manera directa observando a la cría
Harbo (15)	1979	Conteo de espermatozoides vivos en la espermateca	Se lleva a cabo la disección de la espermateca de las reinas después de inseminarlas	Se puede observar de manera indirecta los espermatozoides que migraron y son viables, sin embargo es necesario matar a la reina
Verma Kaktanoglu (24)	1984	Motilidad del espermatozoide	Se lleva a cabo mediante la observación del semen inmediatamente después de ser descongelado	Permite la observación de la motilidad del espermatozoide y con ello el tiempo que puede permanecer viable después de ser congelado
Harbo(15) Kaftanoglu(22) Moritz(30)	1979 1980 1984	Porcentaje de progenie producida	Se lleva a cabo mediante el conteo de la superficie producida de cría de obreras	Permite evaluar la capacidad fertilizante del semen criopreservado

Cuadro 4. Métodos para comprobar la viabilidad del semen

*IP = Yoduro propidio, es una tinción tradicional de células muertas que les da un color rojo contrastante
-----= No refiere datos

Las pruebas anteriores muestran que aunque son más sofisticadas que otras todas tienen la misma finalidad, permiten evaluar las condiciones en las que se encuentran los espermatozoides después de ser criopreservados, así como la observación de daños celulares, cantidad de espermatozoides vivos y muertos o bien la cantidad de cría que se produjo a partir de la utilización de este tipo de semen. Estas pruebas pueden ser utilizadas dependiendo la finalidad del estudio o trabajo que se lleva a cabo, así como del presupuesto y la tecnología con la que se cuenta.

8. FACTORES QUE PUEDEN ALTERAR LA CALIDAD Y VIABILIDAD DEL SEMEN

Como ya se describió anteriormente, la temperatura y los diluyentes son primordiales para preservar el semen, sin embargo otros factores se encuentran ligados a ambos y también es importante tomarlos en cuenta como posibles causas que pueden afectar la calidad y viabilidad del semen, por lo que se deben tomar las debidas precauciones y así reducir las posibilidades de causas que limiten la viabilidad del semen. Dentro de estas causas se encuentran:

8.1 Tiempo de almacenamiento

Como ya se ha visto el tiempo de almacenamiento es un factor importante a considerar ya que se busca que este sea más prolongado, pues como se ha podido observar en el tema de preservación, entre más tiempo sea el almacenaje de los espermatozoides la motilidad de estos decrece, y con ello su capacidad para migrar a la espermateca dando como resultado la disminución en el efecto fertilizante. Con esto se lleva a la producción únicamente de huevos infértiles por parte de la reina, es decir, sólo cría de zánganos. Este factor podrá ser solucionado con la continua búsqueda del diluyente y la temperatura ideal, lo cual permitirá que el tiempo de almacenaje se prolongue el tiempo que sea necesario. ¹¹

8.2 Edad del zángano

Se ha observado que zánganos de entre 28 y 42 días de edad presentan porcentajes de viabilidad significativamente más bajos que los zánganos de 14 días de edad.

Los zánganos a diferencia de otros insectos llevan a cabo su espermatogénesis en la etapa de pupa, con ello los espermatozoides permanecen almacenados en las vesículas seminales hasta el momento del apareamiento con la reina o hasta el momento de su muerte si nunca se aparean con una reina. Este almacén permite la supervivencia del espermatozoide, sin

embargo, se ha observado que entre más edad tenga el zángano los espermatozoides tenderán a envejecer mostrando la presencia de daños celulares y con ello su muerte. Por esto, se recomienda utilizar el semen de zánganos jóvenes, de preferencia entre 12 días de edad hasta 28, con lo cual se obtendrán espermatozoides jóvenes y con características de motilidad y morfología excelentes, que no alterarán la calidad del semen ni los resultados en la evaluación del mismo. ¹¹

8.3 Contaminación

El semen puede contaminarse desde el momento de su obtención, ya sea con las vellosidades del zángano, moco de las glándulas mucosas del aparato reproductor del zángano, con los dedos de la persona que lo obtenga; Locke¹¹ encontró epidermis humana en muestras que fueron trabajadas, o bien con excremento del zángano el cual puede provocar la transmisión de enfermedades como Parálisis o Síndrome de la abeja negra y Septicemia o Pseudomoniasis.²⁴

El moco junto con el semen, constituyen un medio de cultivo excelente para microorganismos que puede ser causa de la muerte de las reinas inseminadas, y con ello desviar la investigación de la calidad del semen criopreservado. Mientras que para la contaminación por excremento se recomienda en primer lugar evitar la contaminación del semen con excremento teniendo cuidado al momento de llevar a cabo la eversión del endófalo y asegurarse de emplear zánganos sanos. ^{24,25}

Otros microorganismos y partículas microscópicas pueden ser encontradas en las muestras de semen y con ello inutilizarlo para su posterior uso en la inseminación instrumental.

