



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

**EFFECTO DE LA TEMPORADA DE SECA Y LLUVIA SOBRE
LA EFICACIA REPRODUCTIVA DE ABEJAS**
(Apis mellifera)

TESIS

Que presenta:

Carlos Adolfo Castellanos Zacarías

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable

Director de tesis:

Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde

Conkal, Yucatán, México

Junio, 2025



TecNM



Conkal, Yucatán, México, a 11 de junio de 2025

El comité de tesis del candidato a grado: Carlos Adolfo Castellanos Zacarías, constituido por los CC. Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde, Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo, Dr. Henry Jesús Loeza Concha, Dr. Juan José Baeza Rodríguez, Dr. Roberto Zamora Bustillos, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: EFECTO DE LA TEMPORADA DE SECA Y LLUVIA SOBRE LA EFICACIA REPRODUCTIVA DE ABEJAS (*Apis mellifera*), que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Agricultura Tropical Sustentable, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde
Director de Tesis

Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo
Co-director de Tesis

Dr. Henry Jesús Loeza Concha
Asesor de Tesis

Dr. Juan José Baeza Rodríguez
Asesor de Tesis

Dr. Roberto Zamora Bustillos
Asesor de Tesis

Conkal, Yucatán, México a 11 de junio de 2025.

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.



Carlos Adolfo Castellanos Zacarías

AGRADECIMIENTOS

A Dios, fuente de toda sabiduría y fortaleza, gracias infinitas por permitirme culminar este proceso. En los momentos de duda, cansancio y adversidad.

A mis padres Jacinto Antonio Castellanos Burgos y Dora Alicia Zacarías, pilares inquebrantables de mi vida, gracias por su amor constante, por enseñarme el valor del esfuerzo y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. A mis hermanos Carlos Manuel, Carlos Ricardo y Marvin Jacinto, por su apoyo sincero, sus palabras oportunas y por ser siempre mi refugio familiar.

A mi esposa e hija Verónica Jiménez Ruíz y Alicia Briggith Castellanos Jiménez, compañeras de vida y de sueños, gracias por su paciencia inagotable, su comprensión y su amor incondicional. Su presencia ha sido un sustento silencioso pero poderoso a lo largo de este camino.

A mis abuelos Carlos Antonio Castellanos Carío y Orfilia Claribel Burgos, que con su ejemplo de vida me enseñaron la importancia del trabajo honesto, la humildad y el respeto por los demás. Su memoria y sus palabras siguen siendo una guía profunda en mi vida.

Al Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde, Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo, Dr. Henry Jesús Loeza Concha, Dr. Roberto Zamora Bustillos, Dr. Juan José Baeza Rodríguez, Dr. Luis Leonardo Pinzón López y al MC. Jorge Ariel Vivas Rodríguez mentores y académicos que me acompañaron en este recorrido, les agradezco profundamente por su dedicación, su exigencia formativa y su generosidad intelectual. Muchos de ustedes, además de maestros, se convirtieron en entrañables amigos, y en cada conversación, consejo y gesto hallé no solo conocimiento, sino también humanidad.

Esta tesis representa más que un logro académico: es el resultado del amor, el esfuerzo y la confianza de muchos. A todos ustedes, gracias desde lo más profundo de mi corazón.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
INDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 ANTECEDENTES.....	3
1.2.1 Importancia de la apicultura en Yucatán.....	3
1.2.2 Flora polínifera del estado de Yucatán.....	4
1.2.3 Captura y almacenamiento de polen.....	4
1.2.4 Cambio climático	5
1.2.5 Generalidades en la reproducción de las abejas.....	5
1.2.5.1 Ciclo biológico de la abeja reina.....	6
1.2.5.1.1 Anatomía reproductiva de la abeja reina.....	6
1.2.5.2 Ciclo biológico del zángano.....	6
1.2.5.2.1 Anatomía reproductiva del zángano.....	6
1.2.6 Biología reproductiva y morfológica de la abeja reina y el zángano de <i>Apis mellifera</i>	7
1.2.7 Apareamiento en <i>Apis mellifera</i> L.	8
1.2.7.1 Fecundación natural	8
1.2.7.2 Fecundación artificial.....	9
1.2.8 Almacenamiento de espermatozoides en la espermateca y fertilización de los ovulos....	10
1.2.9 Espermatozoide de zángano de <i>Apis mellifera</i> L.....	11
1.2.9.1 Estructura de los espermatozoides.....	11
1.2.9.1.1 Espermatozoides.....	11
1.2.9.2 Evaluación de las características de una muestra seminal	12
1.2.9.2.1 Colecta de semen	12
1.2.9.2.2 Evaluación macroscópica.....	13
1.2.9.2.2.1 Volumen de semen.....	13
1.2.9.2.3 Evaluación microscópica	13
1.2.9.2.3.1 Concentración de espermatozoides	13

1.2.9.2.3.2	Motilidad espermática.....	14
1.2.9.2.3.3	Viabilidad de los espermatozoides.....	14
1.2.9.2.3.4	Integridad del acrosoma.....	15
1.2.9.2.3.5	Actividad mitocondrial.....	15
1.2.9.2.3.6	Integridad de la membrana plasmática de la cola (HOST).....	16
1.2.10	Control y calidad de abejas reina	16
1.2.10.1	Producción de abejas reina.....	16
1.2.10.1.1	Método Doolittle.....	17
1.2.10.2	Valoración reproductiva de abejas reina	17
1.2.10.2.1	Evaluación de fecundidad (número de huevos por día)	17
1.2.10.2.2	Postura, cría abierta, cría operculada y solidez de cría.....	17
1.3	HIPÓTESIS.....	19
1.4	OBJETIVOS	20
1.4.1	Objetivo General.....	20
1.4.2	Objetivos específicos.....	20
1.5	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	21
1.6	LITERATURA CITADA.....	22
CAPITULO II. EFFECT OF FLOWERING PERIOD ON DRONE REPRODUCTIVE PARAMETERS (<i>Apis mellifera</i> L.).....		1
2.0	Abstract	1
2.1	Introduction	1
2.2	Materials and Methods	2
2.3	Results	5
2.4	Discussion	6
2.5	Conclusions	8
2.6	Acknowledgments	8
2.7	References	9
CAPITULO III. QUEEN BEE (<i>Apis mellifera</i> L.) PRODUCTION USING GRAFTING METHOD AND NON-GRAFTING SYSTEM.....		1
3.0	Abstract	1
3.1	Introduction.....	2
3.2	Materials and Methods	3
3.3	Results	5
3.4	Discussion	6
3.5	Conclusions	7

3.6 References	7
CAPITULO IV. RENDIMIENTO REPRODUCTIVO Y CALIDAD ESPERMÁTICA EN ESPERMATECAS DE REINAS (<i>Apis mellifera</i>) FECUNDADAS NATURALMENTE E INSTRUMENTALMENTE EN DOS TEMPORADAS CONTRASTANTES.....	
4.0 Abstract	1
4.1 Introduction	2
4.2 Materials and Methods	4
4.3 Results	11
4.4 Discussion	14
4.5 Conclusions	21
4.6 References	21

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO II

Table 1. Floral species were identified as feeding sources for bee colonies during the flowering-scarcity and flowering-onset periods5

Table 2. Spermatoc parameters of drones (*Apis mellifera* L.) bred in flowering-scarcity and flowering onset periods (Mean $\pm$ SEM)5

CAPITULO III

Table 2. Comparison of the Doolittle Method and Nicot System on queen bee rearing parameters during scarcity flowering season (Mean $\pm$ SE)10

CAPITULO IV

Cuadro 1. Comparación de los parámetros de cría de abejas reinas en la temporada de escasa floración e inicio de floración (medias $\pm$ error estándar).....11

Cuadro 2. Productividad ovipositoria de abejas reinas fecundadas de manera natural e inseminadas instrumentalmente en épocas de lluvia y seca (Media $\pm$ SEM)12

Cuadro 3. Calidad espermática del semen almacenado en espermatecas de abejas reinas fecundadas de manera natural e inseminadas instrumentalmente en temporada de lluvia y seca (Media $\pm$ SEM)13

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO II

Figure 1. Eversion of the copulatory apparatus: (A) Without eversion, (B) Eversion with ejaculation, and (C) Eversion with absence of semen. (Photos taken by the author)3

Figure 2. . Eversion of the copulatory apparatus and ejaculation of drones bred in the flowering-scarcity and flowering-onset periods6

RESUMEN

La disponibilidad de recursos florales durante el desarrollo de zánganos y reinas de *Apis mellifera* influye significativamente en su capacidad reproductiva. En el primer estudio, se evaluó el efecto de dos épocas contrastantes inicio de floración y escasez floral sobre la eversión del aparato copulador, la eyaculación y la calidad espermática de zánganos. Durante el periodo de escasez floral se suministró jarabe de azúcar y un suplemento proteico para estimular la cría de zánganos. Aun así, los resultados mostraron una menor proporción de zánganos con eversión (112) y eyaculación (39), así como parámetros espermáticos inferiores en comparación con los obtenidos durante el inicio de la floración (270 con eversión, 162 con eyaculación). Esto sugiere que una nutrición larval deficiente compromete el desarrollo gonadal y la calidad seminal. En el segundo estudio se analizó la prolificidad y calidad espermática de reinas fecundadas naturalmente e inseminadas instrumentalmente en las mismas temporadas. Se observó una mayor aceptación larval y peso de reina al inicio de la floración, y durante esta época, las reinas fecundadas naturalmente mostraron mayor rendimiento ovipositorio y motilidad espermática. En contraste, en condiciones de escasez, las reinas inseminadas presentaron mayor volumen seminal y postura, aunque sin diferencias significativas en la calidad del semen almacenado. En conclusión, los hallazgos indican que la época de floración favorece la expresión del potencial reproductivo mediante fecundación natural, mientras que la inseminación instrumental ofrece ventajas bajo condiciones adversas. Esto resalta la importancia de sincronizar la producción de reproductores con la disponibilidad de recursos para optimizar el rendimiento apícola.

Palabras clave: *Apis mellifera*, zánganos, reinas, floración, escasez, fecundación.

ABSTRACT

The availability of floral resources during the development of drones and queens of *Apis mellifera* significantly influences their reproductive capacity. In the first study, the effect of two contrasting seasonal periods onset of flowering and scarcity flowering was evaluated on drone copulatory organ eversion, ejaculation, and sperm quality. During the floral dearth period, sugar syrup and a protein supplement were provided to stimulate drone brood production. Nevertheless, the results showed a lower proportion of drones with eversion (112) and ejaculation (39), as well as inferior sperm parameters compared to those obtained during the onset of flowering (270 with eversion, 162 with ejaculation). These findings suggest that poor larval nutrition compromises gonadal development and semen quality. The second study assessed the prolificacy and sperm quality of queens that were naturally mated or instrumentally inseminated during the same seasonal periods. Higher larval acceptance and queen body weight were observed at the onset of flowering. During this period, naturally mated queens exhibited higher oviposition rates and sperm motility. In contrast, under dearth conditions, instrumentally inseminated queens showed greater stored semen volume and brood production, although no significant differences were found in the quality of stored sperm. In conclusion, the findings indicate that the flowering season enhances reproductive performance through natural mating, while instrumental insemination provides resilience under adverse conditions. These results underscore the importance of synchronizing the production of reproductive individuals with resource availability to optimize beekeeping performance.

