Evaluación de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) fecundadas mediante inseminación artificial

Franklin Josué Hercules Flores
Selvin Iván Izaguirre Guzmán

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

Evaluación de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) fecundadas mediante inseminación artificial

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Franklin Josué Hércules Flores
Selvin Iván Izaguirre Guzmán

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Evaluación de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) fecundadas mediante inseminación artificial

Presentado por:

Franklin Josué Hércules Flores
Selvin Iván Izaguirre Guzmán

Aprobado:

Jesús Orozco, Ph.D.
Asesor Principal

Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

Carolina Valladares, M.Sc.
Asesor

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Decano Académico

German Pacheco, Ing.Agr.
Asesor

Evaluación de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) fecundadas mediante inseminación artificial

Franklin Josué Hércules Flores
Selvin Iván Izaguirre Guzmán

Resumen. La inseminación artificial en abejas *Apis mellifera* L. es una técnica que permite controlar el origen genético de los progenitores y las características deseables de la colmena. En este estudio se aplicó esta técnica usando los instrumentos desarrollados por Schley para evaluar la oviposición, cría abierta, evolución de la colmena y pecoreo en abejas reinas inseminadas *versus* abejas reinas fecundadas naturalmente. Para esto, se inseminaron cuatro reinas vírgenes utilizando 15 zánganos por cada reina. Los zánganos fueron obtenidos de colmenas seleccionadas por mansedumbre en uno de los apiarios de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Se seleccionaron ocho colmenas utilizando cuatro colmenas con reinas inseminadas y cuatro colmenas con reinas sin inseminar. La oviposición en reinas inseminadas presentó una postura "regular" de 825 huevos (2.75 en la escala de Montesinos Arraiz), mientras que la oviposición en reinas sin inseminar fue "menor," con una postura de 426 huevos (1.42 en la escala de Montesinos Arraiz), obteniendo una diferencia significativa (P=0.02). En la variable cría abierta, las reinas inseminadas presentaron mejor rendimiento que las reinas sin inseminar con una diferencia de 28.53%. La inseminación artificial permite controlar la cantidad adecuada de semen, mientras que en la fecundación natural no es posible controlar el apareamiento durante el vuelo nupcial. El éxito de la técnica de inseminación artificial depende de las buenas prácticas apícolas aplicadas pre y post inseminación de la reina.

Palabras clave: Abejas, cría abierta, oviposición, Schley.

Abstract. Artificial insemination in bees *Apis mellifera* L. is a technique that allows to control the genetic origin of the progenitors and the desirable characteristics of the hive. In this study, this technique was applied using the instruments developed by Schley to evaluate oviposition, open breeding, hive evolution and pecking in inseminated queen bees versus naturally fecundated queen bees. For this, four virgin queens were inseminated using 15 drones for each queen. The drones were obtained from hives selected for meekness in one of the apiaries of the Pan-American Zamorano Agricultural School. Eight beehives were selected four beehives with inseminated queens and four beehives with queens without insemination. The oviposition in inseminated queens presented a "regular" posture of 825 eggs (2.75 on the scale of Montesinos Arraiz), while the oviposition in queens without insemination was lower with a posture of 426 eggs (1.42 on the Montesinos Arraiz scale), obtaining a significant difference (P=0.02). In the open breeding variable, the inseminated queens presented better performance than the queens without inseminating with a difference of 28.53%. Artificial insemination allows controlling the proper amount of semen, while in natural fertilization it is not possible to control the mating during the nuptial flight. The success of the technique of artificial insemination depends on good beekeeping practices applied pre and post insemination of the queen.

Key words: Bees, open breeding, oviposition, Schley.

CONTENIDO

Portadilla i
Página de firmas ii
Resumen iii
Contenido iv
Índice de Cuadros y Figuras v

1. INTRODUCCIÓN 1

2. METODOLOGÍA 4

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 15

4. CONCLUSIONES 20

5. RECOMENDACIONES 22

6. LITERATURA CITADA 23

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros Página

1. Escala de oviposición para época de escasa floración 13
2. Resultados de la oviposición de las reinas (Escala 1–3) 17
3. Resultados evaluación de cría abierta (%) 18
4. Resultados evolución peso colmena (kg) 19
5. Resultados estimación de la actividad de colonia (abejas/minuto) 19

Figuras Página

1. Determinación del sexo en *Apis mellifera* (Duttmann et al. 2003) 2
2. Equipo de inseminación artificial para abejas reinas modelo Schley 4
3. Proceso de trasvase de larvas de abejas 5
4. Conformación de la colmena iniciadora 6
5. Conformación de la colmena finalizadora 6
6. Enjaulado de las celdas reales 7
7. Distribución de marcos en el banco de reinas 7
8. Colecta de zánganos 8
9. Inmovilización de la reina 8
10. Estimulación de zánganos y extracción de semen 9
11. Regulación del flujo de gas 10
12. Apertura de la cámara copuladora de la abeja reina 10
13. Inseminación de reinas 11
14. Acoplamiento de reinas a colmenas huérfanas 12
15. Alimentación de las colmenas 12
16. Marco con cuadro cuantificando la postura de la reina 13
17. Medición de peso de colmenas 14
18. Extracción de semen 16
19. Celdas con postura de huevo 17
20. Celdas con cría o larvas abiertas 18
21. Actividad de pecoreo 20

1. INTRODUCCIÓN

Los cambios en el uso de la tierra, la modificación en la estructura del paisaje, la agricultura intensiva y la utilización de plaguicidas han causado la fragmentación y degradación del ecosistema (FAO 2016). Durante los últimos años, la desaparición de las abejas se ha convertido en un extraño fenómeno mundial que está repercutiendo de manera negativa, desde el punto de vista ecológico, sobre la diversidad de las especies vegetales, así como económicamente, sobre la productividad de los cultivos y la producción de miel (Valdés 2013).

Debido a la degradación ecológica, la supervivencia y evolución de más del 80% de las especies vegetales del planeta depende de las abejas; cada año, estas polinizan plantaciones con un valor estimado en 40 billones de dólares, lo cual representa más de un tercio de la producción de alimentos en muchos países (Verde 2014). Existen más de 20,000 especies de abejas en el mundo agrupadas en la familia Apidae (Orden Hymenoptera), las cuales se caracterizan por presentar un comportamiento social, establecer colonias y dividir el trabajo de forma especializada (Martínez Morales 2016). *Apis mellifera* L. Es la especie más utilizada para la producción de miel en el mundo.

La apicultura es una actividad importante dentro de la agricultura sostenible, forma parte de la seguridad alimentaria y de los ingresos económicos de muchas familias, especialmente en el área rural (Argüello Nájera 2010). Esta práctica produce beneficios al ecosistema (Barrios Rivera 2012) favoreciendo la polinización de grandes extensiones de cultivos. En Honduras la apicultura se basa específicamente en la producción y comercialización de miel para el consumo interno. Actualmente se estima que el sector apícola cuenta con 3,791 apicultores dedicados a la producción y comercialización de miel (Melchor Rodriguez 2017).

Una colmena de *Apis mellifera* está constituida por tres tipos de individuos separados morfológica y funcionalmente:

- Reina. Es la única hembra fértil de la colmena, encargada de la postura de huevos que constituirán a las nuevas generaciones. Se caracteriza por ser más grande que los zánganos y obreras y poseer un abdomen largo y esbelto.
- Obreras. Son hembras infértiles (sus aparatos reproductores se encuentran atrofiados); su función en la colmena es la recolección de néctar y polen, y la limpieza y cuidado de la colmena (Pierre y Le Conte 2007).
- Zánganos. Son los machos de la colmena, se caracterizan por sus ojos grandes y el abdomen largo y grueso. Su principal función es fecundar a la reina virgen (Fert 2003).

En las abejas (*Apis mellifera*) existen hembras y machos con marcado dimorfismo sexual, es decir presentan particularidades que son características de estos insectos para la determinación del sexo. Cuando la reina pone huevos en celdas de obreras, estos son fecundados y llevan una dotación diploide de cromosomas (32) (Figura 1), resultando hembras, que según la celda en que se críen y la alimentación recibida, serán obreras o reinas (Duttmann *et al.* 2013). Si la puesta tiene lugar en celdas de zánganos, las que son más anchas, estos óvulos no se detienen al nivel del orificio de la espermateca, por lo que no son fecundados y llevan una dotación haploide de cromosomas (16) (Ortega Sada 2008).