Dado lo anterior un requisito primordial es tener cuidado e higiene en todo momento desde la obtención del semen hasta la inseminación de la reina, pasando por su almacenaje en tubos capilares, adición de diluyentes, descongelamiento y colocación en el aparato de inseminación. ^{11,24}

8.4 Congelación y descongelación

Otro factor muy importante que afecta la capacidad fertilizante del espermatozoide es el daño celular que ocurre durante las diversas fases del proceso de congelado y descongelado del semen almacenado. Estos daños celulares incluyen fracturas o rompimientos en la membrana plasmática en el acrosoma, en el núcleo, el cuello y la cola. Estos daños en la

membrana pueden provocar la liberación del contenido acrosomal y la destrucción del núcleo y otros componentes celulares lo cual afecta la motilidad, viabilidad y fertilidad del semen.

Peng *et al* ⁴¹, sugieren que los daños celulares y la destrucción del acrosoma causan baja fertilidad del espermatozoide, mientras que el rompimiento de los derivados mitocondriales probablemente afecta la motilidad del espermatozoide y consecuentemente se afectará la fertilidad del mismo. Por lo tanto, es evidente que el congelar de una manera rápida no es conveniente para la criopreservación del espermatozoide, aun con el uso de un crioprotector. Por esto, se recomienda un control por pasos en la temperatura de congelación y del ritmo al que se empieza a congelar. Tener cuidado durante el cambio de fases de líquido a sólido para evitar la formación de hielo. Otra sugerencia para prevenir el uso de semen dañado en la inseminación instrumental es realizar una prueba simple de tinción (como la Técnica de Tintura Dual), para evaluar la calidad del semen previo a su uso. ⁴¹

9. COMPARACIÓN ENTRE EL USO DE SEMEN FRESCO Y SEMEN CRIOPRESERVADO EN LA PRODUCCIÓN DE ABEJAS

Una buena comparación entre la fecundación natural (FN) y la Inseminación Instrumental (II) sólo deberá de hacerse cuando esta última sea llevada a cabo exitosamente y de manera adecuada, pues si se compara con una inseminación mal hecha, dicha comparación no tendría ningún sentido. ²⁴

Diversos estudios se han realizado en cuanto a comparaciones de producción de cría, producción de miel, cantidad de espermatozoides en la espermoteca, longevidad y peso de reinas (II) contra reinas de (FN). A continuación se resume lo encontrado en dichos trabajos. (Cuadro 5)

Autor	Año	Resultados
Ruttner	1961	No encontró diferencias significativas en cuanto a la capacidad de postura entre reinas II con las FN ²⁴
Roberts	1964	No encontró diferencias significativas, en cuanto a la cantidad y calidad de producción de cría y miel, entre reinas II y FN ²⁴
Kaftanoglu y Peng	1980	Encontraron que mediante la técnica de II por medio de la técnica de lavado para la obtención del semen y centrifugación del mismo, ambos tipos de reinas tuvieron buena producción de cría con la observación que las reinas Inseminadas Instrumentalmente tardaron más tiempo en comenzar la postura ⁹
Kaftanoglu y Peng	1982	Probaron diferentes técnicas de inseminación y soluciones contra la FN, y encontraron diferencias significativas entre todas las técnicas usadas de inseminación contra la FN en los aspectos de inicio de la postura y cantidad de espermatozoides en la espermateca, ambos fueron más bajos para reinas II ⁴²
Harbo y Szabo	1983	Probaron ambos tipos de reinas en diferentes lugares de Canadá y USA, para observar la influencia de los factores medioambientales, y encontraron que el tiempo de sobrevivencia, producción de cría, miel y cantidad de espermatozoides en la espermateca fue significativamente más bajo para las reinas II que en reinas de FN. No hubo diferencias en la viabilidad de cría ⁴³
Harbo	1986	Comparó narcosis e inducción de postura con N ₂ contra CO ₂ tanto en reinas de II como de FN, y comparó la relación de éstos factores junto con el peso y como se relacionan con el inicio de la postura y la producción de cría. Encontró que al utilizar N ₂ en reinas de II la postura y el peso fueron significativamente más altos que en reinas de FN, mientras que el uso del CO ₂ en FN produjo pérdida de peso en estas reinas. También encontró que el peso si esta relacionada con la producción de huevo ya que antes de inducir la ovoposición con estos dos compuestos las reinas de FN tuvieron más peso que las de II y produjeron más cría. ¹⁸
Collins	2004	Comparó semen fresco contra diferentes concentraciones de semen fresco con criopreservado. No se encontraron diferencias significativas entre ambos. ²⁰