Keywords: *Apis mellifera*, drones, queens, flowering, dearth, mating.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

La apicultura es de suma importancia dentro de la agricultura sostenible, formando parte de los ingresos económicos especialmente en el área rural (Argüello-Najera, 2010), proporcionando beneficios al ecosistema y favoreciendo la polinización de cultivos (Barrios Rivera, 2012).

La Península de Yucatán se encuentra entre las zonas tropicales más importantes para la apicultura (Magaña-Magaña *et al.*, 2016) con un ciclo apícola bien marcado en tres temporadas durante el año (precosecha, cosecha y postcosecha), y es uno de los principales exportadores y productores de miel de gran calidad, destinando el 95% de su producción al mercado internacional (Castañón-Chavarría, 2009), siendo un producto muy demandado por las características de origen botánico y propiedades de la miel (Güemes-Ricalde *et al.*, 2003).

En Yucatán, los ciclos de cosecha comienzan en noviembre y finalizan en junio, produciendo en el año 2018-2019 9,810 toneladas de miel, en el año 2019-2020 5,529 toneladas y en lo que va del año 2020-2021 816 toneladas con una disminución del 85.2% al año anterior (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2021).

En las colonias de *Apis mellifera*, el zángano juega un papel muy importante en la ecología, ayudando a mantener el ecosistema estable mediante la diversidad genética a través de la fecundación de la reina. Los zánganos se aparean con una sola reina durante los vuelos nupciales (Couvillon *et al.*, 2010; Tarpy *et al.*, 2012). El apareamiento múltiple proporciona suficiente esperma para fertilizar el ovulo de la abeja reina a lo largo de su vida (Cobey, 2007). Por lo tanto, necesita un gran número de zánganos fértiles para garantizar el apareamiento óptimo de la reina (Rhodes *et al.*, 2011). No obstante, la cría de zánganos se da en colonias con abundantes recursos alimenticios (época de floración), donde, durante los primeros días de su vida son alimentados con alimentos ricos en proteínas y aminoácidos a través de la trofalaxis por las obreras (Goins y Schneider, 2013) asegurando su pleno crecimiento y desarrollo, dada su masa, las larvas de zánganos necesitan alimento con una composición proteica más diversa (Winston, 1991).

Sin embargo, durante el año existen fenómenos climatológicos que afectan la variación de factores ambientales, que disminuyen la diversidad de plantas (Giannini *et al.*, 2015), los procesos de polinización (Agüero *et al.*, 2018; Culley *et al.*, 2002; Kuhlmann *et al.*, 2012; Schweiger *et al.*, 2010), y por ende la reproducción de las abejas (Dorado y Vázquez, 2016). Los factores estacionales influyen en la producción de zánganos, incluida la duración del día y la temperatura, el tamaño de las colonias y la disponibilidad de alimentos (Boes, 2010).

No obstante, la disponibilidad de fuentes de alimento varía en diferentes estaciones durante el año, en una región en particular donde los recursos tienden a ser muy bajos (periodo de escasez). Por lo tanto, el nivel insuficiente de proteína en la dieta de zánganos es un problema, ya que, la espermatogénesis ocurre durante el desarrollo larvario y pupal hasta que el zángano emerge (Woyke y Skowronek, 1974; Rhodes *et al.*, 2011), lo que podría tener una significancia en la calidad espermática (Thomson, 2010), disminuyendo el volumen del semen y una mayor probabilidad de fracaso en la eyaculación (Czekonska *et al.*, 2015) y por ende una disminución en el porcentaje de éxito en la fecundación de la abeja reina (Hayworth *et al.*, 2009). Por lo que, el ciclo de producción y reproducción de la colonia se puede ver afectado.

En los últimos años se han realizado extensas investigaciones sobre las necesidades nutricionales en colonias y obreras de abejas melíferas (*Apis mellifera*) (Stevanovic *et al.*, 2018; Wijayati *et al.*, 2019), a través de formulaciones de dietas con el propósito de mantener la fuerza de la colonia, mejorar la supervivencia de la cría y la duración de la edad adulta a través de sustitutos y/o suplementos de polen, los cuales se les proporciona a la colonia durante el verano y la temporada de invierno, dependiendo de la gravedad durante los periodos de escasez (Saffari *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2013; Kumari y Kumar, 2020).

Sin embargo, la mayor parte de investigaciones importantes para la apicultura sobre suplementos y/o sustitutos de polen, se ha realizado en países donde las condiciones ecoclimáticas, la diversidad floral y la disponibilidad de materia prima son diferentes (Paray *et al.*, 2021). Por lo tanto, aún sigue vigente la pregunta, sobre cómo; los nutrientes, la diversidad y la estabilidad de los recursos florales afectan la reproducción de la abeja reina y el zángano (Hrassnigg y Crailsheim, 2005).

En vista de lo anterior, se cree que, la disponibilidad de los recursos apibotánicos en las diferentes épocas del año repercuten en la diversidad genética de los zánganos y su calidad espermática, la cual a su vez influye negativamente sobre la prolificidad de las abejas reinas fecundadas. Por lo que, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la época del año sobre la calidad seminal, diversidad genética de zánganos (*Apis mellifera*) y su impacto en la prolificidad de la abeja reina.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Importancia de la apicultura en Yucatán

La apicultura se dispersa alrededor de toda la península, donde; los porcentajes de volumen y calidad de la producción de miel obtenidos, se debe al crecimiento en el número de colmenas y a la diversidad de flora que se encuentra en la región, de los cuales, las abejas visitan alrededor de 900 especies de plantas (Ramos-Díaz et al., 2015).

La producción apícola en el área rural, ha venido generando por muchos años autoempleos que benefician a la familia rural y mantiene su arraigo en el campo (Godoy, 1999), siendo una actividad complementaria a otras fuentes de subsistencia como; los fomentos agrícolas, forestales y crianza de animales de traspatio (Echazarreta et al., 1997).

El ciclo de producción en la península de Yucatán depende en cierta forma de las condiciones ambientales como; lluvia, frío o calor, los cuales tienen un efecto en la variación de factores ambientales que disminuyen la floración de plantas que usan las abejas para el desarrollo de su colonia (CONABIO, 2009). La apicultura en la Península de Yucatán cuenta con tres etapas durante el ciclo de producción de miel; Precosecha (octubre-diciembre), Cosecha (enero-mayo) y Postcosecha (junio-septiembre) (González-Acereto y Quezada-Euán, 2010).

La península de Yucatán se encuentra entre las zonas tropicales más importantes para la apicultura (Magaña-Magaña et al., 2016) y es uno de los principales exportadores y productores de miel de gran calidad, de los cuales destinan el 95% de su producción al mercado internacional (Europa y Estados Unidos) por sus características de origen botánico y propiedades de la miel (Castañón-Chavarría, 2009).

No obstante, los apicultores de la península de Yucatán han enfrentado consecuencias en la productividad de sus apiarios (Güemes-Ricalde et al., 2003), con problemas relacionados a la aparición de la abeja africana (*Apis mellifera*), la presencia del acaro *Varroa destructor*, fenómenos climatológicos como; huracanes, sequias, lluvias fuertes, inundaciones, entre otros, además, de la falta de capacitación y una baja en el mercado.

En los últimos años se ha tenido una disminución en los ciclos de cosecha, produciendo en el año 2018-2019 9,810 toneladas de miel, en el año 2019-2020 5,529 toneladas y en lo que va del año 2020-2021 816 toneladas con una disminución del 85.2% al año anterior (SIAP, 2021) sufriendo un gran deterioro y condicionando un mayor nivel de costos de producción.

1.2.2 Flora polinífera del estado de Yucatán

El estado de Yucatán cuenta con una diversidad de flora néctar-polinífera debido a las condiciones climáticas y topográficas de la región las cuales permiten una amplia distribución y densidad de las mismas, aportando una gran cantidad de néctar y polen (Jiménez-Reyes y Morales-Rodríguez, 2005). Según Flores y Vermont, 2011; Villanueva-Gutiérrez et al. 2009, dentro de la flora más representativa del estado se encuentran; el ja'abin (*Piscidia piscipula*), el ts'iits'ilche (*Gymnopodium floribundum*), las enredaderas (*Convolvulácea*), el Chakaj (*Bursera simaruba*) y el tahonal (*Viguiera dentata*). Sin embargo, Villanueva-Gutiérrez et al. 2009; Cetzal-Ix et al. 2019 mencionan que también se encuentra presente; el chechem (*Metopium brownei*), kaa-chunub (*Thonina canescens*), sak-piixoy (*Trema micrantha*), tsalam (*Lysiloma latisiliquum*), pukte' (*Terminalia buceras*), box káatsim (*Senegalia riparia*), chukum (*Havardia albicans*), tso'otsk'ab (*Ipomoea tuxtlensis*), tso'ots aak' (*Merremia aegyptia*), solen aak' (*Jacquemontia pentantha*), yáax aak' (*Jacquemontia verticillata*), ch'omak (*Gouania lupuloides*) y xtabentuun (*Turbina corymbosa*).

1.2.3 Captura y almacenamiento de polen

Un método sencillo y eficaz para la evaluación del polen es atrapar bolitas de polen corbicular de las patas de las abejas que regresan a la colmena por medio de trampas de polen (Judd et al., 2020). La captura de polen estimula a las abejas forrajeras a recoger más

polen, aumentando la eficiencia en la polinización de cultivos y por ende en la vegetación circundante (Gemedá et al., 2018).

Las metodologías de recolección de polen pueden ser utilizadas para conocer el tipo de forraje utilizado por las abejas, para determinar la cantidad, calidad y taxon de las especies de plantas con flores. No obstante, el comportamiento de búsqueda de polen dependerá en función del estado de la colonia en relación con los niveles de población de huevos y larvas (Weidenmüller y Tautz, 2002).

Cabe mencionar, que en base al comportamiento de búsqueda de alimento, el granulo de polen corbicular es predominante por una sola especie de planta (Hill et al., 1997). Por lo tanto, se puede describir la diversidad de polen clasificando el polen corbicular por color e informar el número de colores detectados (Barth et al., 2009; Stoner et al., 2019).