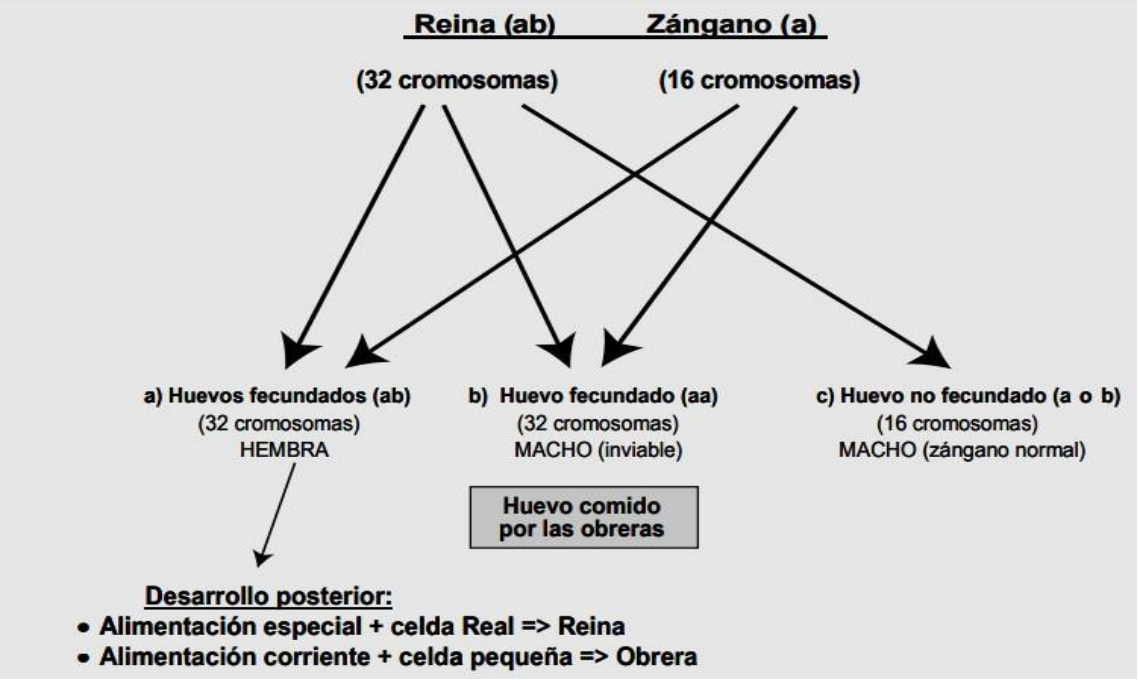

Figura 1. Determinación del sexo en *Apis mellifera* (Duttmann *et al*. 2013).

La postura se puede llevar a cabo a partir de los tres a cuatro días después de la fecundación. Generalmente la reina oviposita en las celdas, iniciando desde el centro y extendiéndose en forma elíptica, ocasionando que el desarrollo de las larvas sea escalonado (Barrera Reyes 2003). El pecoreo de una colonia se relaciona directamente con la presencia de cría, huevecillos y larvas, ya que estas son las encargadas de la alimentación de la colmena (Reyes Carrillo y Cano Ríos 2003). La evolución peso colmena es directamente proporcional a la población de abejas de una colmena y se considera que 10,000 abejas pesan aproximadamente 1 kg (Pierre y Le Conte 2007).

La fecundación natural de la abeja reina lo realizan a través del vuelo nupcial, aproximadamente a los siete días de nacida, apareándose con 10-20 zánganos (Fert 2003). En una altura de 10 hasta 30 m, con una duración de 15 a 30 minutos todo el vuelo nupcial (Padilla *et al.* 2007). En el periodo de escasa floración las abejas de la colonia eliminan a los zánganos, este comportamiento representa un problema al momento de la fecundación de las reinas. Por lo tanto, las reinas en el vuelo nupcial realizan la búsqueda de zánganos a

distancias más alejadas de lo normal. En algunas ocasiones no vuelven a regresar y pueden ser capturadas por algún pájaro, disminuyendo el porcentaje de éxito en la fecundación (Reyes Sánchez 2012).

La cantidad de huevos de obrera influye en la producción de miel; mientras más huevos, más obreras existirán en una colmena, lo que significa que la colonia tendrá mayor capacidad de colectar más néctar durante la época de excelente floración (Quero 2004). La inseminación artificial de abejas reinas, es la técnica que se utiliza para controlar el origen genético de los progenitores debido a que permite realizar cruzamientos controlados en un 100 % (Reyes Sánchez 2012). Es simplemente una herramienta para el criador de abejas y el investigador que requiere cruces específicos y proporciona un método para controlar el apareamiento de abejas melíferas. Esta técnica permite el control de con quién se relaciona la reina, el número de zánganos con los que se acopla y la dosis de semen administrada y almacenada en su espermateca (Cobey 2007b). Al realizar cruces específicos se pueden mejorar características productivas (kilogramos de miel por colmena), características de comportamiento higiénico, mansedumbre) y comportamiento de resistencia a enfermedades y plagas como por ejemplo la *Varroa destructor* (Anderson y Trueman) (Reyes Sánchez 2012). También se pueden conservar características deseables que en la naturaleza es difícil de controlar (Pierre y Le Conte 2007).

Los productores apícolas del país necesitan nuevas tecnologías, como crear programas de mejoramiento genético a partir de selección, y con la implementación de la técnica de inseminación artificial. Para poder mejorar las características productivas, de comportamiento y las de resistencia, de las abejas que se encuentran en el país ya que con esto se lograría obtener una mayor producción y ser competitivos. Los objetivos en este estudio fueron:

- Realizar la técnica de inseminación instrumental en abejas *Apis mellifera* con equipo Schley.

- Evaluar la oviposición y porcentaje de cría abierta de abejas reinas inseminadas artificialmente *versus* abejas reinas fecundadas naturalmente.

- Determinar la evolución peso colmena y pecoreo en los tratamientos con y sin inseminación instrumental.

2. METODOLOGÍA

Ubicación del experimento.
El estudio se realizó en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada a 32 km de Tegucigalpa, Honduras. La temperatura promedio durante el estudio fue de 23 ℃, con una precipitación promedio de 202 mm y a una altura de 800 msnm. La producción de reinas y zánganos se realizó en el apiario Monte Redondo de la unidad especializada apícola de la EAP. El estudio se desarrolló finalizando la época de floración o flujo nectario, entre los meses de junio a septiembre del 2018. La inseminación artificial de las abejas fue realizada en el Laboratorio de Entomología de Zamorano.

El equipo fue adquirido en préstamo de la Cooperativa Apícola Pionera de Honduras Limitada (COAPIHL). Este instrumento es modelo Schley (Figura 2). Él está constituido de un soporte, un conjunto de ganchos, ensamble de porta, jeringa y puntas de jeringa. Además, se requiere de un estereoscópico con un aumento de 10X a 20X, luz fría y soporte compatible con suficiente profundidad de campo y espacio libre para el instrumento. Una fuente de dióxido de carbono, con un regulador de flujo y un tubo flexible para el instrumento, se usa para anestesiar a la reina durante el procedimiento.

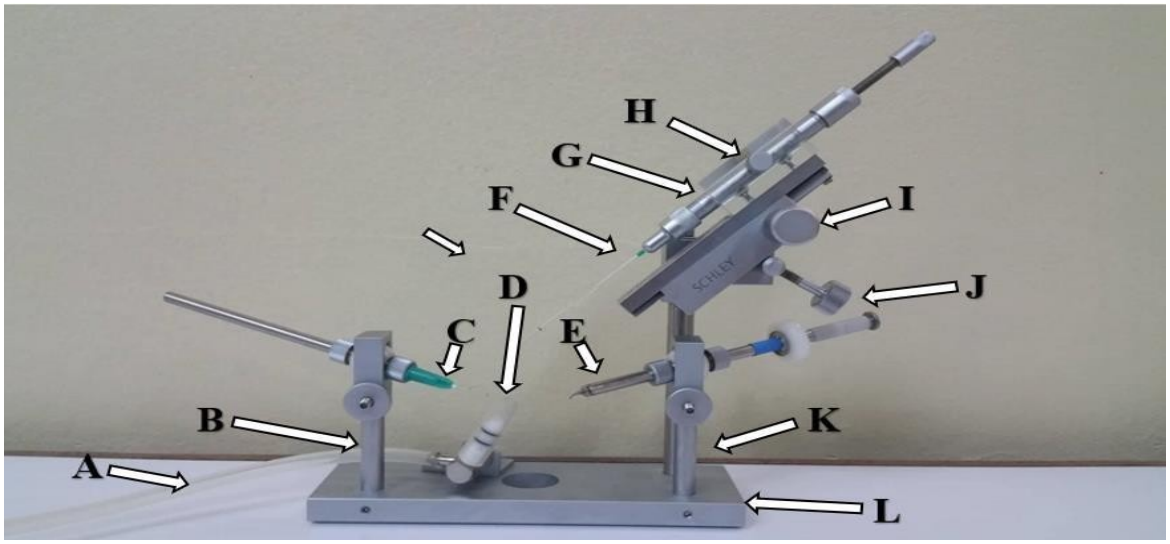

Figura 2. Equipo de inseminación artificial para abejas modelo Schley. (A) Manguera de flujo de gas; (B) soporte de la pinza ventral; (C) gancho ventral; (D) soporte del tubo porta reina; (E) pinza dorsal; (F) tuvo capilar de succión; (G) sujetador de la jeringa; (H) jeringa de succión; (I) tornillo para regular el desplazamiento de la jeringa; (J) tornillo para regular el ángulo de la jeringa; (K) base de la pinza dorsal; (L) base de la máquina.