Cuadro 5. Comparación entre apareamiento natural e inseminación instrumental

II = Inseminación Instrumental

FN = Fecundación Natural

10. DESVENTAJAS DEL USO DE SEMEN CRIOPRESERVADO

10.1 Mutaciones

Gracias a la Inseminación Instrumental se han descubierto gran cantidad de mutaciones y con ello el esclarecimiento del origen de líneas de abejas mutantes. Ejemplo de dichas mutaciones son descritas a continuación:²⁴

- Se conocen más de 20 mutaciones para el color de los ojos. Se han observado coloraciones blancas, amarillo-verde, rojas, rosas, anaranjadas, pardo y derivaciones de estos colores.
- En cuanto a la forma de los ojos se han encontrado ciclópicos, atrofiados, y carentes de facetas.
- Las alas se han encontrado pequeñas, atrofiadas, con nervaduras anormales y arrugadas.
- Se han encontrado abejas **hermafroditas**, es decir, con características de zángano y obrera; **ginandromorfos**, es decir, abejas hermafroditas pero con caracteres sexuales predominantemente femeninos, **androfinas**, que son abejas hermafroditas con caracteres sexuales predominantemente masculinos.
- Otro tipo de abejas son las llamadas abejas en mosaico, principalmente se presenta en los zánganos y se les conoce como *mosaic male* y tienen como característica tejidos con caracteres hereditarios distintos.

Una vez que se han descrito las mutaciones que se pueden presentar normalmente en las abejas, es más fácil describir los efectos adversos que se han encontrado en la utilización de semen preservado.

Harbo¹⁶ probó durante dos años los efectos producidos por el uso de semen criopreservado contra semen de reinas que salieron a vuelos de acoplamiento normales; él encontró cerca de sesenta machos en mosaico, es decir, todos expresaron en alguna parte de su cuerpo el fenotipo tanto de la madre como del padre. También presentaron ligeros cambios en el tamaño de las facetas en comparación con su parámetro de medición, y siete ginandromorfos fueron encontrados.¹⁶

10.2 Mortalidad de la primera generación de las hijas de abejas reinas producidas a partir de semen criopreservado

En este caso fue demostrado que el porcentaje de mortalidad de huevos fertilizados, es decir, de cría de obrera, fue más elevado que en cría de colonias en donde las reinas se aparearon naturalmente, sin embargo los huevos no fertilizados, es decir, de zánganos presentaron un mayor porcentaje de mortalidad que los fertilizados.¹⁶

11. OTROS ESTUDIOS ACERCA DE LA CRIOPRESERVACIÓN

Diversas pruebas se han realizado para preservar el semen y que a su vez dicho semen de excelentes resultados al momento de inseminar. Una de estas pruebas es el uso de semen homogeneizado de varios zánganos. Peng *et al*⁹ evaluaron el uso de semen homogeneizado junto con la técnica de lavado para la obtención de semen y encontraron que el semen es viable para inseminar a las reinas.

Kuhnert *et al*⁴⁴, realizaron un estudio en Australia Occidental, utilizando la técnica de homogeneizado de semen. Durante cinco años, evaluaron el tiempo que tardaron las reinas en comenzar la postura y la cantidad de miel producida, obteniendo buenos resultados pues las reinas comenzaron la postura tres semanas después de ser II, (excepto en 1985, en donde se piensa que hubo un problema de contaminación). En la producción de miel obtuvieron una mayor producción que la promedio en Australia Occidental de reinas apareadas de manera natural, 115 kg para el año 1986/87 y 109 kg para 1987/88, siendo el promedio 93 kg para el primer año y 98 kg para el segundo, dos meses después de la II.