1.2.4 Cambio climático

El cambio climático puede alterar la sincronía entre los factores ambientales afectando los periodos de floración de las plantas y polinización, influyendo en los desajustes fenológicos de las abejas, contribuyendo a la pérdida de las mismas (Petanidou et al., 2014). La temperatura y la humedad son un factor crucial en la reproducción de las abejas. Debido a que, las altas y bajas temperaturas y/o humedad afectan la calidad del semen en zánganos (Koeniger y Koeniger, 2007) y la viabilidad del semen almacenado en la abeja reina (McAfee et al., 2020). Además, de repercutir de igual manera en las crías. Sin embargo, otro factor que afecta en la reproducción es el agotamiento de las fuentes de alimento, el cual causa una desnutrición indirecta inducida por el cambio climático (Thomson, 2010). Aunado a lo anterior, el comportamiento de las abejas varía en relación a las condiciones climáticas y ambientales (Tapia-González et al., 2021).

1.2.5 Generalidades en la reproducción de las abejas

La reproducción de las abejas se lleva a efecto cuando existe floración abundante, iniciando su postura y fecundando los huevos (reproducción sexual) que darán origen a abejas obreras y/o abejas reinas y por (reproducción asexual) huevos no fecundados por partenogénesis que darán origen a Zánganos (Guzmán-Novoa, 2003). Sin embargo, el sistema reproductivo de las abejas está desarrollado solo en la reina y el zángano.

1.2.5.1 Ciclo biológico de la abeja reina

El ciclo biológico de la reina dura aproximadamente tres días y alrededor de cinco horas en nacer y empieza el desarrollo larval que dura alrededor de cinco días y medio. Posteriormente, la celda es operculada y se desarrolla la etapa de prepupa y pupa hasta que la reina emerge haciendo un total de 16 días. Al segundo día de que emerge la reina empieza a dar sus primeros vuelos de reconocimiento y entre el séptimo y décimo día sale a fecundarse en más de un vuelo, para posteriormente iniciar con la postura de huevos (Valega, 2007).

1.2.5.1.1 Anatomía reproductiva de la abeja reina

El aparato reproductor de la reina está formado por dos ovarios, cada ovario tiene alrededor de 150 ± 180 ovariolas (Page y Peng, 2001) los cuales son tubos largos que comunican a la vagina y sirven como válvula de cierre. La válvula de cierre vaginal cierra la comunicación entre la vagina y el oviducto (Barrera, 2004). La vagina durante la copula fija el pene del zángano, el cual se desprende en el acto quedando bloqueada la vagina hasta que otro zángano lo desprende.

Los espermatozoides emigran a los oviductos y posteriormente pasan en la espermateca (Koeniger et al., 2014). La espermateca es un órgano donde se almacena el espermatozoide de las copulas anteriores, siendo capaz de almacenar y nutrir el semen durante años sin perder la viabilidad del espermatozoide (Klowden, 2013). La reina puede llegar a ovipositar hasta 2 ,000 huevos en un solo día (Winston et al., 1991). Sin embargo, disminuye a medida que la reina envejece.

1.2.5.2 Ciclo biológico del zángano

El ciclo biológico de los zánganos dura aproximadamente tres días en nacer y pasa a la etapa larval que dura siete días. Posteriormente la celda es operculada y se convierte en pupa y prepupa la cual dura aproximadamente 14 días hasta que nace el zángano haciendo un total de 24 días (Valega, 2007).

1.2.5.2.1 Anatomía reproductiva del zángano

Está formado por los testículos donde se originan y maduran los espermatozoides produciendo hasta 10 millones de espermatozoides los cuales migran a las vesículas

seminales donde se almacenan y permanecen durante aproximadamente 13 días hasta el momento de la copula. Al final del estadio larvario, la glándula mucosa se desarrolla a partir de los conductos deferentes el cual conecta los testículos con las vesículas seminales produciendo moco blanco (Koeniger et al., 2014).

Las glándulas cornuales segregan una secreción color anaranjado que ayuda a reforzar los signos de apareamiento en el tracto reproductivo de la reina (Colonello y Hartfelder, 2005). El endofalo o órgano copulador es una estructura tubular que se halla dentro de la cavidad abdominal formada por placas quitinosas, la cuales requieren de una fuerte contracción por medio de las paredes del abdomen para producir la eversión del pene.

1.2.6 Biología reproductiva y morfológica de la abeja reina y el zángano de *Apis mellifera*

En la abeja melífera *Apis mellifera*, la mayoría de los rasgos deseables de una colonia, como; la productividad, el comportamiento dócil y la resistencia a enfermedades, entre otros., se rigen por medio de la naturaleza de la abeja reina (Ratnieks y Nowogrodzki, 1988). Por lo tanto, la cría de reinas de abejas melíferas es una de las partes importantes en la apicultura para volver a reinar las colonias, optimizar sus características genéticas y mejorar la producción de cría y miel (Laidlaw y Page, 1997).

Por lo tanto, es necesario evaluar la biología reproductiva y las características morfológicas, ya que, la productividad depende de algunos parámetros de calidad estandarizados en la calidad de la abeja reina los cuales se correlacionan con; el peso a la emergencia, el número de ovarios, el diámetro de la espermateca y el número de espermatozoides dentro de la espermateca (Kahya et al., 2008; Carreck et al., 2013; Hatjina et al., 2014).

Por otra parte, la frecuencia de apareamiento de abejas reinas es muy variable, debido al número de zánganos con que se aparean en el vuelo nupcial (Estoup et al., 1994), lo cual le permite almacenar volúmenes variables de espermatozoides para ser utilizados aleatoriamente en la fertilización de óvulos (Cobey, 2007).

En este sentido, el recuento de espermatozoides almacenados en la espermateca (Delaney et al., 2011), el volumen y el número de espermatozoides viables (Guler y Alpay,

2005), son importantes de igual manera para establecer el potencial reproductivo de la abeja reina. Sin embargo, el rendimiento de una colonia de abejas melíferas no solo depende de la calidad de la reina, sino también de la calidad de los zánganos que se aparean con la reina (Hatjina et al., 2014; Pettis et al., 2016), debido a que una baja viabilidad de los espermatozoides genera un bajo rendimiento en la fecundación de la reina.

Por ello, es fundamental analizar la calidad de los zánganos y los parámetros espermáticos, con el fin de proporcionar una mejora en la producción y reproducción, en contraste con la prevalencia de las duras condiciones ambientales de la región, la alta temperatura, la baja humedad y los recursos limitados (Al-Sarhan et al., 2019).

1.2.7 Apareamiento en *Apis mellifera* L.

1.2.7.1 Fecundación natural

El apareamiento se realiza en las áreas de congregación de zánganos, las cuales se encuentran con un diámetro alrededor de las colonias de 30-200 m. (Baudry et al., 1998). Los zánganos se reúnen en las áreas de congregación en promedio a los 21 días de edad (Couvillon et al., 2010) durante primavera y a los 13 días de edad durante el verano en días con condiciones óptimas entre las 14:00 y 16:00 h. (Reyes et al., 2019), esperando la llegada de algunas reinas vírgenes.

Cuando una reina virgen llega al área de congregación, los zánganos la persiguen tratando de copular, formando un enjambre detrás de ella, del cual, durante su vuelo nupcial se aparea consecutivamente con varios zánganos en secuencia rápida (Rhodes et al., 2011). Durante la copula el zángano introduce irreversiblemente su endofalo en la reina, transfiriendo su semen al oviducto e inmediatamente cae al suelo para morir (Woyke y Ruttner, 1958).

Las reinas de *Apis mellifera* son poliandrosas y se aparean solamente en un periodo de su vida (Laidlaw y Page, 1984), cuando las condiciones ambientales, como; la temperatura, el viento y la nubosidad son óptimas (Lensky y Demter, 1985), generalmente, realizan sus primeros vuelos a los 6 días de edad, en primera instancia realizando vuelos cortos de orientación que duran pocos minutos, para, posteriormente realizar el verdadero vuelo nupcial (N. Koeniger y Koeniger, 2007) que dura aproximadamente 30 min.,

efectuando de uno a dos vuelos de apareamiento (Schlüns et al., 2005) y copulando en promedio con 12-14 zánganos por vuelo (Tarpy et al., 2004).

No obstante, un estudio reciente menciona que el grado de poliandria podría ser mayor, de tal manera que la reina puede llegar a aparearse aproximadamente con 34-77 zánganos (Withrow y Tarpy, 2018). Por otra parte, la mayor frecuencia de zánganos durante el apareamiento reduce los efectos potenciales de la endogamia, además, de mejorar indirectamente la aptitud de la colonia a través de un aumento en la diversidad genética dentro de la colonia (Mattila y Seeley, 2007).

Aunado a lo anterior, al terminar su último vuelo nupcial la reina llega a la colonia y comienza a almacenar esperma en su spermateca, un órgano especializado en el almacenamiento de espermatozoides, para, posteriormente comenzar la postura de huevos (Ellis et al., 2015). Las reinas no se aparean de nuevo después del inicio de la oviposición (Schluns et al., 2005).

1.2.7.2 Fecundación artificial

La inseminación instrumental es una herramienta que se utiliza para controlar y mejorar la genética de las abejas melíferas (Maucourt et al., 2023). La técnica garantiza un control completo en la reproducción de esta especie. Además, de contribuir a mejorar las actividades de investigación científica y la producción comercial de abejas reinas (Guillard y Oldroyd, 2020).

Uno de los avances recientes en la inseminación instrumental de las abejas melíferas es la selección de muestras espermáticas a través de técnicas de fluorescencia (Kaya y Uysal, 2023). Ya que permite identificar y seleccionar muestras de mejor calidad, aumentando las probabilidades de éxito en el proceso de fecundación y fertilización de abejas reinas.

Las abejas reinas de la especie *Apis mellifera* L. se aparean una vez en su vida, al copular con 12 a 14 zánganos durante el vuelo nupcial (Tarpy et al., 2004). Sin embargo, un estudio reciente reveló que el grado de poliandria podría ser aún mayor. Que la reina puede aparearse con 34 o 77 zánganos durante su vuelo de apareamiento (Withrow y Tarpy, 2018).

Los descubrimientos demuestran que el control del apareamiento natural de las abejas reinas representa un reto. Ya que el número de zánganos con los que se aparean puede variar significativamente, resultando ser un factor que puede impactar en la diversidad genética de las colonias de abejas.

1.2.8 Almacenamiento de espermatozoides en la espermateca y fertilización de los óvulos

Durante el apareamiento, únicamente del 3% al 5% de los espermatozoides por cada eyaculación de zángano son almacenados en la espermateca de la abeja reina para la futura fertilización (Schlüns et al., 2005). No obstante, una reina puede llegar a almacenar aproximadamente de 5-6 millones de espermatozoides en su espermateca (Baer, 2005; Tarpy et al., 2012). La espermateca recibe, mantiene y libera espermatozoides para fertilizar los óvulos proporcionando un entorno apropiado con el fin de garantizar la viabilidad a largo plazo de los espermatozoides (Pascini et al., 2012).