Crianza de reinas.
Para la producción de abejas reinas se seleccionaron colmenas saludables de la unidad especializada apícola de la EAP, destinadas a la crianza de reinas para la producción de jalea real. La crianza de reinas se realizó aplicando el método de Doolittle. En este método se seleccionó un panal con abundante postura de huevos y larvas recién emergidas (de 1 a 2 días de su ciclo biológico). Se transfirieron larvas menores de dos días, utilizando copas-celdas de cera y plástico para simular celdas reales. Posteriormente fueron colocadas en un marco porta listones.

En este estudio debido a la época de escasez de alimento en la colmena, se suministró una dieta energética y proteica utilizando jarabe de azúcar y polen para mantener la cría de abejas reinas. Para realizar la cría de abejas reinas, se seleccionaron cuatro colonias de abejas diferentes: una donadora de cría, una iniciadora, una finalizadora yun banco de reina.

Colmena donadora. Se utilizaron 15 copas celdas de plástico colocadas en tres listones de madera (Figura 3A). Se extrajo un marco con cría abierta de la colmena donadora, asegurándose que en su mayoría estuviera formado por larvas de 2 días; este fue llevado a la planta apícola para realizar el trasvase por el método de Doolittle (Figura 3B). En las copas celda se colocó una gota fina de una mezcla a base de miel y jalea real (50:50) (Figura 3C), buscando fijar la larva al fondo y evitar su muerte por deshidratación para obtener reinas de buena calidad. Las colmenas se ubicaron cerca de donde se realizó la transferencia de larvas.

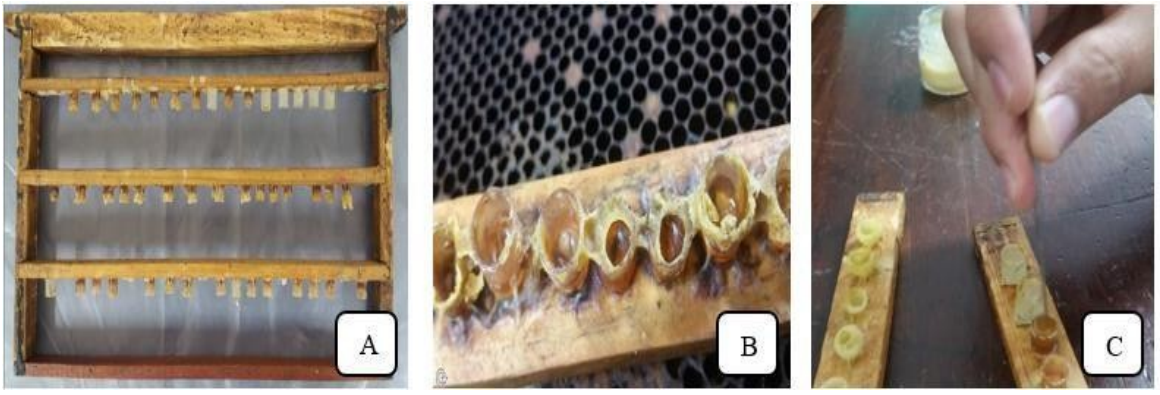

Figura 3. Proceso de trasvase de larvas de abeja. (A) Marco porta listones; (B) trasvase de larvas; (C) copas celdas con la mezcla de miel y jalea real.

Colmena iniciadora. Se utilizó una colmena de dos cuerpos con alta población de abejas (Figura 4A). Se capturó la reina de la cámara de cría y se introdujo en la cámara de miel. La colmena fue dividida en dos partes (Figura 4B), una colmena huérfana formada por: dos panales de cría abierta, un alimentador de plástico y un marco cría sellada; esta colonia se mantuvo en el mismo sitio. La segunda parte (con reina) fue colocada al borde de la anterior. Esta actividad se realizó cuatro horas antes del trasvase. Se introdujo el marco porta listones al centro de la colonia huérfana, para asegurar una adecuada temperatura de 34-37 °C (Figura 4C).

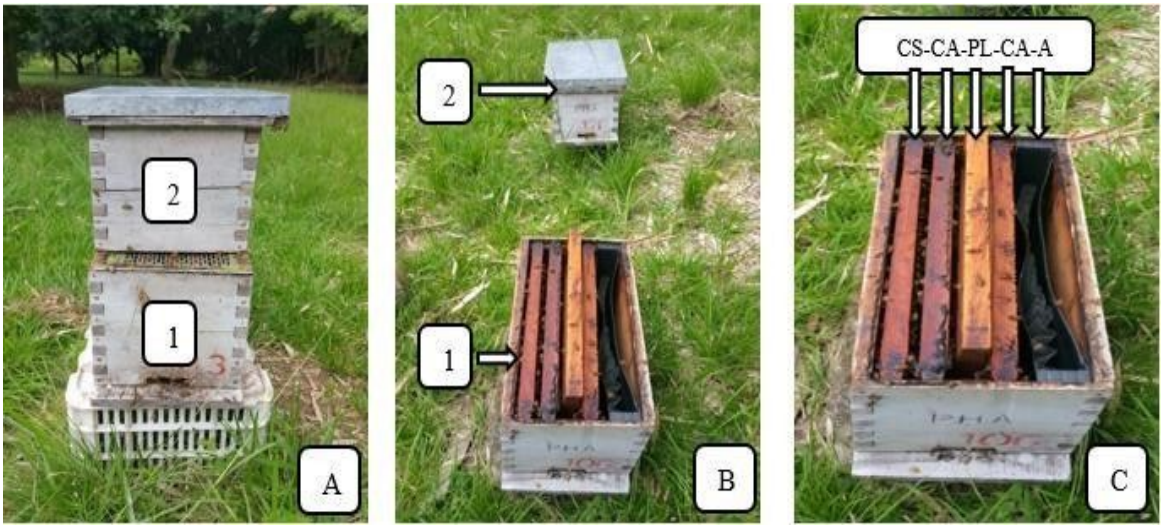

Figura 4. Conformación de la colmena iniciadora. (A) Colmena de dos cuerpos; 1) de cría 2) de miel; (B) colmenas separadas en dos cuerpos a) sin reina b) con reina; (C) distribución de los marcos en la colmena iniciadora: marco de cría sellada [CS], marco de cría abierta [CA], marco porta listones [PL] y un alimentador de plástico [A].

Colmena finalizadora. Se utilizó una colmena de tres cuerpos (Figura 5A), el primer cuerpo estuvo conformado por una cámara de cría. Se buscó la reina de la colonia y se introdujo en el primer cuerpo, en el que se colocó un excluidor de reina en la parte superior para evitar el desplazamiento de esta al resto de los cuerpos (Figura 5B). Se introdujo el marco porta listones en el primer cuerpo de la colmena, debido a que en esta parte de la colmena se encuentran la mayor cantidad de abejas nodrizas encargadas de la alimentación de las larvas. Las otras dos alzas estaban conformadas por cámaras de miel. Además, se colocó un alimentador de plástico con 1 L de jarabe de agua y azúcar y con 40 g de polen (Figura 5C).

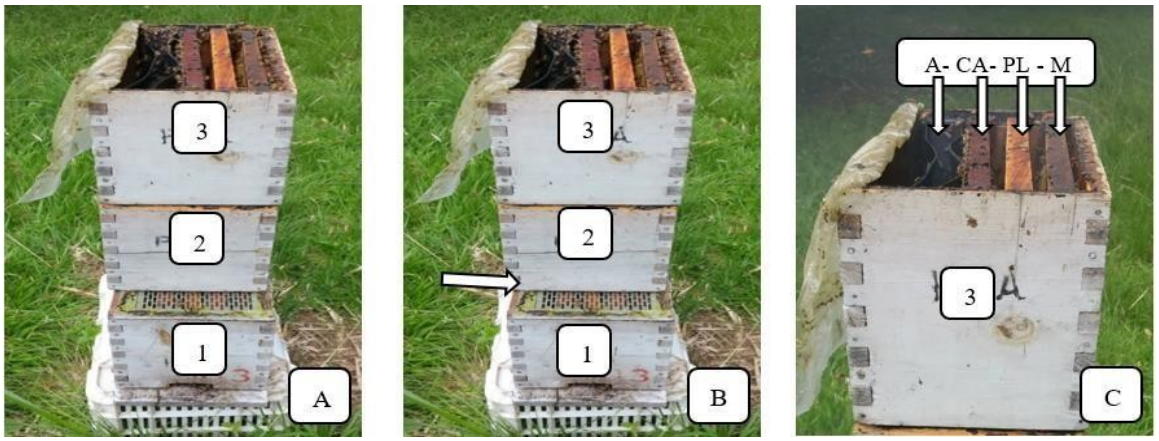

Figura 5. Conformación de la colmena finalizadora. (A) Triple: 1 con cámara de cría, 2 y3 con cámara de miel; (B) cuerpo uno con reina, y un excluidor en la parte superior entre el cuerpo uno y dos; (C) cuerpo tres formado por: alimentador [A], marco de cría abierta [CA], marco porta listón [MPL] y un marco de polen y miel [PM].