Sin embargo, algunos riesgos pueden ser tomados en consideración, como la posible contaminación de todo el semen con materia fecal, por lo que los autores recomiendan que al usar semen homogeneizado es indispensable:

- Utilizar zánganos maduros y sanos, que de preferencia hayan defecado antes de ser usados
- Condiciones asépticas, que provean la mínima contaminación.
- Dilución apropiada del semen.
- Que el manejo de reinas sea adecuado antes y después de la II

Con el uso de la solución Kiev se encontró un retraso de 9.27 ± 0.79 días en el inicio de la oviposición después de la II CO₂ en 1980. Con el buffer Tris se adelantó 4.35 días después

de la II en verano; Moritz, et al ³⁹, con la técnica usual de II y la solución salina Hyess la oviposición tardó en comenzar 7.69 días, este resultado se aproxima a los resultados de Kaftanoglu que usaron la técnica Mackensen y diluyente Kiev.

12. DISCUSIÓN

DILUYENTES

Como se mencionó anteriormente, muchos diluyentes se han probado a lo largo de los años. El cuadro 3 muestra un resumen de lo encontrado y de acuerdo a éste se puede observar que los diluyentes 2 – 8 en comparación con los diluyentes 9 – 19 presentan un grado de motilidad intermedio (dentro de su escala), utilizando la misma temperatura, y en un período corto de almacenaje; (únicamente 30 a 60 minutos). Dentro de estos se puede observar que la hemolinfa de zángano tiene el mejor efecto crioprotector y afecta en menor medida la motilidad del espermatozoide; sin embargo, tiene la desventaja de que su uso en la inseminación instrumental es difícil, ya que este coagula, lo que hace necesario el uso de la enzima catalasa para reducir este efecto, pero esta daña al espermatozoide y al tracto reproductivo de la reina, mientras que los segundos se preservaron por casi un año. Por otro lado, se puede observar que los diluyentes 9 – 13 presentan un porcentaje de motilidad alto (80% a 95%), en comparación con los otros diluyentes, por lo cual pueden ser considerados como buenos crioprotectores de semen. Sin embargo, los diluyentes 9 y 11 sobresalen de los demás, ya que son los que presentan mayor porcentaje de motilidad después de ser descongelados y permanecer casi un año almacenados. Cabe destacar que a los diluyentes 9—19 se les agregó DMSO, pero con el diluyente 9 (Solución Kiev), se probaron 10 diferentes concentraciones de éste, encontrándose que la concentración óptima se encuentra dentro del rango 8° C a 12° C, en el cual los espermatozoides no sufren daños, lo cual confirma lo reportado por Harbo en 1979, en el cual menciona que la concentración óptima para utilizar DMSO es 10%. El uso del DMSO en esa concentración en la solución 11 la hace superior a la solución 9, debido a las propiedades que le provee éste, como: protección a las células del espermatozoide durante su almacenamiento en nitrógeno líquido, aun en rangos de temperatura críticos. Ambos crioprotectores fueron probados mediante inseminación instrumental en reinas, sin embargo, los resultados arrojaron que los dos produjeron buena cantidad de cría de obreras pero no la suficiente para mantener una colonia de abejas. ^{3,11,27,30}

Con respecto a los diluyentes 20 – 22, el Buffer Tris, produce buenos resultados centrifugándolo con el semen, en comparación con los diluyentes 21 y 22, ya que el intervalo entre la inseminación y la oviposición es más corto con el uso de éste, mientras que para los otros dos la centrifugación tuvo un efecto retardador. Estos resultados pueden ser explicados de acuerdo a lo reportado por R. Moritz ³⁹, él menciona que el buffer tris contiene arginina y lisina, aminoácidos que se encuentran en altas concentraciones de manera natural en el plasma seminal de los zánganos.^{12,13,39,38}

En conclusión estos dos diluyentes parecen ser las mejores opciones para utilizarse como base para encontrar el diluyente ideal, de acuerdo a lo analizado anteriormente. A pesar que el diluyente número 20 no menciona datos como temperatura utilizada y tiempo de almacenamiento, la progenie obtenida fue muy buena.

TEMPERATURAS

En el cuadro 4 se muestra la comparación entre las diferentes temperaturas utilizadas. Las temperaturas 2 al 6 no reportan datos de los resultados obtenidos al conservar el semen con sus respectivas temperaturas, por lo cual no es posible evaluar si el semen sufrió daños que no permitieran la obtención de un buen porcentaje de progenie producido por la reina.