Por otra parte, las reinas son altamente eficientes y fertilizan cada ovulo con una media de 2 espermatozoides. Sin embargo, las reinas que son inseminadas instrumentalmente contienen más semen, lo que les permite almacenar más espermatozoides y por ende fertilizan los óvulos con más espermatozoides (Baer et al., 2016). No obstante, los espermatozoides cuando entran a la espermateca pueden enfrentar una compensación entre la capacidad competitiva (espermatozoides que nadan rápido) y la idoneidad para el almacenamiento (espermatozoides longevos que nadan lento) (Orr y Zuk, 2012).

La mezcla bioquímica de secreciones glandulares con espermatozoides almacenados en la espermateca realiza una serie de funciones nutricionales y protectora que mantienen la viabilidad de los espermatozoides (Pascini y Martins, 2017). Las reinas apareadas tienen niveles altos de proteína en la espermateca relacionada con antioxidantes (González et al., 2018), los cuales también se encuentran presentes en el fluido seminal de zánganos (Gorshkov et al., 2015).

Las enzimas antioxidantes reducen el daño ocasionado por ROS. La catalasa, el glutatión S-transferasa (GST) y el superóxido dismutasa (SOD) contribuyen a la capacidad de que una reina pueda almacenar espermatozoides en la espermateca durante varios años

sin perder la viabilidad espermática (Corona y Robinson, 2006). El metabolito glucolítico gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) es un sustrato clave para la supervivencia del esperma de abeja melífera y en la producción de energía (Paynter et al., 2017).

1.2.9 Espermatozoide de zángano de *Apis mellifera* L.

1.2.9.1 Estructura de los espermatozoides

Los espermatozoides de zánganos son células largas y filamentosas con extremos coniformes (Lino-Neto et al., 2000), con aproximadamente una longitud de 250-270 μm y un ancho aproximado de 0.7 μm , el cual, consiste de una cabeza pequeña y estrecha de 10 μm de largo por 0.4-0.5 μm de ancho (Peng et al., 1993), que se encuentran adjuntos al centriolo de transición y el flagelo.

Por otra parte, la cabeza del espermatozoide contiene dos partes; el complejo acrosomal seguido de un núcleo lineal. El complejo acrosomal se encuentra conformado por una vesícula acrosomal cubierta de dos capas que recubren el perforatorio hasta el extremo nuclear anterior, hasta donde es insertada en una fosa profunda (Lino-Neto et al., 2000), donde, el núcleo lineal es denso y alargado conteniendo una cromatina compacta.

Por otro lado, el flagelo espermático está formado por un axonema microtubular que está compuesto por dos grandes derivados mitocondriales que son asimétricos en longitud y diámetro situados paralelamente al axonema de todo el flagelo del espermatozoide y dos cuerpos accesorios con estructuras alargadas ubicadas entre el axonema y cada derivado mitocondrial.

1.2.9.1.1 Espermatozoides

Los espermatozoides de zángano se producen en los testículos desde que inicia el estadio larvario hasta la etapa de desarrollo de las pupas (Hoage y Kessel, 1968). Posteriormente, los espermatozoides son transportados a través de los testículos a las vesículas seminales aproximadamente de 3 a 8 días después de la emergencia, donde son almacenados con líquido seminal hasta la eyaculación (Collins et al., 2006).

Además, Colonello y Hartfelder, (2003) mencionan que, 6 días después de la emergencia las glándulas mucosas se llenan de secreciones que consisten en moco y líquido seminal, donde, se considera que durante ese periodo la eyaculación no tiene capacidades

de fertilización (Woyke y Jasinski, 1978), por lo que, necesita de unos días para alcanzar la madurez sexual y adquirir el potencial de fertilización.

Sin embargo, el tiempo que puede alcanzar el zángano en madurar dependerá de la genética y la colonia en que fueron criados (Rhodes et al., 2011). No obstante, el potencial y la calidad de los espermatozoides disminuirá conforme aumenta la edad de los zánganos (Hayashi y Satoh, 2019).

1.2.9.2 Evaluación de las características de una muestra seminal

La evaluación espermática es muy importante para asegurar que se ha obtenido un eyaculado de buena calidad, debido a que nos permite estimar el potencial de fertilidad de cualquier semental, el cual consiste mediante la evaluación de la concentración y motilidad espermática por medio de la observación rápida de una alícuota de semen (Cueto et al., 2016).

Por lo anterior expuesto, se necesita que todo material a ser utilizado para la recolección, debe ser esterilizado y libre de sustancias químicas que puedan contaminar y afectar la calidad del eyaculado (Melling y Alder, 2000). Por consiguiente, es necesario que el material a utilizar se encuentre a 37°C para evitar que los espermatozoides entren en shock térmico (Watson, 1995).

Para realizar la evaluación espermática se necesita colectar el semen y evaluar varios parámetros que pueden ser de carácter macroscópico, como él; color, aspecto, volumen (Cebrián et al., 2010) y microscópicos, como la; Concentración espermática, motilidad espermática, viabilidad, integridad del acrosoma (Ahmad et al., 2014), actividad mitocondrial e integridad de la membrana plasmática de la cola (HOST) (Petrunkina y Harrison, 2011).

1.2.9.2.1 Colecta de semen

En la recolección de semen de zángano se han descrito dos técnicas; la primera es basada en la disección de las vesículas seminales (VS) y la segunda es mediante la inducción en la eyaculación (E). Sin embargo, en los últimos años la principal técnica para la colecta de muestras de semen es la eyaculación inducida por la aplicación de presión sobre el tórax y el abdomen del zángano. El semen se recoge directamente del endofalo evertido a través de un tubo capilar de vidrio el cual se encuentra conectado a una jeringa.

Por otra parte, el porcentaje de viabilidad obtenido en la colecta de semen varía dependiendo la técnica y la edad de los zánganos. En las VS se han reportado porcentajes de viabilidad de 98.1; 96.2 y 98.1 % (Gençer *et al.*, 2014; Rzymiski *et al.*, 2012; Gençer y Kahya, 2011b), mientras que, en la E inducida, Alcay *et al.* (2019); Fisher y Rangel, (2018); Ciereszko *et al.* (2017); Rousseau *et al.* (2015) observaron porcentajes de viabilidad con (86.8; 99.2; 95 y 64.2 %).

Además, Czekońska *et al.* (2015); Rhodes *et al.* (2011); Rousseau y Giovenazzo, (2016); Rousseau *et al.* (2015) demostraron que el porcentaje de viabilidad varía dependiendo de la edad de los zánganos (a los 15 días 80; 21 días 52.8; 25 días 67.6 y a los 35 días 87.8 %). Sin embargo, Rhodes *et al.* (2011), menciona que los resultados de viabilidad pueden ser variables dependiendo la línea genética y condición de la cría.

1.2.9.2.2 Evaluación macroscópica

1.2.9.2.2.1 Volumen de semen

Para determinar el volumen de semen se puede utilizar una jeringa de precisión y/o midiendo la longitud almacenada del tubo capilar. Los zánganos producen aproximadamente 1 μ L de semen con una variación de entre 0.1 y 2.4 μ L (Kairo *et al.*, 2016; Czekońska *et al.*, 2013; Gençer y Kahya, 2011; Rhodes *et al.*, 2011).

No obstante, existen factores que influyen en el volumen del semen por cada zángano, dentro de los cuales se han mencionado; el efecto de la edad, peso corporal, línea genética y/o la línea de reproducción y la estación (Gençer y Kahya, 2011a).

1.2.9.2.3 Evaluación microscópica

1.2.9.2.3.1 Concentración de espermatozoides

La concentración espermática es uno de los parámetros más estudiados en la calidad del semen de zángano, ya que, permite tener una visión sobre el proceso de espermatogénesis y la madurez sexual de los zánganos (Rhodes *et al.*, 2011).

La concentración de espermatozoides del semen de zángano oscila entre 2 y 9 millones de espermatozoides por μ L. No obstante, Gençer y Firatli, (2005); Phiancharoen *et al.* (2004); Schlüns *et al.* (2003) observaron que en semen extraído de las VS la concentración espermática varía en zánganos de 11 a 12 días de edad con un promedio de

7.6 a 12.0 millones de espermatozoides. Por otra parte, la producción de esperma aumenta en la época de otoño especialmente en zánganos de 21 días de edad (Rhodes et al., 2011).

Aunado a lo anterior, la evaluación de concentración espermática también se utiliza para evaluar la calidad reproductiva de la abeja reina, a través, del conteo de número de espermatozoides almacenados en la spermateca (Brutscher et al., 2019; Tarpy et al., 2012).

1.2.9.2.3.2 Motilidad espermática

La motilidad de los espermatozoides es uno de los parámetros más utilizados para evaluar la calidad espermática. En la abeja melífera la motilidad se basa de acuerdo al porcentaje estimado subjetivamente de células móviles (Dadkhah et al., 2016; Alcay et al., 2015) en una escala de 1-4 grados, donde; 4 indica más de un 50% de espermatozoides con movimiento circular y progresivo, 3 indica más de un 50% con movimiento vibratorio, circular y progresivo, 2 indica más del 50 % con movimiento vibratorio, 1 indica menos del 50% con movimiento vibratorio y 0 sin movimiento (Locke y Peng, 1993).

Los espermatozoides de *Apis mellifera* se clasifican como espermatozoides móviles si presentan algún tipo de movimiento activo, libremente móviles si la cabeza del espermatozoide muestra desplazamientos y espermatozoides circulares si la cabeza y la cola de los espermatozoides se superponen (Yániz et al., 2019).

Cabe mencionar, que el patrón de doble movimiento helicoidal de espermatozoides en insectos es una adaptación al movimiento que se genera dentro de los conductos estrechos generando una onda axonémica que actúa contra la pared del conducto en lugar de tener un fluido circundante, lo que conlleva a un movimiento de arrastre en lugar de nadar, lo que conlleva a una vibración (Werner y Simmons, 2008).

1.2.9.2.3.3 Viabilidad de los espermatozoides

La integridad de la membrana plasmática es uno de los parámetros más utilizados para el análisis de semen de *Apis mellifera*, considerándose que, para evaluar el estado de la plasmalema se basa en la permeabilidad de las membranas dañadas en base a diferentes sondas fluorescentes (Chaimanee et al., 2016; Wegener et al., 2014).

El fluorocromo más utilizado para teñir espermatozoides muertos es el yoduro de propidio (PI), el cual pasa a través de las membranas dañadas y se une al ADN emitiendo una fluorescencia roja en el núcleo de los espermatozoides (Silva y Gadella, 2006).

El PI se combina con otro fluorocromo para ver los espermatozoides vivos, como; SYBR14, el cual traspasa las membranas plasmáticas intactas de los espermatozoides vivos uniéndose al ADN emitiendo una fluorescencia de color verde en el núcleo del espermatozoide (Christensen et al., 2004).