Mantenimiento de reinas pre y post inseminación. Después de ocho días desde el trasvase, se procedió a enjaular individualmente las copas celda de las reinas (Figura 6A). Esto se realizó para evitar la pérdida de las reinas, ya que la primera reina en emerger de su celda busca a las demás celdas para eliminarlas (Figura 6B). Las celdas enjauladas fueron colocadas en una colmena vivero o banco de reina con abundantes abejas nodrizas.

Figura 6. Enjaulado de las celdas reales. (A) Retiro de celdas reales de la colmena finalizadora después de 8 días de su trasvase; (B) enjaulado de las celdas reales; (C) marco de jaulas individuales de reinas.

Banco de reinas o colmena vivero. Se utilizó una colmena saludable y con alta población, de la cual se obtuvieron cuatro panales. Estos fueron colocados en la parte central del cajón; en los bordes se ubicaron cuatro panales con miel y polen (Figura 7). En el centro de la cámara de cría se mantuvo un espacio libre para introducir el bastidor con las reinas enjauladas, se proporcionó alimento con jarabe de azúcar. Dos días después, ocurrió la emergencia de las reinas y se mantuvieron allí durante nueve días (cuando alcanzan la madurez), hasta realizar la inseminación. Después de realizar la técnica de inseminación las reinas fueron colocadas en la misma colmena vivero durante cuatro días, hasta que fueron llevadas a sus nuevas colmenas donde se evaluaron las variables. Para asegurar la alta población de abejas en la colonia se realizó mantenimiento colocando dos marcos de cría sellada por semana.

Figura 7. Distribución de marcos en el banco de reinas. Marco de miel; (M) marco de polen; (P) marco de cría; (C) marco con jaulas de reinas (JR).

Crianza y colecta zánganos. Debido a la época de poca floración no se logró establecer la producción de zánganos. Por lo tanto, se procedió a colectar los zánganos que salen de las colmenas durante la tarde (Figura 8A). Se elaboró una jaula utilizando un marco libre de cera, colocando una malla metálica en los dos lados del marco y se dejó una entrada para facilitar el ingreso y salida de los zánganos. La colecta final fue de 80 individuos, a los cuales se les agregaron 100 abejas nodrizas (Figura 8B).

Figura 8. Colecta de zánganos. Colecta de los zánganos con una pinza al momento de salir de su colmena (A); zánganos colocados en jaula (B).

Proceso de inseminación de reinas.

Tratamiento con CO_2. Un día previo a la inseminación de reinas, se suministró un tratamiento de CO_2. Para realizar este proceso se utilizó una bolsa plástica transparente, en la cual se colocaron las reinas a inseminar, el CO_2 se aplicó por tres minutos. Yel segundo tratamiento se aplicó el día que se realizó la inseminación instrumental. El tratamiento con CO_2 ayuda a estimular la oviposición de las reinas inseminadas.

Se colocó la reina en un tubo cilíndrico, el cual tiene en el fondo un tapón con un pequeño orificio (Figura 9A). Cuando la reina llega al final del tubo se siente amenazada, y es obligada a caminar de reversa, en ese momento se colocó un segundo tubo del mismo diámetro y se acoplo con el primer tubo (Figura 9B). El caño que contenía la reina se colocó en el soporte donde está conectado can la línea de CO_2 (Figura 9C), este proceso se realizó para las cuatro reinas inseminadas individualmente.

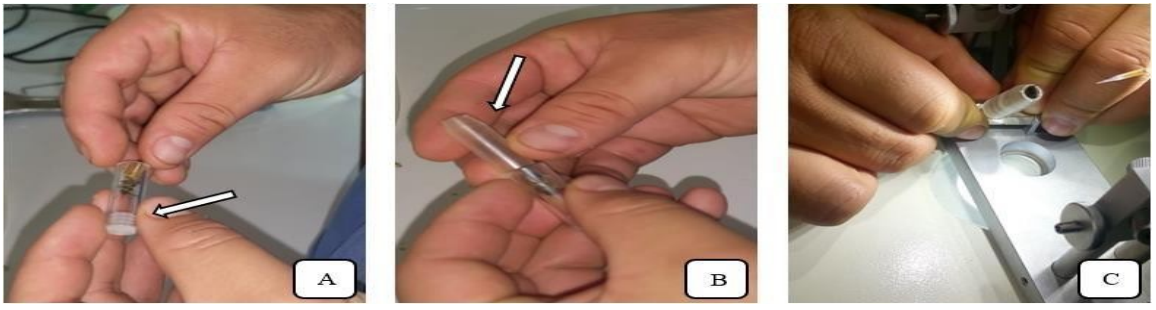

Figura 9. Inmovilización de la reina. (A) Tubo porta reina con tapón al final indicado; (B) tubo porta reina con diámetro reducido en uno de sus extremos; (C) soporte para la reina.

Colecta de semen. Se realizó la eversión del aparato reproductor (endofalo) de los zánganos, mediante la estimulación manual (Figura 10A). La eversión parcial se obtuvo sosteniendo el zángano por la cabeza y el tórax y presionando el extremo del abdomen (Figura 10B). Para obtener la eversión completa (Figura 10C), se aplicó presión con el pulgar y el índice a lo largo de los lados del abdomen, iniciando por la parte anterior hasta el final del abdomen. En la punta del endofalo se observaron dos sustancias: una sustancia cremosa (semen) y otra de color blanco (mucosa) (Figura 10D).

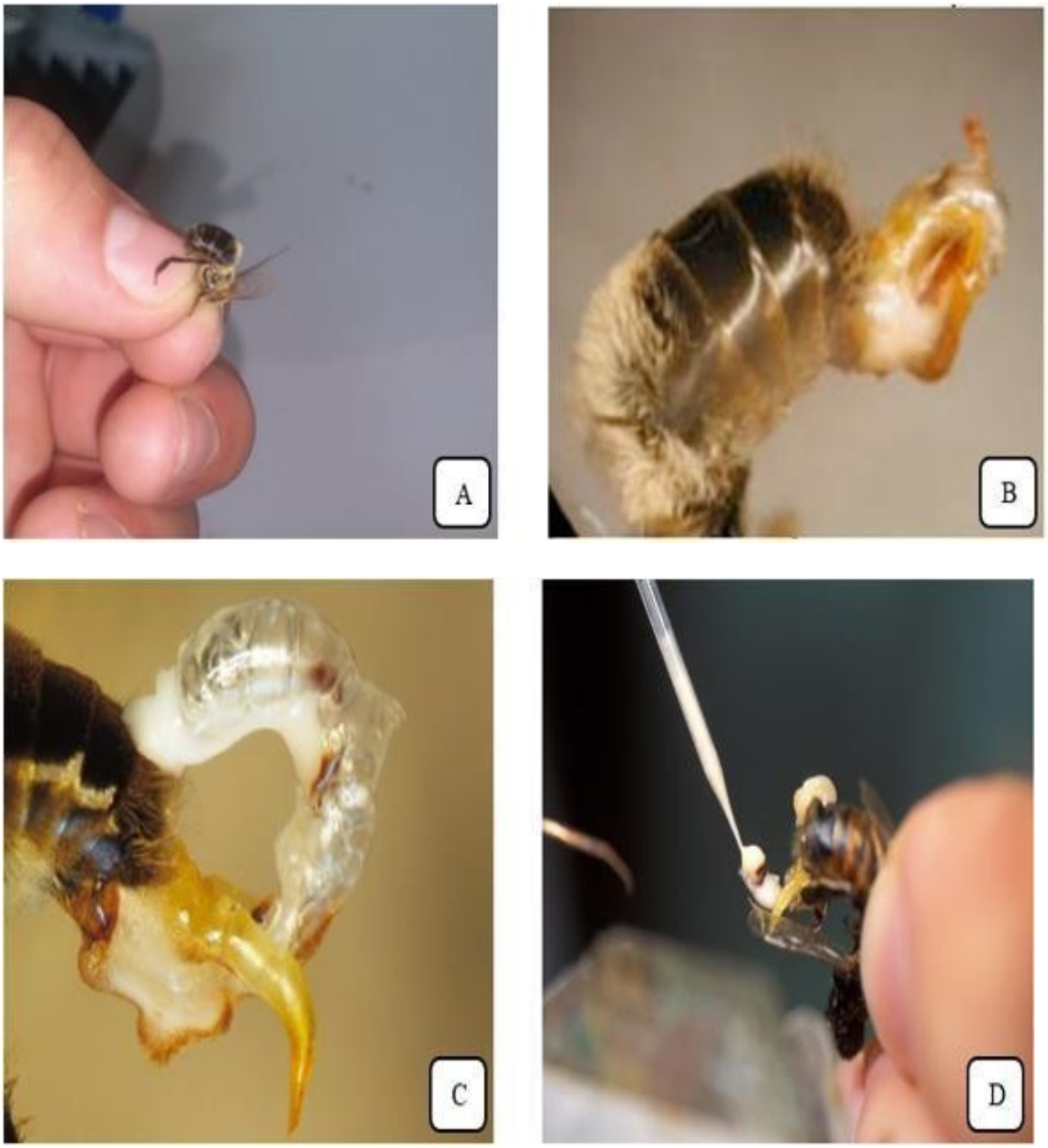

Figura 10. Estimulación de zánganos y extracción de semen. (A) Manipulación de los zánganos; (B) eversión parcial del endofalo; (C) eversión total del endofalo; (D) succión del semen con el tubo capilar. Fuente: Cobey 2007a.