En el caso de de la temperatura 7, al transcurrir los 2 años de almacenamiento se observó que el paso del tiempo provocó un descenso significativo en el porcentaje de la progenie al igual que el diluyente número 8.

En la temperatura 9, la cual maneja 21° C, se observó que era óptima para conservar el semen, sin embargo sólo lo conserva por 2 días, tiempo muy corto para almacenarlo, ya que la finalidad es conservarlo el mayor tiempo posible.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las temperaturas 10 y 11 se observa que los mayores niveles de viabilidad de los espermatozoides son a los 6 semanas con un 70 a 80% en un rango de 20 a 25° C; sin embargo, no se evaluó el porcentaje de progenie producida, por lo tanto no se puede evaluar si la cantidad de abejas producida fue la suficiente para sustentar una colonia de abejas. En conclusión se puede observar que el mejor porcentaje de viabilidad es entre los 20 y 25° C lo cual nos indica que no es una temperatura de refrigeración sino ambiental.

13. CONCLUSIONES

Con base a lo anteriormente descrito es posible concluir que:

- ❖ Al recopilar la información acerca del tema fue posible observar la evolución de las investigaciones realizadas por los diferentes autores y para darse cuenta de las posibles deficiencias o aciertos que puedan llevar a la conservación del semen, y con ello proponer temas que puedan ser llevados a cabo para la realización de las investigaciones futuras.
- ❖ Aún no se conocen a ciencia cierta tanto las estructuras como los componentes de la espermateca y las vesículas seminales, estructuras anatómicas que funcionan como almacén natural para los espermatozoides, por lo cual sería necesario realizar más estudios acerca de los nutrientes o sustancias que permiten la conservación natural del semen ya que con esto sería posible tomar como base estos estudios para así aplicarlos en la conservación del semen de manera artificial.
- ❖ En cuanto al análisis de los diferentes diluyentes y temperaturas es posible observar que aun el tiempo de almacenaje del semen es muy corto y la calidad del mismo no es la mejor, ya que en la mayoría de las ocasiones el espermatozoide sufre daños en su estructura, lo que conlleva a la pérdida de su capacidad fertilizante y con ello a un bajo número de abejas obreras, indispensables para sustentar una colonia de abejas.
- ❖ En el caso de la comparación entre la Fecundación natural con la Inseminación instrumental se han encontrado diversas diferencias a lo largo de los años, sin embargo, en todos los estudios se produjeron factores que pueden alterar los resultados como: extravío o muerte de reinas, contaminación de semen que provocó muerte de algunas reinas, las condiciones ambientales pues la temperatura, el clima y la floración son esenciales para la producción tanto de cría como de miel. Por lo que

es posible concluir que se debe procurar, al probar semen criopreservado, tomar en cuenta estos factores, de los cuales, muchos de ellos no están en nuestras manos controlarlos, específicamente los ambientales.

14. LITERATURA CITADA

1. Collins AM. Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination. Invertebrate RD 2004 Agosto xx:x x-x
2. Dadant and Sons. The hive and the honey bee. 4^{ta} ed. Journal Printing Co., Carthage, Illinois, USA, 1975.
3. Rinderer ET. Bee genetics and breeding. Orlando, Florida. Academic Press. 1986
4. IICA. Mejoramiento Genético de las Abejas. Orientaciones Técnicas. IICA. 1998;4: 1 – 70
5. Guzmán E, Page R, Correa A. Introduction and acceptance of european queens in africanized and european honey bee (*Apis mellifera* L.) Colonies. Am. Bee. J. 1997:667 – 668
6. Guzmán, El impacto de la africanización de las abejas en México. Imagen veterinaria. 2004:22-25
7. Harbo J, Instrumental Insemination of queen bees Am. Bee. J. 1985:
8. Laidlaw, 1977, Instrumental Insemination
9. Kaftanoglu O, Peng Y. A washing technique for collection of honeybee semen. J. Apic. Res. 1980; 19 Suppl 3:205 – 211
10. Collins AM. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above – freezing temperatures. J. Econ. Entomol. 2000;93 Suppl 3:568 – 571
11. Locke S, Peng Y. The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). Physiol. Entomol. 1993; 18: 144 – 148
12. Kaftanoglu O, Peng Y. Preservation of honey bee spermatozoa in liquid nitrogen. J. Apic. Res. 1984; 23 Suppl 3: 157 – 163
13. Verma LR. Effect of deep freezing on survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.) Spermatozoa. Am. Bee. J. 1983; 12:851 – 852
14. Harbo J. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196°C). Ann. Entomol. Soc. Am. 1983; 76:890 – 891
15. Harbo J. The rate of depletion of spermatozoa in the queen honeybee spermatheca. J. Apic. Res. 1979; 18 Suppl 3:204 – 207
16. Harbo J. Mosaic male honey bees produced by queens inseminated with frozen spermatozoa. J. Hered. 1980; 71: 435 – 436