1.2.9.2.3.4 Integridad del acrosoma

En el proceso de postura, la abeja reina libera una cantidad mínima de espermatozoides de la espermoteca, que ingresan al ovulo a través de la micropyles donde; la reacción del acrosoma libera enzimas líticas que optimizan la penetración de la membrana vitelina para fertilizar el ovulo. La integridad del acrosoma se analiza por medio de una citometría de flujo, mediante el uso de una lecitina conjugada al Isotiocianato de Fluorescencia (FITC) (Prathalingam *et al.*, 2006).

En *Apis mellifera* generalmente, se utiliza la tinción de lecitina de PSA (*Pisum sativum agglutinin*), que es una proteína de origen vegetal, la cual se une específicamente a las glucoproteínas que se encuentran en la matriz del acrosoma del espermatozoide (Nagy *et al.*, 2003).

Con el fluorocromo PSA, los acrosomas intactos emiten una fluorescencia alta de color verde y los que emiten fluorescencia más baja o en parches de color verde son considerados dañados (Alcay *et al.*, 2019).

1.2.9.2.3.5 Actividad mitocondrial

Las mitocondrias son esenciales en la regulación de la función y la vida útil de los espermatozoides, aportándoles energía para llevar a cabo diferentes funciones, obteniendo ATP a través de las vías de fosforilación glucolítica y oxidativa (Moscatelli et al., 2017), proporcionándole sustratos de energía primaria para el movimiento de los espermatozoides (Dolník et al., 2019).

Para evaluar la funcionalidad de la mitocondria se utiliza el fluorocromo JC-1, el cual, ayuda a diferenciar la actividad respiratoria alta y la actividad respiratoria baja de los

espermatozoides (Martinez-Pastor et al., 2004), penetrando en el interior de las mitocondrias formando agregados intramitocondriales que emiten fluorescencia de color naranja, al contrario, cuando no forma agregados emite una fluorescencia color verde (Celeghini et al., 2010).

1.2.9.2.3.6 Integridad de la membrana plasmática de la cola (HOST)

La prueba de permeabilidad HOST es una técnica que se utiliza para evaluar el enrollamiento de la cola, la cual se encuentra asociada a la acumulación de agua en las membranas plasmáticas intactas de los espermatozoides (Alcay et al., 2019).

Esta prueba es esencial, debido a que, el metabolismo espermático es necesario para la fecundación, ayudando en el transporte y reconocimiento de las moléculas, mediante funciones que permiten la adaptación metabólica del espermatozoide al medio circulante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Guillén et al., 2009).

El espermatozoide al exponerse a la solución (HOST) debido a que la célula está funcionalmente intacta al penetrar el agua se hincha, lo que provoca una curvatura en el flagelo de las células con una membrana íntegra, mientras que los espermatozoides dañados no presentan cambios en la forma del flagelo. Pero, para que esta respuesta produzca un efecto, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y funcionando correctamente con sus mecanismos para el intercambio de fluidos (Pratap et al., 2000).

1.2.10 Control y calidad de abejas reina

1.2.10.1 Producción de abejas reina

La producción estándar de reinas de calidad se lleva a cabo en condiciones controladas a través del empleo de métodos modernos. El método Doolittle es el método estándar más empleado en la cría de reinas (Büchler *et al.*, 2013), el cual tiene, varias ventajas sobre otros, entre los cuales están; la planificación para producir un estándar promedio de reinas utilizando larvas de la misma edad a través de una aplicación fácil y práctica, teniendo todas las etapas bajo control.

1.2.10.1.1 Método Doolittle

Consiste en transferir larvas con menos de un día de nacidas a unas cupulas que simulan las celdas reales donde se cría la reina, estas pueden ser de cera y van adheridas a unos listones con jalea real los cuales se encuentran en un bastidor porta cúpulas (Maddoni et al., 2015). Posteriormente al traslarve se ubica una colonia huérfana (sin reina) provista de abejas jóvenes reforzando las colonias con cuadros de crías operculadas con el propósito de mantener una población con nodrizas abundantes. Para determinar la fecundidad de la reina es necesario evaluar la oviposición.

1.2.10.2 Valoración reproductiva de abejas reina

1.2.10.2.1 Evaluación de fecundidad (número de huevos por día)

Para evaluar la fertilidad de la abeja reina se necesita un periodo de veinticuatro horas ya sea una vez, cuando la puesta de huevos está en su punto máximo o varias veces durante el período productivo. En la época de floración la reina debe poner más de 2,000 huevos en un periodo de 24 horas (Delaplane et al., 2013). Sin embargo, Montesinos, (2018) menciona que la postura diaria de la reina varía en la época de escasa floración. Por lo cual, se le asume una escala de tres niveles de postura diaria promedio (cuadro 1).

Cuadro 1. Escala de postura en época de escasa floración

Escala	Postura	Huevos
1	Poca	225 – 449
2	Regular	450 – 899
3	Abundante	≥ 900

Fuente: Pierre y le Conte, (2007)

1.2.10.2.2 Postura, cría abierta, cría operculada y solidez de cría

Se calcula las variables de oviposición para ver la calidad reproductiva de la reina y valorar si ha sido fecundada y determinar si es viable. Para calcular los parámetros de oviposición se emplea un marco de cuadros con una dimensión de 5x5 cm.

Para analizar la postura se elige un bastidor de la parte central de la colmena, teniendo en cuenta que la reina empieza su postura del centro hacia los laterales (Delaplane

et al., 2013). Posteriormente, mediante los parámetros mencionados por Pierre y le Conte, (2007) se cuenta el número de huevos ovipositados por la reina, realizando la estimación de postura en una escala de 1-3 agrupando los huevos menores de 3 días.

Para la estimación de cría abierta se realiza un conteo de larvas después de tres días de haber eclosionado el huevo, realizando una inspección previa, con la cual se buscará utilizar únicamente las larvas sanas, con un color nacarado. Para la estimación de cría operculada se divide el número de huevos puestos al inicio entre el número de celdas operculadas. La solidez de cría se expresa por el porcentaje de celdas de obreras vacías en un parche de cría de un área determinada, tomando en cuenta que el nivel aceptable de celdas vacías suele ser inferior al 10% (Delaplane et al., 2013).

1.3 HIPÓTESIS

La disponibilidad de los recursos apibotánicos en las diferentes épocas del año repercuten en la diversidad genética de los zánganos y su calidad espermática, la cual a su vez reduce un 15% la prolificidad de las abejas reinas fecundadas.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la época del año sobre la calidad seminal, diversidad genética de zánganos (*Apis mellifera*) y su impacto en la prolificidad de la abeja reina.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la calidad seminal de la espermateca en abejas reinas fecundadas natural e instrumentalmente en diferentes épocas del año.
2. Establecer la diversidad genética del semen almacenado en la espermateca de reinas fecundadas naturalmente en diferentes épocas del año mediante la identificación de múltiple paternidad.
3. Comparar la prolificidad de las reinas fecundadas naturalmente e inseminadas instrumentalmente en diferentes épocas del año.
4. Determinar el efecto de la diversidad del polen y la composición del pan de abeja en diferentes épocas del año sobre los parámetros reproductivos de la abeja reina y el zángano.

1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1.5.1 Diagrama del Procedimiento



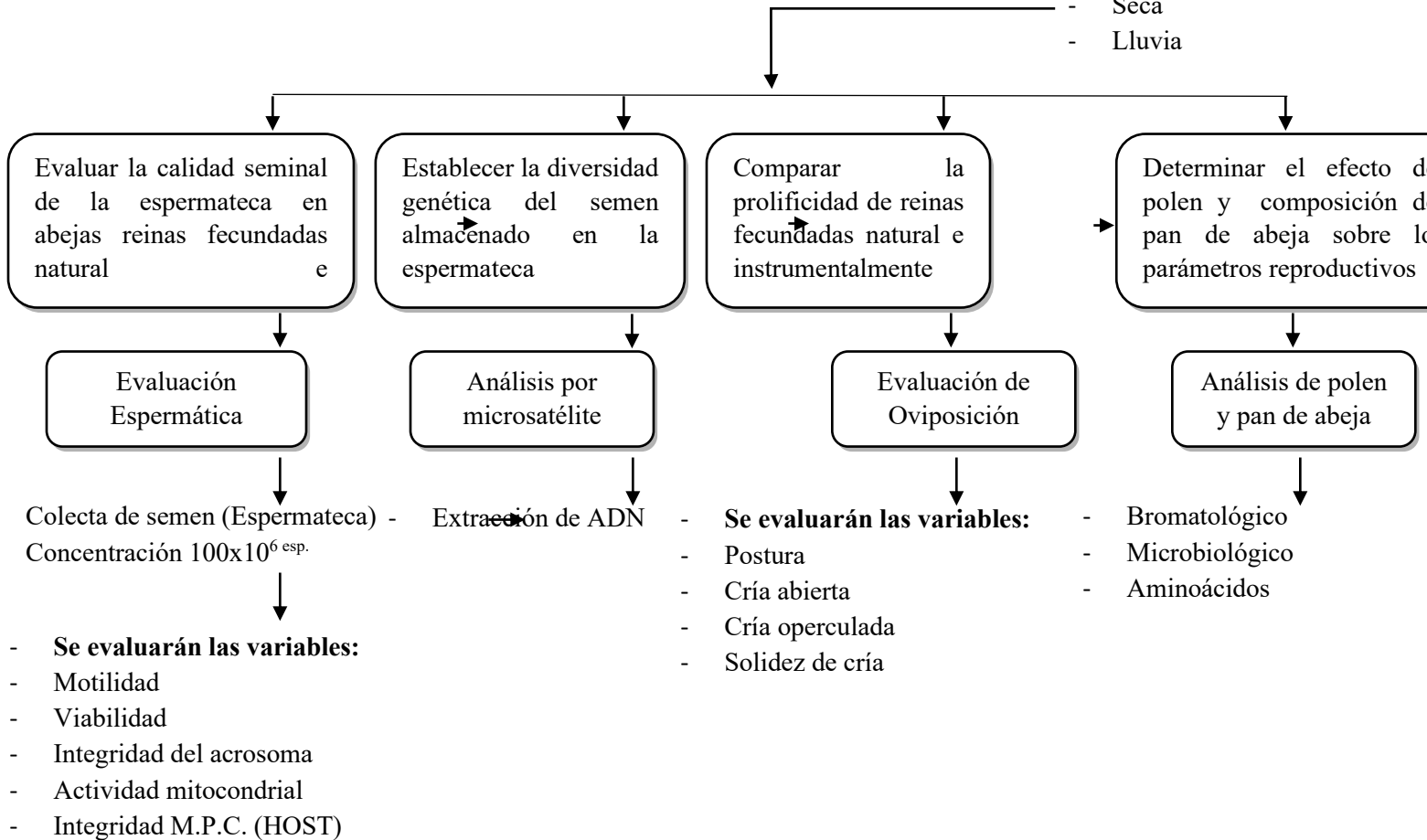
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
- Campo experimental Mocochoá, Mérida, Yucatán

Animales
de estudio

- 10 colmenas (reinas fecundadas naturalmente)
- 10 colmenas (reinas fecundadas instrumentalmente)