Narcotización de la reina. Luego de colocar la reina en el soporte, se reguló el flujo de CO_2 introduciendo la manguera de salida de gas en un vaso con agua (Figura 11A), hasta observar que fluctuara una burbuja por segundo. Se procedió a la narcotización de la reina aplicando el CO_2 y en un minuto se logró la inmovilización de la reina, momento en el cual deja de mover el abdomen y en algunos casos abre la cámara de picadura (Figura 11B).

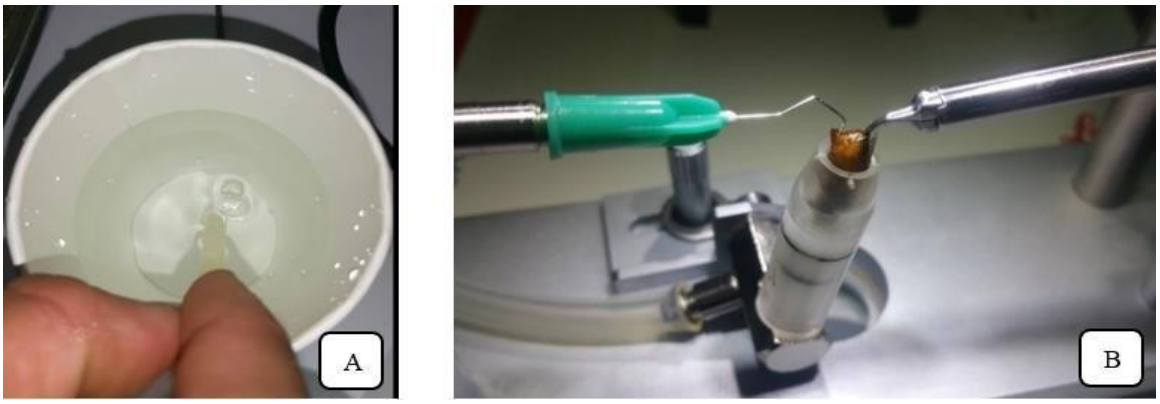

Figura 11. Regulación del flujo de gas CO_2 para adormecer la abeja reina. (A) Vaso con agua para regular el flujo del CO_2; (B) gancho ventral y la pinza para sujetar el aguijón.

Apertura de la cámara del aguijón. Para abrir la bolsa copuladora se utilizaron pinzas y ganchos. Primero se introdujo el gancho dorsal en la cámara del aguijón, después con la pinza dorsal se sujetó el aguijón y se levantó hacia arriba a la derecha. Cuando los ganchos están posicionados correctamente el tejido se estira formando una letra "V" (Figura 12). Cuando la cámara copuladora está abierta se observa un tejido arrugado al fondo que define el orificio vaginal y después se encuentra un pliegue membranoso el cual conecta la vagina con el orificio del oviducto. Se procedió a introducir la jeringa en la parte superior de la "V" que se forma en el lado izquierdo.

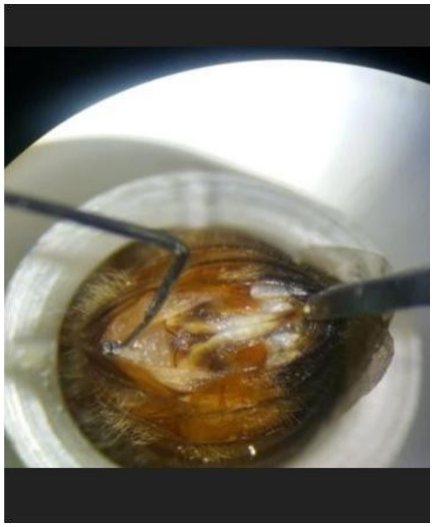

Figura 12. Apertura de la cámara copuladora de la abeja reina.

Suministro de semen. Se depositó el semen, pero antes se recolectó en la punta de capilar 2µL de solución salina y un pequeño espacio de aire. Esto actúa como lubricante y permite probar si la punta de la jeringa se está colocando correctamente, evitando el secado de los tejidos. La punta de vidrio se colocó arriba y a la derecha de la "V" que se formó del tejido arrugado (Figura 13A). Para esquivar el plegado de la válvula, se realizó un ligero movimiento en zig zag de la punta de la jeringa. Al momento de introducir la jeringa esta tiene que pasar con facilidad sin hacer presión en la vagina hasta llegar al oviducto, si se observan movimientos en la vagina no se está insertando correctamente la jeringa (Peter 2014). Después de introducir la jeringa se administró (Figura 13B) lentamente 8 µL.

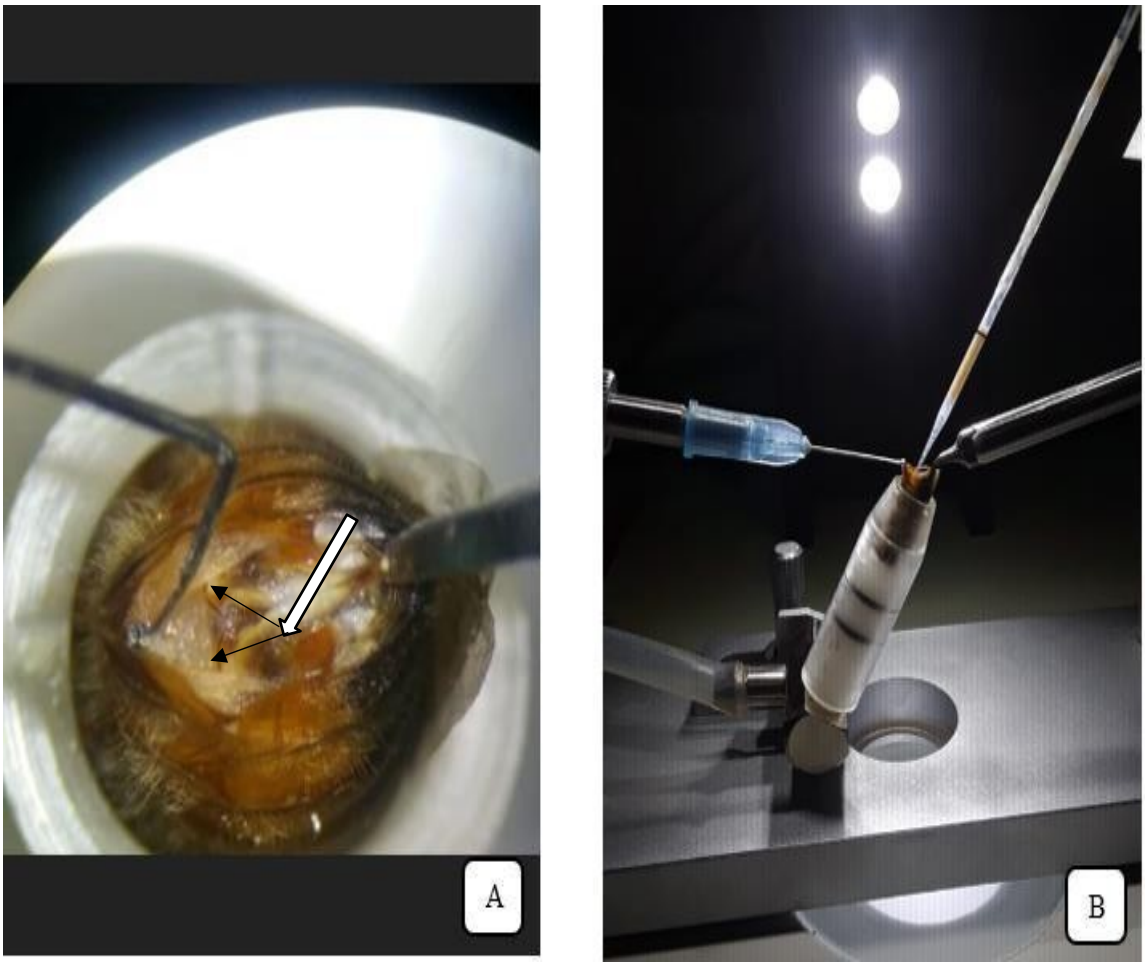

Figura 13. Inseminación de reinas. (A) Cámara copuladora de la reina, la flecha indica la forma ¨V¨ en el fondo de la vagina; (B) suministro de semen.

Introducción de reinas en las colmenas. Se procedió a sacar las reinas del banco y se colocaron en jaulas porta reinas (Figura 14A). Al momento de introducirlas en las colmenas se aplicó un poco de humo, se hizo un espacio al centro de la colmena para colocar en la parte superior la jaula y se presionó con los marcos (Figura 14B), para que las abejas de la colmena reconozcan su nueva reina. Las reinas se mantuvieron enjauladas durante dos días para posteriormente ser liberadas.