17. Harbo J. Viability of honey bee eggs from progeny of frozen spermatozoa. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1981;74:482 – 486
18. Harbo J. Oviposition rates of instrumentally inseminated and naturally mated queen honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1986;79:112 – 115
19. Harbo J. Artificial mixing of spermatozoa from honey bees and evidence form sperm competition. *J. Apic. Res.* 1990;29 Suppl 3:151 – 158
20. Collins AM. Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *J. Apic. Res.* 2004 43;4:167 – 171
21. Winston M. The biology of the honey bee. 1^{ra} Ed. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, London, England. 1991.
22. SAGARPA, Apicultura Básica. SAGARPA.. 2001; 1:1 – 84
23. Collins AM, Donoghue AM. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera* sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology* 1999; 51:1513 – 1523
24. Ruttner F. Inseminación Artificial en las abejas reinas. 2^{da} ed. Apimondia, Instituto Internacional de Tecnología y Economía Apícolas. España. 1976.
25. Cobey S, 1998, Rothenbuhler Honey Bee Lab, videocassette
26. Collins AM, Williams V, Evans JD. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol.* 2004;13 Suppl 2: 141 – 146
27. SAGARPA. Manual de cría de reinas. SAGARPA 2001; 1:1 – 86
28. Poole HK, Taber S. A Method of in vitro storage of honey-bee semen. *Am. Bee J.* 1969; 109:420 – 421
29. Chapman RF. The Insects: structure and function. 4^{ta} ed. Cambridge: Cambridge University, 1998.
30. Lennsky Y, Ben-David E, Schindler H. Ultrastructure of the spermatozoa of the mature drone honeybee. *J. Apic. Res.* 1979; 18 Suppl 4:264 – 271
31. Peng CY, Yin C, Yin L. Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiol Entomol.* 1993; 18: 93 – 101
32. Weirich G, Collins A, Williams V. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie.* 2001; 33: 3 – 14
33. Crane E. Bees and beekeeping: Science, practice and world resources. Ithaca, New York Academic, 1990.

34. Dade HA. Anatomy and Dissection of the Honey bee. 3^{ra} Ed. The Alden Press. Oxford, Cardiff, United Kingdom. 1994.
35. Lodesani M, Balduzzi D, Galli a. A study on spermatozoa viability over time in honey bee (*Apis mellifera* L.) queen spermathecae. J. Apic. Res. 2004;4 Suppl 1:27 – 28
36. Collins AM. Relation between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. Apidologie 2000; 31: 1 – 9
37. Klenk M, Koeniger G, Koeniger N, Fasold H. Proteins in spermathecal gland secretion and spermathecal fluid and the properties of a 29 kDa protein in queens of *Apis mellifera*. Apidologie 2004; 35:371-381
38. Williams J, Harbo J. Bioassay for diluents of Honey Bee Semen. Ann. Entomol. Soc. Am. 1982; 75: 457 – 459
39. Moritz R. The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. J. Apic. Res. 1984;23 Suppl 3:164 – 167
40. Harbo J. Effect of Above-Freezing Temperatures on Temporary Storage of Honeybee Spermatozoa. J. Apic. Res. 1987;26 Suppl 1:53 – 55
41. Peng CY, Yin C, Yin L. Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm. Physiol. Entomol. 1992; 17 : 269 – 276
42. Kaftanoglu O, Peng Y. Effects of Insemination on the initiation of Oviposition in the Queen Honeybee. J. Apic.Res.1982; 21 Suppl 1:3 – 6
43. Harbo J. A Comparision of Instrumentally Inseminated and Naturally Mated Queens. J. Apic. Res. 1984;23 Suppl 1:31 – 36
44. Kuhnert M, Carrick MJ, Allan LF. Use of homogenized drone semen in a bee breeding program in Western Australia. Apidologie. 1989; 20: 371 – 381