- **5 colmenas por tratamiento:**
- (T_{1FN}) con alimento
- (T_{1FN}) sin alimento
- (T_{1FI}) con alimento
- (T_{1FI}) sin alimento

- **Se evaluará en época de:**
- Seca
- Lluvia



1.6 LITERATURA CITADA

- Agüero, J.I., Rollin, O., Torreta, J.P., Aizen, M.A., Requier, F., y Garibaldi, L.A. (2018). Impactos de la abeja melífera sobre plantas y abejas silvestres en hábitats naturales. *Ecosistemas*, 27(2), 60–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.7818/ECOS.1365>
- Ahmad, M., Nasrullah, R., Riaz, H., Sattar, A., y Ahmad, N. (2014). Changes in motility, morphology, plasma membrane and acrosome integrity during stages of cryopreservation of buck sperm. In *Journal of the South African Veterinary Association* (Vol. 85). <https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.972>
- Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Mulkpınar, E., Gokce, E., Ustuner, B. *et al.* (2019). Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, 87, 28–31.
- Alcay, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Cakmak, S., y Nur, Z. (2015). *Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality*.
- Al-Sarhan, R., Adgaba, N., Tadesse, Y., Alattal, Y., Al-Abbadi, A., Single, A., y Al-Ghamdi, A. (2019). Reproductive biology and morphology of *Apis mellifera jemenitica* (Apidae) queens and drones. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1581–1586. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.012>
- Argüello Najera, O. (2010). *Guía Práctica sobre Manejo Técnico de Colmenas* (2nd.).
- Baer, B. (2005). Sexual selection in *Apis* bees. *Apidologie*, 36(2), 187–200. <https://doi.org/10.1051/apido:2005013>
- Baer, B., Collins, J., Maalaps, K., y den Boer, S.P. (2016). Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2877–2885.
- Barrera, A. (2004). *Manual de cría de Abejas reinas. Programa Nacional para el Control de la Abeja Africanizada*. (pp. 6–8).
- Barrios Rivera, D.V. (2012). *Relación entre la generación genética (F1, F2) de abejas reina (Apis mellifera, Apidae), su resistencia al ataque del ácaro (Varroa destructor, Acarina Oud.) y su efecto sobre la producción de miel*. Universidad Rafael Landívar.
- Barth, O., Munhoz, M.C., y Luz, C. (2009). Botanical origin of *Apis* pollen loads using colour, weight and pollen morphology data. *Acta Alimentaria*, 38, 133–139. <https://doi.org/10.1556/AAlim.2008.0026>
- Baudry, E., Solignac, M., Garnery, L., Gries, M., Cornuet, J., y Koeniger, N. (1998). Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1409), 2009–2014.
- Boes, K.E. (2010). Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: an interplay of queen and worker decisions. *Insectes Sociaux*, 57(1), 1–9.

- Brutscher, L.M., Baer, B., y Niño, E.L. (2019). Putative Drone Copulation Factors Regulating Honey Bee (*Apis mellifera*) Queen Reproduction and Health: A Review. *Insects*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.3390/insects10010008>
- Büchler, R., Andonov, S., Bienefeld, K., Costa, C., Hatjina, F., Kezic, N. *et al.* (2013). Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–30.
- Carvalho Celeghini, E.C., Nascimento, J., Raphael, C.F., de Andrade, A., y Arruda, R. (2010). Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62, 536–543. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000300006>
- Castañón Chavarria, E.J. (2009). *Mieles diferenciadas de la península de Yucatán* (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Corredor Biológico Mesoamericano, Ed.; p. 157).
- Cebrián, P., Muiño, M., Perez, R., Casao, G., y Palacios, R. (2010). Manejo del semen e inseminación artificial. In M. Abecia y M. Forcada (Eds.), *Manejo reproductivo en ganado ovino*. (pp. 113–144). Serevt.
- Cetzal-Ix, W., Noguera-Savelli, E., y Martínez-Puc, J. (2019). Flora melífera de la península de Yucatán, México: Estrategia para incrementar la producción de miel en los periodos de escasez de alimento de *Apis mellifera* L. *Desde El Herbario CICY*, 172–179.
- Chaimanee, V., Evans, J.D., Chen, Y., Jackson, C., y Pettis, J.S. (2016). Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology*, 89, 1–8.
- Christensen, P., Stenvang, J.P., y Godfrey, W.L. (2004). A Flow Cytometric Method for Rapid Determination of Sperm Concentration and Viability in Mammalian and Avian Semen. *Journal of Andrology*, 25(2), 255–264. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02786.x](https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02786.x)
- Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G.J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S., y Karol, H. (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48(2), 211–222.
- Cobey, S.W. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38(4), 390–410.
- Collins, A.M., Caperna, T.J., Williams, V., Garrett, W.M., y Evans, J.D. (2006). Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 541–549.
- Colonello, N.A., y Hartfelder, K. (2003). Protein content and pattern during mucus gland maturation and its ecdysteroid control in honey bee drones. *Apidologie*, 34(3), 257–267.

- Colonello, N.A., y Hartfelder, K. (2005). She's my girl - male accessory gland products and their function in the reproductive biology of social bees. *Apidologie*, 36(2), 231–244. <https://doi.org/10.1051/apido:2005012>
- CONABIO. (2009). *Mieles peninsulares y diversidad: Campeche, Quintana Roo y Yucatán*. (3ra.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Corredor Biológico Mesoamericano.
- Corona, M., y Robinson, G.E. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687–701.
- Couvillon, M.J., Hughes, W.O., Perez-Sato, J.A., Martin, S.J., Roy, G.F., y Ratnieks, F.L. (2010). Sexual selection in honey bees: colony variation and the importance of size in male mating success. *Behavioral Ecology*, 21(3), 520–525.
- Cueto, M., Gibbons, A., Macarena, M., Galarraga, B., y Fernández, J. (2016). *Procesamiento y conservacion: Manual de obtención y procesamiento*. 2ª. Edición. INTA Ediciones.
- Culley, T., Weller, S., y Sakai, A. (2002). The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 361–369.
- Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., y Chorbiński, P. (2013). The influence of honey bee (*Apis mellifera*) drone age on volume of semen and viability of spermatozoa. *Journal of Apicultural Science*, 57(1), 61–66.
- Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., y Samborski, J. (2015). Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie*, 46(1), 1–9.
- Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M., y Hopkins, B.K. (2016). Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 279–283. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243292>
- Delaney, D.A., Keller, J.J., Caren, J.R., y Tarpy, D.R. (2011). The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 42(1), 1–13.
- Delaplane, K.S., van der Steen, J., y Guzman-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–12. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>
- Dolník, M., Mudroňová, D., Pošivák, J., Lazar, G., y Mudroň, P. (2019). Flow cytometry in assessment of sperm integrity and functionality—a review. *Acta Veterinaria Brno*, 88(2), 169–175.
- Dorado, J., y Vázquez, D.P. (2016). Flower diversity and bee reproduction in an arid ecosystem. *PeerJ*, 4, e2250–e2250. <https://doi.org/10.7717/peerj.2250>
- Echazarreta, C.M., Quezada-Euán, J.G., Medina, L.M., y Pasteur, K.L. (1997). Beekeeping in the Yucatan peninsula: development and current status. *Bee World*, 78(3), 115–127. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1997.11099346>

- Ellis, J., Lawrence, J.C., Koeniger, N., y Koeniger, G. (2015). *Mating Biology of Honey Bees (Apis mellifera)*. Wicwas Press: Kalamazoo, MI, USA.
- Estoup, A., Solignac, M., y Cornuet, J.M. (1994). Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 258(1351), 1–7.
- Fisher, A., y Rangel, J. (2018). Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. *PLoS One*, 13(12), e0208630.
- Flores, G., y Vermont, R. (2011). La vegetación de la península de Yucatán y su miel, en: In G. del E. del E. de Y. Secretaría de Educación (Ed.), *La miel y las abejas: el dulce convenio del Mayab* (1st ed., pp. 33–46).
- Gemeda, T.K., Li, J., Luo, S., Yang, H., Jin, T., Huang, J., y Wu, J. (2018). Pollen trapping and sugar syrup feeding of honey bee (Hymenoptera: Apidae) enhance pollen collection of less preferred flowers. *PLOS ONE*, 13(9), e0203648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203648>
- Gençer, H.V., y Firatli, Ç. (2005). Reproductive and morphological comparisons of drones reared in queenright and laying worker colonies. *Journal of Apicultural Research*, 44(4), 163–167. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101172>
- Gençer, H.V., y Kahya, Y. (2011a). Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *Journal of Apicultural Research*, 50(2), 130–137.
- Gençer, H.V., y Kahya, Y. (2011b). The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *Journal of Apicultural Research*, 50(3), 190–194.
- Gençer, H.V., Kahya, Y., y Woyke, J. (2014). Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. *Apidologie*, 45(6), 757–770.
- Giannini, T., Garibaldi, L., Acosta, A.L., Silva, J., Maia, K., Saraiva, A. *et al.* (2015). Native and Non-Native Supergeneralist Bee Species Have Different Effects on Plant-Bee Networks. *PloS One*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137198>
- Godoy, M. (1999). Apicultura yucateca e identidad de la investigación en la Universidad autónoma de Yucatán. *En Memorias Del Foro de Proyectos Integrales: Sistema Producto Miel. SISIERRA/UADY*, 12–13.
- Goins, A., y Schneider, S.S. (2013). Drone “quality” and caste interactions in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Insectes Sociaux*, 60(4), 453–461.
- Gonzalez, A.N., Ing, N., y Rangel, J. (2018). Upregulation of antioxidant genes in the spermathecae of honey bee (*Apis mellifera*) queens after mating. *Apidologie*, 49(2), 224–234. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0546-y>