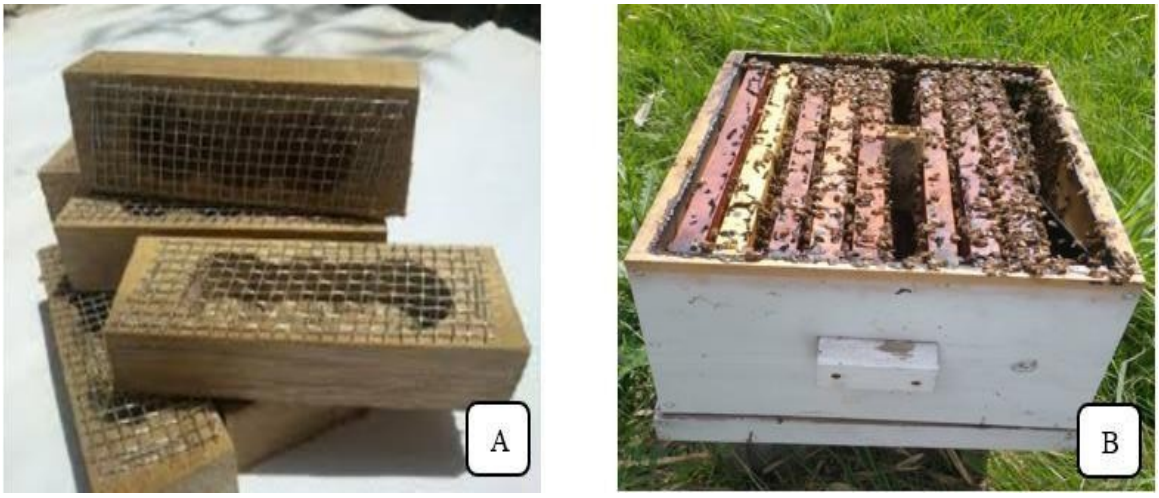

Figura14. Acoplamiento de reinas a colmenas huérfanas. (A) Jaula individual porta reinas; (B) forma adecuada de colocar las jaulas en la colmena.

Mantenimiento de las colmenas. Luego de la introducción de las reinas a las colmenas, se realizó una alimentación a cada uno de los tratamientos, suministrándoles 750 ml de jarabe de azúcar semanal (Figura 15), con una relación (2:1) 2 kg de azúcar en 1 L de agua, con el propósito de estimular la postura.

Figura 15. Alimentación de las colmenas. Suministro de 750 mililitros de jarabe de azúcar.

Diseño experimental.
Se utilizó un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA), compuesto por dos tratamientos: inseminadas y sin inseminar, utilizando cuatro colmenas por cada tratamiento. Los datos fueron analizados utilizando el programa Statistical Analysis Systems (SAS®

2013), versión 9.4. Se realizó un ANDEVA y una separación de medias por el método DUNCAN a una significancia de P ≤0.05 para las variables de oviposición, cría abierta evolución de la colmena y pecoreo.

Variables evaluadas.

Oviposición y cría abierta. La estimación de oviposición y cría abierta se realizó utilizando un cuadrado de papel cartulina con una dimensión de 5.5 cm × 5.5 cm (Figura 16). Se eligió un marco en la parte central de la colmena, considerando que la reina inicia su postura desde el centro hacia los bordes. Posteriormente, se realizó un conteo del número de huevos y cría abierta presentes en el cuadrado. Se realizó la estimación de postura, utilizando una escala de 1–3 (Cuadro 1), agrupando todos los huevos menores de tres días, en base a los parámetros sugeridos por Pierre y Le Conte (2007) en el que se debe tomar en cuenta que al primer día el huevo se encuentra perpendicular en el fondo de la celda, en el segundo día ocurre una inclinación y, por último, queda completamente acostado.

Cuadro 1. Escala de ovoposición para época de escasa floración.

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

Fuente: Montesinos Arraiz 2018

La estimación de cría abierta de las reinas inseminadas artificialmente y las reinas fecundadas naturalmente se realizó a través de un conteo de larvas después de tres días de la eclosión del huevo. Para esto, se realizó una inspección previa, buscando utilizar únicamente las larvas sanas, con un color nacarado. Esta actividad se realizó semanalmente durante cuatro semanas.

Figura 16. Marco con cuadro cuantificando la postura de la reina.

Evolución de la colmena. Esta variable se determinó a través del pesaje semanal de las colmenas. Esta medición se realizó durante cuatro semanas, entre 8:00–10:00 am. Antes de iniciar, se realizaron aplicaciones de humo en la piquera (Figura 17A) para reducir la agresividad de las abejas (Figura 17B) y se colocó la colmena completa sobre una balanza digital (Figura 17C). Al peso total obtenido se le restó el peso de los cajones para obtener el peso real.

Figura 17. Medición de peso de colmenas. (A) Aplicación de humo en la piquera; (B) levante de la colmena; (C) pesado de la colmena.

Pecoreo. La estimación de la actividad de pecoreo de las ocho colmenas se realizó durante la mañana, debido a que es cuando las abejas pecoreadoras salen de la colmena para realizar la recolección de néctar y polen. Para esto, dos personas se colocaron a dos metros de los extremos de la colmena, contando las abejas que entraban y salían de la piquera durante un minuto. El procedimiento se repitió y se obtuvo un promedio de los datos. Para esta medición se debe evitar las lluvias y la aplicación de humo en la piquera, ya que ambos factores pueden afectar los datos al reducir la actividad de las abejas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crianza de reinas.
Para la producción de reinas, de 50 larvas que se colocaron en la copa celda solo 42 larvas lograron ser aceptadas por las abejas nodrizas, representando un 84% de aceptación. El 16% de pérdida se debió a la poca experiencia en la crianza artificial de reinas. Al momento de realizar el traslarve es importante seleccionar larvas de colmenas saludables, con edad menor a 48 horas, ya que de esto depende la calidad final de las reinas obtenidas (Argüello Nájera 2010). Según Fert (2003), larvas mayores de dos días y la insuficiencia de polen y néctar darán como resultado la producción de reinas de inferior calidad. Las reinas inferiores tienen menos ovariolos de tal manera que la oviposición es menor.

Crianza de zánganos.
En este estudio la crianza artificial de zánganos se realizó en el período de escasa floración y debido a esta época no se tuvo éxito. Según Barrera Reyes (2003), en la estación de abundante floración las reinas incrementan extraordinariamente el número de zánganos en la colmena. Los zánganos utilizados para la extracción del semen fueron colectados en colmenas destinadas a la cría de reinas para obtención de jalea real. Estas colmenas seleccionadas recibieron un mantenimiento constante y fueron alimentadas durante el periodo de escasez, gracias a esto las poblaciones de zánganos se mantuvieron estables durante la época.

Se determinó que la mejor hora para realizar la colecta de zánganos es entre 1:30–4:30 pm, debido a que a estas horas los zánganos salen de la colmena a realizar la búsqueda de reinas vírgenes (Pires *et al.* 2005). Los zánganos que fueron almacenados en el interior de la jaula, tuvieron un alto porcentaje de mortalidad cuando no se introducían abejas nodrizas, debido a que no pueden alimentarse por sí solos (Fert 2003). Por esta razón, fue necesario agregar 100 abejas en el interior de la jaula, donde se encontraban los 80 zánganos colectados.

Colecta de semen.
Según Cobey (2007a), la dosis estándar para inseminar a una abeja reina es de 8µL, esta cantidad de semen puede obtenerse aproximadamente de ocho zánganos, considerando que cada zángano maduro puede aportar 1 µL. En este estudio se utilizaron 15 zánganos para obtener 8 µL de semen, debido a que, durante la colecta de semen, se observó que varios zánganos no eran sexualmente maduros. Si durante la eversión parcial el abdomen es suave significa que el zángano es inmaduro y no producirá semen (Figura 18A), pero si el abdomen se contrae y permanece rígido el zángano es maduro y producirá semen (Figura 18B) (Cobey 2007a).