- González-Acereto, J.A., y Quezada-Euán, J. (2010). Producción tradicional de miel: abejas nativas sin aguijón (trigonas y meliponas). *Biodiversidad y Desarrollo Humano En Yucatán : Uso de La Flora y Fauna Silvestre*, 382–384.
- Gorshkov, V., Blenau, W., Koeniger, G., Römpf, A., Vilcinskas, A., y Spengler, B. (2015). Protein and peptide composition of male accessory glands of *Apis mellifera* drones investigated by mass spectrometry. *PLoS One*, 10(5), e0125068.
- Güemes Ricalde, F.J., Echazarreta González, C., Villaneueva, G.R., Pat Fernández, J.M., y Gómez Alvarez, R. (2003). La apicultura en la península de Yucatán. *Revista Mexicana Del Caribe*, 8(16), 117–132. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-mexicana-del-caribe/articulo/la-apicultura-en-la-peninsula-de-yucatan>
- Gillard, T.L., y Oldroyd, B.P. (2020). Controlled reproduction in the honey bee (*Apis mellifera*) via artificial insemination (pp. 1–42). <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2020.08.001>
- Guillén, J., Quintero-Moreno, A., y Gonzalez, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica*, 19, 382–389.
- Guler, A., y Alpaya, H. (2005). Reproductive characteristics of some honeybee (*Apis mellifera* L.) genotypes. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(10), 864–870.
- Guzmán-Novoa, E. (2003). *Manual para la cría de abejas reinas. Programa Nacional de Apicultura del Inifap, Sagarpa*. (pp. 4–5).
- Hatjina, F., Bieńkowska, M., Charistos, L., Chlebo, R., Costa, C., Dražić, M.M. *et al.* (2014). A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *Journal of Apicultural Research*, 53(3), 337–363.
- Hayashi, S., y Satoh, T. (2019). Sperm maturation process occurs in the seminal vesicle following sperm transition from testis in honey bee males. *Apidologie*, 50(3), 369–378.
- Hayworth, M.K., Johnson, N.G., Wilhelm, M.E., Gove, R.P., Metheny, J.D., y Rueppell, O. (2009). Added Weights Lead to Reduced Flight Behavior and Mating Success in Polyandrous Honey Bee Queens (*Apis mellifera*). *Ethology*, 115(7), 698–706. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2009.01655.x>
- Hill, S.M., Wells, P.H., y Wells, H. (1997). Spontaneous flower constancy and learning in honey bees as a function of colour. *Animal Behaviour*, 54(3), 615–627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0467>
- Hoage, T.R., y Kessel, R.G. (1968). An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. *Journal of Ultrastructure Research*, 24(1), 6–32. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(68\)80014-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5320(68)80014-0)

- Grassnigg, N., y Crailsheim, K. (2005). Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 36(2), 255–277. <https://doi.org/10.1051/apido:2005015>
- Jiménez-Reyes, N., y Morales-Rodríguez, V. (2005). Resultados preliminares del análisis polínico de una muestra de miel del apiario del centro universitario de ciencias biológicas y agropecuarias. In *Avances de la Investigación Científica en el CUCBA* (pp. 315–318).
- Judd, H.J., Huntzinger, C., Ramirez, R., y Strange, J.P. (2020). A 3D Printed Pollen Trap for Bumble Bee (*Bombus*) Hive Entrances. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 161. <https://doi.org/10.3791/61500>
- Kahya, Y., Gençer, H.V., y Woyke, J. (2008). Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 118–125.
- Kaya, A., y Uysal, O. (2023). In vitro spermatological parameters in drones. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 23(2), 268–279. <https://doi.org/10.31467/uluaricilik.1279779>
- Kairo, G., Provost, B., Tchamitchian, S., ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Cousin, M. *et al.* (2016). Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12.
- Klowden, M. (2013). *Physiological Systems in Insects* (3a.).
- Koeniger, G., Koeniger, N., Jamie, E., y Lawrence, C. (2014). *Mating Biology of Honey Bees (Apis mellifera)*.
- Koeniger, N., y Koeniger, G. (2007). Mating flight duration of *Apis mellifera* queens: As short as possible, as long as necessary. *Apidologie*, 38(6), 606–611.
- Kuhlmann, M., Guo, D., Veldtman, R., y Donaldson, J. (2012). Consequences of warming up a hotspot: species range shifts within a centre of bee diversity. *Diversity and Distributions*, 18(9), 885–897. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00877.x>
- Kumar, R., Mishra, R.C., y Agrawal, O.P. (2013). A Study on Consumption of some artificial diet formulations by *Apis mellifera* colonies maintained at Panchkula y Gwalior. *J Entomol Res*, 37(2), 123–127.
- Kumari, I., y Kumar, R. (2020). Pollen substitute diet for *apis mellifera*: Consumption and effects on colony parameters in sub-tropical himalaya. *Indian Journal of Agricultural Research*, 54(2), 147–153.
- Laidlaw, H.H., y Page, R.E. (1997). *Queen rearing and bee breeding*. Wicwas Press.
- Laidlaw Jr, H.H., y Page Jr, R.E. (1984). Polyandry in honey bees (*Apis mellifera* L.): sperm utilization and intracolony genetic relationships. *Genetics*, 108(4), 985–997.
- Lensky, Y., y Demter, M. (1985). Mating flights of the queen honeybee (*Apis mellifera*) in a subtropical climate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 81(2), 229–241.

- Lino-Neto, J., Báó, S.N., y Dolder, H. (2000). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*)(L)(Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue and Cell*, 32(4), 322–327.
- Locke, S.J., y Peng, Y.S. (1993). The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiological Entomology*, 18(2), 144–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00461.x>
- Maddoni, J., Luisa, N., y Gonzalez, B. (2015). Todo sobre cría de abejas reinas. *Apicultura Sin Fronteras*, 22.
- Magaña, M.A., Tavera Cortés, M.E., Salazar Barrientos, L.L., y Sanginés García, J.R. (2016). Productividad de la apicultura en México y su impacto sobre la rentabilidad . In *Revista mexicana de ciencias agrícolas* (Vol. 7, pp. 1103–1115). scielomx .
- Martinez-Pastor, F., Johannisson, A., Gil, J., Kaabi, M., Anel, L., Paz, P., y Rodriguez-Martinez, H. (2004). Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 84(1), 121–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.006>
- Mattila, H., y Seeley, T. (2007). Genetic Diversity in Honey Bee Colonies Enhances Productivity and Fitness. *Science*, 317(5836), 362–364. <https://doi.org/10.1126/science.1143046>
- Maucourt, S., Rousseau, A., Fortin, F., Robert, C., y Giovenazzo, P. (2023). Observation of Genetic Gain with Instrumental Insemination of Honeybee Queens. *Insects*, 14(3), 301. <https://doi.org/10.3390/insects14030301>
- Melling, M., y Alder, M. (2000). *Práctica ovina y caprina* (M. Melling y M. Alder, Eds.). Inter-Médica.
- Montesinos, P. (2018, May 24). *Valoración reproductiva de las reinas*. <https://www.agromeat.com/240797/Valoracion-Reproductiva-de-Las-Reinas>.
- Moscattelli, N., Spagnolo, B., Pisanello, M., Lemma, E.D., de Vittorio, M., Zara, V. *et al.* (2017). Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E.K., y Gadella, B.M. (2003). A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles1. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1828–1835. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011445>
- Nelson, D.L. (1989). Assessment of queen quality in honey bee queens, *Can. Beekeeper*, 14, 207–208.
- Orr, T.J., y Zuk, M. (2012). Sperm storage. *Current Biology*, 22(1), R8–R10.

- Page, E.J., y Peng, C.Y. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36(4–6), 695–711. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00236-9)
- Paray, B.A., Kumari, I., Hajam, Y.A., Sharma, B., Kumar, R., Albeshr, M.F. *et al.* (2021). Honeybee nutrition and pollen substitutes: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 1167–1176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.053>
- Pascini, T.V., Ramalho-Ortigão, M., y Martins, G.F. (2012). Morphological and morphometrical assessment of spermathecae of *Aedes aegypti* females. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 705–712.
- Pascini, T., y Martins, G.F. (2017). The insect spermatheca: an overview. *Zoology*, 121, 56–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.12.001>
- Paynter, E., Millar, A.H., Welch, M., Baer-Imhoof, B., Cao, D., y Baer, B. (2017). Insights into the molecular basis of long-term storage and survival of sperm in the honeybee (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, 7(1), 1–9.
- Peng, C.Y., Yin, C., y Yin, R.S. (1993). Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiological Entomology*, 18(1), 93–101.
- Petanidou, T., Kallimanis, A.S., Sgardelis, S.P., Mazaris, A.D., Pantis, J.D., y Waser, N.M. (2014). Variable flowering phenology and pollinator use in a community suggest future phenological mismatch. *Acta Oecologica*, 59, 104–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actao.2014.06.001>
- Petrunkina, A., y Harrison, R. (2011). Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(5), 338–348. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21044>
- Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N., y Koeniger, G. (2004). Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero- and conspecific spermatozoa results in different sperm survival. *Apidologie*, 35(5), 503–511.
- Pierre, J.P., y le Conte, Y. (2007). *Apicultura: Conocimiento de la Abeja. Manejo de la colmena*. (4a.).
- Pratap, N., Reddy, V., Sarma, P., y Honnappa, T. (2000). Employment of the hypoosmotic swelling test (HOST) to evaluate sperm membrane integrity of fresh and frozen buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Buffalo Journal*, 16(2), 207–213.
- Prathalingam, N.S., Holt, W., Revell, S.G., Jones, S., y Watson, P.F. (2006). Dilution of spermatozoa results in improved viability following a 24h storage period but decreased acrosome integrity following cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 91(1), 11–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.03.016>

- Ramos-Díaz, A., Noriega-Trejo, R., Sánchez-Contreras, Á., San Román-Avila, D., Góngora-Chin, R., y Rodríguez-Buenfil, I. (2015). *Catálogo de los principales tipos polínicos encontrados en las mieles producidas en la Península de Yucatán*. (pp. 28–94).
- Ratnieks, L.W., y Nowogrodzki, R. (1988). *Small-scale queen rearing by beekeepers in the Northeast*.
- Reyes, M., Crauser, D., Prado, A., y le Conte, Y. (2019). Flight activity of honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Apidologie*, 50(5), 669–680. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00677-w>
- Rhodes, J.W., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D.L., y Wheen, G. (2011). Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, 42(1), 29–38.
- Rousseau, A., Fournier, V., y Giovenazzo, P. (2015a). *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *The Canadian Entomologist*, 147(6), 702–711.
- Rousseau, A., y Giovenazzo, P. (2016). Optimizing drone fertility with spring nutritional supplements to honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*, 109(3), 1009–1014.
- Rzyski, P., Langowska, A., Fliszkiewicz, M., Poniedziałek, B., Karczewski, J., y Wiktorowicz, K. (2012). Flow cytometry as an estimation tool for honey bee sperm viability. *Theriogenology*, 77(8), 1642–1647.
- Saffari, A.M., Kevan, P.G., y Atkinson, J.L. (2004). A promising pollen substitute for honey bees. *American Bee Journal*, 144(3), 230–231.
- Schlüns, H., Moritz, F.A., Neumann, P., Kryger, P., y Koeniger, G. (2005). Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behaviour*, 70(1), 125–131.
- Schluns, H., Moritz, F.A., Neumann, P., Kryger, P., y Koeniger, G. (2005). Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behaviour*, 70(1), 125–131.
- Schlüns, H., Schlüns, E.A., van Praagh, J., y Moritz, F.A. (2003). Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*, 34(6), 577–584.
- Schweiger, O., Biesmeijer, J.C., Bommarco, R., Hickler, T., Hulme, P.E., Klotz, S. *et al.* (2010). Multiple stressors on biotic interactions: how climate change and alien species interact to affect pollination. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 85(4), 777–795. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00125.x>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2021). *Avance comparativo por producto de la producción pecuaria*. http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecCompaEspProd.jsp

- Silva, F.N., y Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958–978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Simeunovic, P., Lakic, N., Radovic, I., Sokovic, M., y Griensven, L. (2018). The effect of *Agaricus brasiliensis* extract supplementation on honey bee colonies. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 219–229.
- Stoner, K.A., Cowles, R.S., Nurse, A., y Eitzer, B.D. (2019). Tracking Pesticide Residues to a Plant Genus Using Palynology in Pollen Trapped from Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) at Ornamental Plant Nurseries. *Environmental Entomology*, 48(2), 351–362. <https://doi.org/10.1093/ee/nvz007>
- Tapia-González, J., León-Mantecón, T., Contreras-Escareño, F., Macias-Macias, J., Tapia-Rivera, J., y Guzmán-Novoa, E. (2021). Influencias climáticas, regionales y cantidad de cría en el comportamiento higiénico de *Apis mellifera*. *Abanico Veterinario*, 11, 1–16. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.20>
- Tarpy, D.R., Keller, J.J., Caren, J.R., y Delaney, D.A. (2012). Assessing the mating ‘health’ of commercial honey bee queens. *Journal of Economic Entomology*, 105(1), 20–25.
- Tarpy, D.R., Nielsen, R., y Nielsen, D.I. (2004). A scientific note on the revised estimates of effective paternity frequency in *Apis*. *Insectes Sociaux*, 51(2), 203–204.
- Thomson, J.D. (2010). Flowering phenology, fruiting success and progressive deterioration of pollination in an early-flowering geophyte. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1555), 3187–3199. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0115>
- Valega, O. (2007). *Cría de Reinas: “Apícola Don Guillermo”* (p. 28).
- Villanueva-Gutiérrez, R., Moguel-Ordóñez, Y.B., Echazarreta-González, C.M., y Arana-López, G. (2009). Monofloral honeys in the Yucatán Peninsula, Mexico. *Grana*, 48(3), 214–223. <https://doi.org/10.1080/00173130902929203>
- Watson, P. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7(4), 871–891.
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., y Bienefeld, K. (2014). A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, 69(2), 236–242.
- Weidenmüller, A., y Tautz, J. (2002). In-Hive Behavior of Pollen Foragers (*Apis mellifera*) in Honey Bee Colonies Under Conditions of High and Low Pollen Need. *Ethology*, 108(3), 205–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2002.00759.x>
- Werner, M., y Simmons, L.W. (2008). Insect Sperm Motility. *Biological Reviews*, 83(2), 191–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00039.x>

- Wijayati, N., Hardjono, D.S., Rahmawati, M., y Kurniawati, A. (2019). Formulation of winged bean seeds as pollen substitute for outgrowth of honey bees (*Apis mellifera* L). *Journal of Physics: Conference Series*, 1321(2), 022040.
- Winston, M.L., Higo, H.A., Colley, S.J., Pankiw, T., y Slessor, K.N. (1991). The role of queen mandibular pheromone and colony congestion in honey bee (*Apis mellifera* L.) reproductive swarming (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 4(5), 649–660. <https://doi.org/10.1007/BF01048076>
- Withrow, J.M., y Tarpy, D.R. (2018). Cryptic “royal” subfamilies in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *PLoS One*, 13(7), e0199124.
- Woyke, J., y Jasinski, Z. (1978). Influence of age of drones on the results of instrumental insemination of honeybee queens. *Apidologie*, 9(3), 203–212.
- Woyke, J., y Ruttner, F. (1958). An anatomical study of the mating process in the honeybee. *Bee World*, 39(1), 3–18.
- Woyke, J., y Skowronek, W. (1974). Spermatogenesis in diploid drones of the honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 13(3), 183–190.
- Yániz, J., Palacín, I., y Santolaria, P. (2019). Effect of chamber characteristics, incubation, and diluent on motility of honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm. *Apidologie*, 50(4), 472–481. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00659-y>

Effect of flowering period on reproductive parameters in drones (*Apis mellifera* L.)

Carlos Castellanos-Zacarías¹, Álvaro Domínguez-Rebolledo², Henry Loeza-Concha³, Jorge Vivas-Rodríguez², Julio Ramón-Ugalde¹, Juan Baeza-Rodríguez^{2*}, Roberto Zamora-Bustillos^{1*}

¹ TecNM/Instituto Tecnológico de Conkal, Av. Tecnológico S/N, Conkal 97345, Yucatán, México.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mucuchá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mucuchá, Yucatán, México.

³ Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Carretera Huitichén-Edzná. Km 17.5, C.P. 24450. Huitichén, Campeche, México.

* Correspondence: roberto.zb@conkal.tecnm.mx

(Publicado en Insects 2024; Doi: 10.3390/insects15090676)

Simple summary: In the Yucatan peninsula, the availability and diversity of plants as food sources for bees varies throughout the year which impacts the drones diet during the larval phase, compromising the development of their reproductive organs. We evaluated the eversion of the copulatory apparatus, ejaculation and sperm quality of drones bred during the flowering shortage period (November-December) and flowering onset (January-February). It was observed that during the flowering period, more drones had a full eversion of the copulatory apparatus, with better ejaculation and sperm quality, than those bred during the period of flowering shortage.

Abstract: Insufficient protein intake during the larval phase of drones affects the development of reproductive organs and spermatogenesis. In this study, reproductive parameters such as the eversion capacity of the copulatory apparatus, ejaculation and sperm quality of drones were evaluated during the period of scarcity and flowering. To stimulate drone breeding during the scarcity flowering period, 1 L of sugar syrup was supplied weekly to the hives along with a protein supplement made of 20% pollen and 80% brewer's yeast. During this period and the onset of flowering, 800 drones were collected (200 per month). At the onset of flowering, 270 drones showed eversion of the copulatory apparatus, of which 162 ejaculated, compared to the lean period where 112 drones showed eversion

of the copulatory apparatus, and 39 drones ejaculated. Sperm parameters such as 34
volume, concentration, motility, viability, acrosome integrity and mitochondrial 35
activity were higher compared to the period of scarcity. In conclusion, we ob- 36
served a greater number of drones with eversion of the copulatory apparatus and 37
ejaculation, as well as a better sperm quality with the drones bred during the pe- 38
riod of onset of flowering. 39

Keywords: *Apis mellifera*; drones; copulatory apparatus; sperm parameters; se- 40
men 41

ACTA VETERINARIA EURASIA

Formerly Journal of the Faculty of Veterinary Medicine Istanbul University
Official Journal of Istanbul University-Cerrahösa Faculty of Veterinary Medicine

Queen bee (*Apis mellifera* L.) production using grafting method and non-grafting system

Journal:	<i>Acta Veterinaria Eurasia</i>
Manuscript ID	Under review
Manuscript Type:	Original Article
Keywords:	<i>Apis mellifera</i> , queen bees, queen rearing

SCHOLARONE™
Manuscripts

Queen bee (*Apis mellifera* L.) production using grafting method and non-grafting system

What is already known on this topic?

The standards for queen rearing have primarily been based on studies conducted with European bees. These standards establish quality parameters that have been widely employed in apiculture; however, they do not necessarily reflect the characteristics of Africanized bees, which predominate in certain regions.

What this study adds on this topic?

This study proves that significant differences exist between European and Africanized bees regarding the parameters used to classify queen quality. This underscores the need to optimize and adapt the selection and rearing criteria to local conditions, potentially improving the efficiency and success of queen production in regions where Africanized bees are predominant.

ABSTRACT

Currently, most beekeepers replace queens artificially by employing selection and genetic improvement through methods (grafting) or systems (non-grafting) to achieve higher yield and productivity in colonies. However, there is a lack of information regarding the acceptance and oviposition rates of queens reared by both methods in the tropical region. The study aimed to evaluate the effect of queen bee rearing methods, non-grafting (Nicot), and grafting (Doolittle) on the reproductive phenotypic characteristics of *Apis mellifera* L. A completely randomized design was used to evaluate six colonies with two rearing methods for queen bee production with three replicates per method from October to December 2024. Colonies were supplemented with 1 L of sugar syrup and 50 g of a protein supplement in paste form. The results showed that the Doolittle method was superior ($P<0.001$) in larval acceptance, queen cell size, emerged queens, weight and laying, compared to the Nicot system. In conclusion, the Doolittle method proved more effective in queen bee rearing, optimizing parameters such as weight and larval acceptance. These findings underscore the importance of adapting beekeeping strategies to environmental conditions, including implementing supplemental feeding to ensure productivity and quality in queen bee rearing.

Keywords: *Apis mellifera*, queen bees, queen rearing, Doolittle method, Nicot system.

**CAPITULO IV. RENDIMIENTO REPRODUCTIVO Y CALIDAD ESPERMÁTICA
EN ESPERMATECAS DE REINAS (*Apis mellifera*) FECUNDADAS
NATURALMENTE E INSTRUMENTALMENTE EN DOS TEMPORADAS
CONTRASTANTES**

Estudiante: Carlos Adolfo Castellanos Zacarías

e-mail: DD18800307@conkal.tecnm.mx

Director de tesis: Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde

e-mail: julio.ru@conkal.tecnm.mx

(En proceso de envío en Journal Apicultural Research)

RESUMEN

La capacidad reproductiva de las reinas de *Apis mellifera* está determinada por su tasa de oviposición y la calidad del semen almacenado en la espermateca, parámetros influenciados tanto por el método de fecundación como por la disponibilidad de recursos florales. En este estudio se evaluó la producción de reinas, productividad ovipositoria, desarrollo ontogénico de la cría y la calidad espermática del semen almacenado en espermatecas de reinas fecundadas naturalmente e inseminadas instrumentalmente, en dos temporadas contrastantes (escasez vs floración). Se utilizó un diseño factorial 2×2, con 24 reinas (n=6 por tratamiento), criadas mediante el método Doolittle a partir de larvas de 24–48 h. Se evaluó la aceptación de larvas, longitud de celda real, porcentaje de emergencia y peso al nacer. El rendimiento reproductivo se registró durante seis semanas utilizando marcos de acetato de 5×5 cm. La calidad espermática fue evaluada mediante disección de espermatecas, determinando el volumen, la motilidad (microscopía de contraste de fases), la viabilidad, la integridad del acrosoma y la actividad mitocondrial (microscopía de fluorescencia). Los resultados mostraron una mayor aceptación larval y peso de la reina al inicio de la floración ($P < 0.001$). En condiciones de escasez floral, las reinas inseminadas mostraron mayor postura y volumen seminal que las fecundadas naturalmente ($P < 0.05$), sin diferencias en calidad espermática. Por el contrario, durante la floración, las reinas fecundadas naturalmente

exhibieron mayor motilidad espermática y rendimiento ovipositorio ($P < 0.05$). Estos hallazgos demuestran que la fecundación natural optimiza el rendimiento en épocas favorables, mientras que la inseminación instrumental garantiza resiliencia en condiciones adversas.

Palabras clave: *Apis mellifera*, fecundación, espermateca, floración, oviposición.