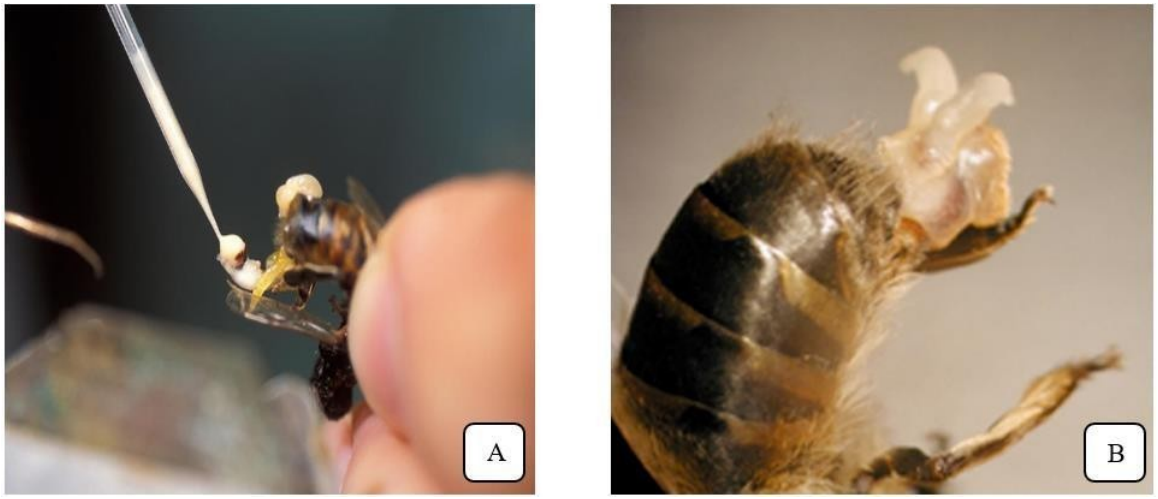

Figura 18. Extracción de semen. A) Zángano inmaduro; (B) zángano maduro Fuente: Cobey (2007)

Inseminación artificial.

La inseminación artificial en abejas se desarrolló con éxito, debido al buen manejo de las reinas pre y post inseminación artificial, esto se comprobó al décimo día encontrando posturas con huevos fértiles.

Al realizar el proceso de inseminación instrumental se deben tomar en cuenta los siguientes factores para realizar la técnica con éxito (Peter 2014):

- Cuando la reina esté en el sujetador al menos 3 segmentos del abdomen debe estar expuestos.
- Verificar que la reina (y el tubo de sujeción) esté completamente en línea con la jeringa antes de realizar cualquier manipulación.
- El aguijón debe sacarse del exterior del cuerpo para permitir que la entrada vaginal quede expuesta adecuadamente.
- Verificar nuevamente y asegurar que la reina está completamente en línea (axial y linealmente) con la punta de la jeringa.
- Se puede tolerar un ángulo de ataque ligeramente reducido (menos profundo).
- No debe haber burbujas de aire en la jeringa.
- Para facilitar la entrada vaginal se debe insertar la punta de la jeringa aproximadamente 0.5 mm. Luego se mueve ligeramente hacia la izquierda (para superar la válvula plegada) y continuar la inserción durante otros 0.5 mm (suponiendo que la jeringa esté a la derecha del equipo).
- Después de inyectar los espermatozoides y antes de retirarlos, reducir la contrapresión succionando aproximadamente 0.5 a 1 µL con la jeringa.
- Para evitar vibraciones y cansancio se debe apoyar el codo de la mano derecha sobre la superficie de trabajo cuando manipule la jeringa (suponiendo que la jeringa esté en la posición de la mano derecha).

Evaluación de oviposición. La oviposición de las reinas inseminadas fue mayor (Cuadro 2), con una postura de promedio de 825 huevos, calificada como regular en la escala de Montesinos Arraiz (2.75) (Figura 19), en comparación a las reinas sin inseminar que tuvieron un promedio de 426 huevos calificada como una postura poca en la escala de Montesinos Arraiz (1.42), presentando una diferencia significativa de (P=0.02). Según Root (2008) y Montesinos Arraiz (2018) en sus estudios realizados en la época de escasa floración, una postura diaria promedio de 900 huevos es abundante, 450 huevos diarios es considerado regular y 225 huevos diarios es poca. En la valoración reproductiva dela reina una escala de 3 representa una eficiencia de postura abundante, 2 una postura regular y 1 poca (Montesinos Arraiz 2018).

Cuadro 2. Resultados de la oviposición de las reinas (Escala 1–3).

Tratamiento	**Oviposición**
Inseminadas	2.75a*****
Sin inseminar	1.42b
Probabilidad	0.02
r^2	0.88

*: Medias con letras diferentes en la columna indican diferencia entre tratamiento (P≤0.05)

Esta diferencia de oviposición se debió a que en las reinas inseminadas se controló la cantidad de semen de 8 µL, a diferencia de las reinas fecundadas naturalmente. Las reinas sin inseminar no iniciaron su postura durante la primera semana. Probablemente esto se debió a que no almacenaron la cantidad de espermatozoides apropiada por el bajo número de zánganos durante esta época. Cuando las reinas salen al vuelo nupcial y almacenan menos de 3.5 millones de espermatozoides copulan nuevamente en otros vuelos nupciales (Woyke 1980), por lo que se cree que estas reinas realizaron su vuelo nupcial nuevamente durante la primera semana.

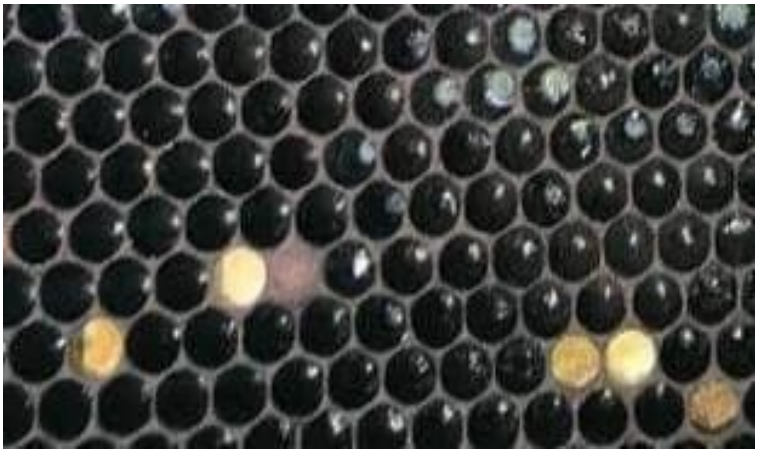

Figura 19. Celdas con postura de huevo.

Cría abierta. Las abejas reinas inseminadas artificialmente obtuvieron un mayor porcentaje de cría abierta (Cuadro 3), con un promedio 48.91% y las abejas reinas sin inseminar presentaron un promedio 20.38%, con una diferencia significativa de (P=0.03). Este resultado coincide con el estudio realizado por Reyes Sánchez (2012), quien obtuvo un mayor porcentaje de cría abierta en las reinas inseminadas. Esto se atribuye también a que las reinas inseminadas reciben una dosis alta de semen, mientras que las reinas con fecundación natural, posiblemente no pudieron aparearse con el número suficiente de zánganos, lo que no permite acumular la cantidad adecuada de espermatozoides para fertilizar un mayor número de huevos, dando como resultado una menor cantidad de postura (Figura 20).

Cuadro 3. Resultados evaluación de cría abierta (%).

Tratamiento	**Porcentaje**
Inseminadas	48.91a*****
Sin inseminar	20.38b
Probabilidad	0.03
r^2	0.91

*: Medias con letras diferentes en la columna indican diferencia entre tratamiento (P≤0.05)

El número de zánganos presentes en las colmenas se reduce durante la época de escasa floración (Gould y Gould 1988) y cuando no hay suficiente entrada de néctar a la colmena, las obreras expulsan a los zánganos o los matan sin piedad (Quero 2004). Los zánganos maduros son un factor limitante para la fertilización de la reina, ya que el éxito del apareamiento de las reinas está relacionado con la cantidad de zánganos y su calidad del esperma (Cobey 2007b). La calidad del esperma y el número de espermatozoides que entra en la espermateca de la reina es menor en los zánganos maduros (Collins 2004). Esto explica la reducción en la fertilidad de las reinas fecundadas naturalmente.

Figura 20. Celdas con cría o larvas abiertas.

Evaluación de la evolución peso colmena.

En el caso del peso de la colmena (Cuadro 4), las colmenas con reinas inseminadas presentaron un peso promedio de 23.91 kg en comparación de las colmenas con reinas sin inseminar 22.93 kg, no se encontró diferencia significativa (P=0.09). Una de las principales razones podría ser la corta duración del estudio, o la época (escasa floración). Pierre y Le Conte (2007) sugieren que la época de mayor evolución de la colmena se da en la época de abundante floración. IICA (2009) establece que en la zona de Danlí, la época de mayor floración inicia en septiembre–octubre. El estudio se llevó a cabo durante junio–agosto (épocas de muy poca floración).

Cuadro 4. Resultados evolución peso colmena (kg).

Tratamiento	**Kilogramos/colmena**
Inseminadas	23.91^{ns}
Sin inseminar	22.93
Probabilidad	0.09
r^2	0.48

ns: No se encuentran diferencias entre tratamientos (P>0.05).

Otro factor influyente es el horario en el que se evaluó el peso. Según Seeley (1995) es importante considerar la hora del día en que se mide el peso de la colmena, siendo óptimo hacerlo al anochecer cuando las abejas están dentro de la colmena con el néctar acumulado durante el día. En este estudio se realizaron las mediciones de peso durante la mañana.

Pecoreo.

La variable de pecoreo para los tratamientos (Cuadro 5), presentó diferencias significativas (P=0.02. Las colonias de abejas con reinas inseminadas presentaron una mayor actividad de pecoreo con un promedio de 41 abejas por minuto y las colonias de abejas con reinas sin inseminar presentaron un promedio de 31 abejas por minuto.

Cuadro 5. Resultados estimación de la actividad de colonia (abejas/minuto).

Tratamiento	**# abejas/minuto**
Inseminadas	41a*****
Sin inseminar	31b
Probabilidad	0.02
r^2	0.87

*: Medias con letras diferentes en la columna indican diferencia entre tratamiento (P≤0.05)

La estimación de la actividad de colonia (pecoreo) (Figura 21) se relaciona directamente con la presencia de cría, huevecillos y larvas (Barrera 2003). Según Pierre y Le Conte

(2007) la precisión del conteo en época de floración es satisfactoria hasta 100 abejas por minuto. El conteo de pecoreo para este estudio fue de 41 abejas/minuto para las reinas inseminadas.

Figura 21. Actividad de pecoreo.

4. CONCLUSIONES

- La técnica de inseminación instrumental en abejas reinas *Apis mellifera* se puede aplicar de manera exitosa para mejorar las cualidades de la colmena; el éxito de la aplicación de la técnica no depende únicamente en saber efectuarla sino también en las practicas apícolas que se aplican pre y post inseminación en la colmena.

- Las abejas reinas inseminadas presentaron una mayor oviposición y cría abiertas que las abejas reinas sin inseminar, por lo que sus colonias podrían tener mayor potencial productivo.

- A pesar que la actividad de pecoreo en las colonias con reinas inseminadas fue mayor luego de cuatro semanas de la inseminación de reinas, no se encontraron diferencias significativas en la evolución peso colmena.

5. RECOMENDACIONES

- Planificar la crianza de reinas y zánganos de tal forma que los dos coincidan con el tiempo de madurez sexual para evitar el riesgo que las reinas no sean fecundadas adecuadamente.

- Realizar este estudio en la época de mayor floración y por un tiempo más prolongado, y verificar si existe variaciones en cuanto a la eficacia de postura entre las reinas inseminadas artificialmente y las fecundadas de manera natural.

- Practicar y manejar la técnica de inseminación artificial con antelación para evitar lesiones en el aparato reproductor de la hembra, y así poder evitar la mortalidad en las reinas.

6. LITERATURA CITADA

Argüello Nájera O. 2010. Guía Práctica sobre Manejo Técnico de Colmenas. 2nd ed. Nicaragua, Honduras: Swisscontact Fomin-bid ; [consultado 2018 jun 21]. http:// www.agronegocioshonduras.org/wp-content/uploads/2014/06/guia_practica_ sobre_manejo_tecnico_de_colmenas.pdf

Barrera Reyes A. 2003. Manual de Cría de Abejas Reina [internet]. México; Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. [consultado 2018 jun 30]. http:// www.mieldemalaga.com/data/cria_de_reinas.mex.pdf

Barrios Rivera DV. 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, en Copiasuro, R. L., Catarina, [Tesis]. Universidad Rafael Landívar -Coatepeque. 84 p. http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2012/06/17/Barrios-Donald.pdf

Cobey SW. 2007a. Biología del acoplamiento, metodos de inseminación y desempeño de las reinas. Agro Sur. [consultado 2018 Ago 27]. 35(1):52–54. http:// mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0304-88022007000100020&script=sci_ arttext.

Cobey SW. 2007b. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. Apidologie. 38(4):390–410. doi:10.1051/apido:2007029

Collins AM. 2004. 90 Effective viability threshold for preserved honey bee semen. Reproduction, Fertility and Development. 16:166. doi:10.1071/RDv16n1Ab90.

Duttmann C, Castillo G, Lorenzo J, Verde M. 2013. La Apicultura y Factores que Influyen en Producción, Calidad, Inocuidad y Comercio de la Miel. 1st ed. Nicaragua: INTA; [consultado 2018 sep 8]. http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/ guia%20de%20apicultura.pdf

FAO (Food and Agricultural Organization) 2016. Celebración del Día Mundial de las Abejas. 25th ed. Roma: COAG; [consultado 2018 Sep 1]. http://www.fao.org/3/a-mr243s.pdf

Fert G. 2003. Cría de reinas. 2nd ed. España: S.A. mundi-prensa libros. 128 p.

Gould JL, Gould CG. 1988. The honey bee. 1st ed. New York (EE.UU): Scientific American Library. 239 p.

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2009. Manual de apicultura básica para Honduras. Tegucigalpa: Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG). [consultado 2018 sep 10]**.***repositorio.iica.int/bitstream/11324/2631/1/BVE17038710e.pdf*

Martínez Morales M. 2016. Las abejas su importancia para la naturaleza y nuestra sobreviencia. La Jornada Veracruz; [consultado 2018 jul 25]. 6(65): 1–8. http://www.jornadaveracruz.com.mx/extras/20168/160806_999.pdf

Melchor Rodriguez J. 2017. Diagnóstico sector Apícola. 1st ed. Honduras: Heifer internacional; [consultado 2018 sep 20]. https://apirudis.files.wordpress.com/2018/05/diagnostico-de-la-cedena-apicola-2017.pdf

Montesinos Arraiz P. 2018. Valoración reproductiva de las reinas. Venezuela: Albéitar PV; [consultado 2018 Ago 29]. https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/16372/articulos-otros-temas/valoracion-reproductiva-de-las-reinas.html

Ortega Sada JL. 2008. Mejora apícola con zánganos selecccionados, Secadero de polen en energía solar, La colmena mixta. 1st ed. España: MAPA. [consultado 2018 sep 3]https://www.miteco.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_2007_2126.pdf

Padilla Alvarez F, Flores Serrano JM, Pérez Ruiz, AJ. 2007. El comportamiento de apareamiento en las abejas de la miel. El colmenar. [consultado 2018 jul 19]; 32(85):1–8. http://www.uco.es/dptos/zoologia/Apicultura/trabajos_libros/2007_Apareamiento_El_Colmenar.pdf

Peter S. 2014. Instrumental bee Insemination : process Short Instructions to instrumental bee insemination. [internet]. Germany; [consultado 2018 jul 20]. http://www.besamungsgeraet.de/_en/the-insemination-process/

Pierre JP, Le Conte Y. 2007. Apicultura: Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena. 4th ed. Madrid: Mundi-Prensa; [consultado 2018 jul 10]. https://ebookcentral.proquest.com/lib/bvuzamoranosp/reader.action?docID=3207150&query=Apicultura

Pires SMA, Josa A, Costa AR.2005. Comparación entre la actividad de colonias de *Apis mellifera* L. sometidas a inseminación instrumental con la actividad de colonias fecundadas naturalmente. Portugal: Escuela Superior Agraria de Bragança; [consultado 2018 jul 1]. http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/itea/revistas/2005/101-3/ITEA_101-3_192-200.pdf

Quero A. 2004. La comunicación: Clave de la vida social. España: Universidad de Oviedo; [consultado 2018 sep 5]. 124 p. http://www.mieldemalaga.com/data/Las_abejas_y_la_apicultura.pdf

Reyes Carrillo JL, Cano Ríos P. 2003. Manual de Polinización Apícola [internet]. México; Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). [consultado 2018 sep 2]. http://www.mieldemalaga.com/data/manual_polinizacion_apicola.mex.pdf

Reyes Sánchez FR. 2012. Evaluación de la cría de abejas reinas (*Apis mellifera criolla)* fecundadas mediante inseminación artificial [Tesis]. Universidad Nacional de Loja-Ecuador 114 p. http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5402/1/TESIS%20FAUSTO%20REYES%20EVALUACI%C3%93N%20DE%20LA%20CR%C3%8DA%20DE%20ABEJAS%20REINAS.pdf

Root AI. 2008. El ABC y XYZ de la apicultura: Enciclopedia de la cria cientificia y practica de las abejas. 10th ed. Buenos Aires (Argentina): Editorial Hemisferio sur S.A. https://catalog.hathitrust.org/Record/009145799

SAS® (Statistical Analysis Institute Inc) 2013. Statistical Analysis Systems 9.4 for Windows Stantard versión users Guide.

Seeley TD. 1995. The wisdom of the hive: The social physiology of honey bee colonies. 1ra ed. New York: International Bee Research -Association; [consultado 2018 sept 10]. https://www.barambahbeekeepers.org/uploads/5/7/0/4/5704027/the_wisdom_of_the_hive_-_the_social_physiology_of_honey_bee_colonies.pdf

Valdés P. 2013. Situación mundial del Síndrome de Colapso de las Abejas. Inteligencia Competitiva para el sector Agroalimentario. Santiago de Chile, Agosto 2013.ODEPA. http://www.agrimundo.gob.cl/wp-content/uploads/130826_reporte_apicultura_n22.pdf

Verde MM. 2014. Apicultura y seguridad alimentaria. RCCA. [consultado 2018 sep 4]. 48(1):25–31. http://www.redalyc.org/pdf/1930/193030122008.pdf

Woyke J. 1980. Inseminación artificial de las abejas reinas en beneficio del desarrollo de la apicultura. El Salvador: Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador. 10 p.